

**ANNE-MARIE GÉLINAS**

**Variations génétiques et antigéniques associées aux glycoprotéines  
d'enveloppe de souches entériques et respiratoires du coronavirus bovin**

Mémoire

Présenté comme exigence partielle à l'obtention du grade de  
Maître ès Sciences (M. Sc.) en Virologie et Immunologie

Juin 2000

INRS-Institut Armand-Frappier  
Université du Québec

À mes parents,  
pour leur affection

À Denis,  
pour son amour et son soutien constant



## TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES.....	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xv
SOMMAIRE.....	xviii
1. INTRODUCTION .....	1
2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
2.0 Coronavirus.....	6
2.1 Généralités.....	6
2.1.1 Historique.....	6
2.1.2 Classification.....	6
2.1.3 Différentiation antigénique.....	7
2.2 Structure des coronavirus.....	9
2.2.1 Morphologie.....	9
2.2.2 Propriétés physico-chimiques.....	12
2.2.3 Génome viral.....	12
2.2.4 Protéines structurales.....	13
2.2.4.1 Protéine de la nucléocapside (N).....	13
2.2.4.2 Protéine de la matrice (M).....	15
2.2.4.3 Glycoprotéine des péplomères (S).....	18
2.2.4.4 L'hémagglutinine-estérase (HE).....	21
2.2.4.5 Petite protéine de la membrane (E).....	24
2.2.5 Protéines non-structurales (ns).....	25
2.3 Réplication virale.....	27
2.3.1 Attachement et pénétration.....	27
2.3.2 Transcription et réplication virale.....	28
2.3.3 Assemblage des virions.....	30

2.3.4	Bourgeonnement.....	30
2.4	Coronavirus bovins.....	31
2.4.1	Importance clinique.....	31
2.4.2	Pathologies cliniques.....	31
2.4.2.1	Diarrhée néonatale du veau.....	31
2.4.2.2	Dysenterie d'hiver.....	32
2.4.2.3	Infections du système respiratoire supérieur.....	32
2.4.2.4	Diagnostic.....	33
2.4.3	Existence de plusieurs sérogroupes de BCV.....	35
2.4.3.1	Souches américaines et du Japon (DH/DNV).....	35
2.4.3.2	Souches québécoises (DH/DNV).....	36
2.4.3.3	Comparaison entre les coronavirus bovins entériques et respiratoires.....	37
2.4.4	Construction d'un vaccin contre le BCV.....	38
2.4.4.1	Glycoprotéine HE.....	38
2.4.4.2	Glycoprotéine S.....	39
3	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	41
3.1	Cultures cellulaires.....	42
3.1.1	Origine des cellules.....	42
3.1.1.1	Adénocarcinome intestinal humain.....	42
3.1.1.2	Rein d'embryon humain.....	42
3.1.2	Culture des cellules.....	43
3.2	Origine et identification des virus.....	44
3.2.1	Souches de référence.....	44
3.2.2	Isolats cliniques.....	44
3.3	Propagation des virus.....	46
3.3.1	Infections des feuillets cellulaires.....	46
3.4	Purification des suspensions virales.....	46
3.4.1	Technique de dilution limite.....	46

3.4.2	Détermination du titre infectieux.....	47
3.4.3	Récolte et clarification des surnageants de cellules infectées....	47
3.4.4	Concentration des souches virales.....	48
3.4.4.1	Semi-purification.....	48
3.4.4.2	Purification.....	48
3.5	Détermination des propriétés biologiques et enzymatiques.....	49
3.5.1	Test d'hémagglutination.....	49
3.5.2	Test d'inhibition d'hémagglutination.....	49
3.5.3	Mesure de l'activité enzymatique destructrice de récepteurs....	50
3.5.4	Mesure de l'activité acétyl-estérase.....	50
3.6	Extraction de l'ARN viral et amplification du génome.....	51
3.6.1	Extraction de l'ARN viral à partir de virus purifié.....	51
3.6.2	Extraction de l'ARN viral à partir de feuillettes cellulaires infectés .....	52
3.6.3	Choix des amorces pour l'amplification des gènes HE et S1 ainsi que des régions ORF4 et ORF5.....	52
3.6.4	Réaction de transcription inverse.....	54
3.6.5	Réaction de polymérase en chaîne.....	54
3.6.6	Électrophorèse en gel d'agarose.....	55
3.7	Clonage des gènes HE , S1 et des régions ORF4 et ORF5.....	56
3.7.1	Ligation.....	56
3.7.2	Transformation.....	56
3.7.3	Sélection des clones.....	57
3.7.4	Méthode de lyse alcaline.....	58
3.7.5	Digestion enzymatique.....	58
3.7.6	Production d'ADN purifié.....	59
3.7.7	Séquençage.....	60
3.8	Expression des glycoprotéines S1 et HE.....	60
3.8.1	Adénovirus.....	60

3.8.2	Glycoprotéine S.....	63
3.8.2.1	Préparation de la sous-unité S1 du gène S.....	63
3.8.2.2	Préparation du vecteur pAdCMV5.....	63
3.8.2.3	Plasmides recombinants pAdCMV5/S1.DH.....	64
3.8.2.3.1	Ligation.....	64
3.8.2.3.2	Transformation.....	64
3.8.2.3.3	Criblage des bactéries transformées par le vecteur recombinant pAdCMV5/S1.DH.....	65
3.8.2.3.4	Purification d'ADN recombinant pAdCMV5/S1.DH .....	65
3.8.2.4	Transfection des cellules 293.....	66
3.8.2.5	Test d'immunofluorescence indirecte.....	67
3.8.3	Expression de la protéine HE par l'adénovirus recombinant.....	67
3.8.3.1	Purification et production de l'AdCMV5/HE.DH.....	67
3.8.3.2	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE).....	68
3.8.3.3	Immunobuvardage de type Western.....	69
3.9	Immunsation et tests de détection des anticorps.....	69
3.9.1	Immunsation des souris.....	69
3.9.2	ELISA indirecte.....	71
3.9.3	Test de séroneutralisation.....	72
3.9.3.1	Immunoperoxydase.....	72
4	RÉSULTATS.....	73
4.1	Production et propagation des souches virales.....	74
4.2	Propriétés biologiques et enzymatiques.....	74
4.2.1	Activité hémagglutinante et activité destructrice de récepteurs.....	74
4.2.2	Inhibition de l'hémagglutination.....	76
4.2.3	Activité acétyl-estérase.....	76

4.3	Amplification et clonage des gènes HE et S1 ainsi que des régions ORF4 et ORF5 des différents isolats de coronavirus et analyses des séquences obtenues.....	79
4.3.1	Gène codant pour la glycoprotéine HE.....	79
4.3.1.1	Amplification des gènes HE par PCR et purification de l'ADN.....	79
4.3.1.2	Analyses des séquences.....	79
4.3.1.2.1	Comparaison des séquences nucléotidiques du gène HE.....	79
4.3.1.2.2	Analyse des séquences d'acides aminés de la glycoprotéine HE des isolats de BRCV.....	86
4.3.2	Gène codant pour la glycoprotéine S.....	91
4.3.2.1	Amplification de la sous-unité S1 du gène S par PCR.....	91
4.3.2.2	Analyses des séquences.....	91
4.3.2.2.1	Comparaison des séquences nucléotidiques de la sous-unité S1 du gène S.....	91
4.3.2.2.2	Analyse des séquences d'acides aminés de la sous-unité S1 de la glycoprotéine S des isolats de BCV..	103
4.3.3	Gène codant pour les régions ORF4 et ORF5.....	112
4.3.3.1	Choix des souches utilisées.....	112
4.3.3.2	Amplification des régions ORF4 et ORF5 par PCR.....	112
4.3.3.3	Analyses des séquences.....	115
4.3.3.3.1	Comparaison des séquences nucléotidiques des gènes codés par les régions ORF4 et ORF5.....	115
4.3.3.3.2	Analyse des séquences d'acides aminés des protéines associées aux régions ORF4 et ORF5.....	123
4.3.3.3.3	Dépôt des séquences analysées dans GenBank.....	124
4.4	Expression des glycoprotéines S (sous-unité S1) et HE.....	130
4.4.1	Amplification de la sous-unité S1 du gène S.....	130
4.4.2	Production du plasmide recombinant pAdCMV5/S1.DH.....	131
4.4.3	Expression transitoire.....	131



4.4.4	Révélation de la sous-unité S1 de la glycoprotéine S du plasmide recombinant par SDS-PAGE.....	136
4.5	Expression de la glycoprotéine HE par un vecteur adénovirus recombinant.....	139
4.5.1	Production de l'AdCMV5/HE.DH.....	139
4.5.2	Révélation de la glycoprotéine HE dans les cellules 293 infectées par l'adénovirus recombinant AdCMV5/HE.DH par SDS-PAGE.....	139
4.6	Immunogénicité des protéines S (sous-unité S1) et HE recombinantes.....	145
4.6.1	Détection des anticorps suite à l'inoculation d'adénovirus recombinant.....	145
4.6.2	Détection des anticorps suite à l'immunisation génétique.....	147
5	DISCUSSION.....	150
6	CONCLUSION.....	159
	REMERCIEMENTS.....	163
	BIBLIOGRAPHIE.....	165
	ANNEXES.....	186
	Annexe 1 : Liste des Communications	
	Annexe 2 : Liste des Publications	
	Annexe 3 : Géotypes des souches de bactéries utilisées	
	Annexe 4 : Liste des acides aminés et leurs abréviations	

## LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 :	Groupes antigéniques des coronavirus et leurs hôtes naturels.....	8
TABLEAU 2 :	Pathologies cliniques associées aux différents isolats de coronavirus bovins utilisés lors des analyses des variations génomiques.....	45
TABLEAU 3 :	Amorces utilisées pour l'amplification des gènes HE et S1 et des régions ORF4 et ORF5 des souches de coronavirus bovins.....	53
TABLEAU 4 :	Différentiation des isolats de coronavirus bovins selon leur activité hémagglutinante (HA) à différentes températures et leur activité destructrice de récepteur (RDE)..	75
TABLEAU 5 :	Réactivité croisée des anticorps monoclonaux dirigés contre la glycoprotéine HE de la souche BCQ.2590 du coronavirus bovin et du sérum polyclonal hyperimmum 5801 (anti-Mebus) envers différents isolats de BCV associés à la DH, la DNV ou des problèmes respiratoires tel que démontrée par des tests d'IHA.....	77
TABLEAU 6 :	Activité acétyl-estérase (AE) des différents isolats de BCV associés à la DH, la DNV ou des problèmes respiratoires.....	78

TABLEAU 7 :	Variations observées dans les séquences d'acides aminés de la glycoprotéines HE d'isolats de BRCV comparativement à celles d'isolats de DNV et DH.....	90
TABLEAU 8 :	Variations d'acides aminés observées dans les séquences de la sous-unité S1 de la glycoprotéines S de souches associées à la DNV, la DH ou les BRCV, comparativement à la souche Mebus, spécifiques aux souches qui possèdent un tropisme entérique.....	110
TABLEAU 9 :	Variations d'acides aminés observées dans les séquences de la sous-unité S1 de la glycoprotéine S de souches associées à la DNV, la DH ou les BRCV, comparativement à la souche Mebus, spécifiques aux souches qui possèdent un tropisme respiratoire.....	111
TABLEAU 10 :	Réactivité des sérums de souris contre la souche homologue (BCQ.2590) et la souche Mebus du BCV suite à l'immunisation avec l'adénovirus recombinant AdCMV5/HE.DH .....	146

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : Représentation schématique d'un coronavirus hémagglutinant (sous-groupe II).....	10
FIGURE 2 : Représentation schématique du réseau d'ARNm sous-génomiques produits lors de la réplication des coronavirus.....	14
FIGURE 3 : Carte génétique du vecteur de transfert pAdCMV5.....	62
FIGURE 4a : Variations observées dans les séquences nucléotidiques des gènes HE de souches associées à des problèmes respiratoires..	81
FIGURE 4b : Comparaison des séquences d'acides aminés de la glycoprotéine HE d'isolats de BRCV à celle de la souche de référence Mebus.....	87
FIGURE 5a : Variations observées dans les séquences nucléotidiques des sous-unités S1 des gènes S de souches associées à la DH, la DNV ou des problèmes respiratoires.....	92
FIGURE 5b : Comparaison des séquences d'acides aminés de la sous-unité S1 de la glycoprotéine S d'isolats de BCV.....	105
FIGURE 6 : Amplification par la technique de la polymérase en chaîne (PCR) des régions ORF4 et ORF5 des souches de coronavirus hémagglutinants.....	113

FIGURE 7 : Variations observées dans les séquences nucléotidiques des régions codant pour les ORF4 et ORF5 de souches associées à la DNV, la DH ou à des problèmes respiratoires.....	117
FIGURE 8a : Comparaison des séquences d'acides aminés de la région de l'ORF4 codant pour une protéine de 4.9 kDa de souches associées à la DH, la DNV ou à des problèmes respiratoires....	125
FIGURE 8b : Comparaison des séquences d'acides aminés des produits de l'ORF de 4.8 (a), 12.7 (b) et 9.5 kDa (c) d'isolats de BCV associés à la DH, la DNV ou à des problèmes respiratoires.....	127
FIGURE 9 : Profil électrophorétique sur gel d'agarose du plasmide recombinant pAdCMV5/S1.DH sélectionné.....	132
FIGURE 10 : Immunofluorescence indirecte des cellules 293A transfectées avec le plasmide recombinant pAdCMV5/S1.DH.....	134
FIGURE 11 : Confirmation de la présence de la sous-unité S1 de la glycoprotéine S dans les cellules infectées par le pAdCMV5/S1.DH par immunobuvardage de type Western....	137
FIGURE 12 : Profil d'immunofluorescence indirecte des cellules 293A infectées par l'adénovirus recombinant AdCMV5/HE.DH.....	141
FIGURE 13 : Confirmation de la présence de la glycoprotéine HE dans les cellules infectées par l'AdCMV5/HE.DH par immunobuvardage de type Western.....	143

FIGURE 14 : Confirmation par immunobuvardage de type Western que les  
antisérums produits par les souris immunisées avec  
l'AdCMV5/HE.DH reconnaissent la glycoprotéine HE de  
BCQ.2590.....

148

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

293A	: cellules adhérentes dérivées de rein d'embryon humain
aa	: acide aminé
Ac	: anticorps
AcMo	: anticorps monoclonaux
Ad5	: adénovirus humain de sérotype 5
ADN	: acide désoxyribonucléique
ADNc	: ADN complémentaire
AE	: activité acétyl-estérase
ARN	: acide ribonucléique
ARNm	: ARN messenger
ATCC	: «American Type Culture Collection »
BCV	: coronavirus bovin
BRCV	: coronavirus respiratoire bovin
BSA	: albumine sérique bovine
CCV	: coronavirus canin
CIAP	: phosphatase alcaline intestinale de veau
CO <sub>2</sub>	: dioxyde de carbone
DICT <sub>50</sub>	: dose infectieuse produisant un ECP dans 50% des cultures cellulaires infectées
DEPC	: diéthyl pyrocarbonate
DH	: dysenterie d'hiver
DMEM	: milieu modifié de Dulbecco avec une base saline d'Eagle ("Dulbecco's Modified Eagle Medium")
dNTP	: 2'-déoxyribonucléoside 5'-triphosphates
DNV	: diarrhée néonatale des veaux
D.O.	: densité optique
E	: petite protéine de la membrane
ECP	: effet cytopathique
EDTA	: acide éthylènediamine tétraacétique
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbant Assay (épreuve immuno-enzymatique)
EM	: microscopie électronique
EtOH	: éthanol
GET	: virus de la gastroentérite transmissible des porcs
GFP	: gène rapporteur codant pour la "Green Fluorescent Protein"
FBK	: cellules de rein d'embryon bovin
FeCV	: coronavirus entérique félin
FIPV	: virus de la péritonite infectieuse féline
HA	: hémagglutination
HE	: glycoprotéine hémagglutinine-estérase
HEV	: coronavirus hémagglutinant de l'encéphalomyélite porcine
HCV-229E	: coronavirus respiratoire humain (souche 229E)
HCV-OC43	: coronavirus respiratoire humain (souche OC43)
HRT-18	: cellules d'un adénocarcinome intestinal humain

HRT-18G	: cellules d'un adénocarcinome intestinal humain (clone G)
I	: protéine I contenue dans le gène N
IBV	: virus de la bronchite infectieuse aviaire
ICTV	: Comité International pour la Taxonomie des Virus
IF	: immunofluorescence
IHA	: inhibition de l'hémagglutination
IFI	: IF indirecte
kb	: kilobase
kDa	: kilodaltons
LB	: milieu de culture Luria Bertani
M	: glycoprotéine de la membrane (de la matrice)
M	: molaire
MDBK	: cellules Madin-Darby de reins bovins
MHV	: virus de l'hépatite murine
min	: minute
N	: phosphoprotéine de la nucléocapside
NaAc	: acétate de sodium
nm	: nanomètre
ns	: non-structural (gène ou protéine)
nt	: nucléotide
ORF	: cadre de lecture ouvert
pb	: paire de bases
PBS	: solution saline phosphatée
PCR	: réaction de la polymérase en chaîne
p.i.	: post-infection
PM	: poids moléculaire
PNPA	: p-nitrophénylacétate
PRCV	: coronavirus respiratoire porcin
RDE	: activité destructrice de récepteurs
RER	: réticulum endoplasmique rugueux
RbCV	: coronavirus du lapin
RbEVC	: coronavirus entérique du lapin
rpm	: rotations par minute
RT	: transcriptase inverse
S	: glycoprotéine des péplomères (ou de surface)
SDAV	: virus de la sialodacryadénite des souris
SDS	: sodium dodécylsulfate
SDS-PAGE	: électrophorèse en gel d'acrylamide en présence de SDS
SFB	: Sérum fœtal bovin
SI	: séquence intergénique
SN	: séroneutralisation
TAE	: tris-acétate EDTA
TBS	: tampon Tris-NaCl
TCV	: coronavirus de l'entérite transmissible des dindes
Tris	: tris (hydroxyméthyl) amino-méthane
TP	: température de la pièce



U	: unité
uv	: ultra-violet
V	: volts
v/v	: Volume sur volume
VLP	: particules structurellement identiques (Virus-Like Particules)

## **Sommaire**

Le coronavirus bovin (BCV) est responsable de différentes pathologies entériques dont la diarrhée néonatale des veaux (DNV), la dysenterie d'hiver (DH) ou des diarrhées chroniques chez les bovins adultes. De plus, ce coronavirus peut également posséder un tropisme plutôt respiratoire et causer des pneumonies de nature interstitielle chez les veaux en croissance. Le coronavirus respiratoire bovin (BRCV) est restreint à ce type de pathologie. Le but de ce projet de maîtrise était d'étudier les différences génomiques et antigéniques parmi les différentes souches de BCV à tropisme entérique ou respiratoire.

Lors des épreuves d'hémagglutination, les isolats de DNV et de BRCV n'ont démontré aucune activité destructrice de récepteurs (RDE), alors que cette activité était élevée pour les cas de DH.

Afin d'élucider les différents profils d'activité biologique, les gènes codant pour la glycoprotéine d'enveloppe HE des souches de BRCV ont été amplifiés par RT-PCR. L'analyse de ces séquences comparativement à celles des gènes HE des souches de DH et de DNV a révélé que la majorité des substitutions nucléotidiques obtenues étaient silencieuses. Un seul changement d'acide aminé distinct a été retrouvé dans les séquences des gènes HE des isolats de BRCV.

De plus, les séquences de la glycoprotéine S1, responsable de l'attachement du virus à la cellule-cible, ont également été analysées afin d'expliquer les différences de tropisme entre ces isolats de BCV. Des différents changements d'acides aminés observés, six ont semblé être spécifiques aux isolats possédant un tropisme entérique et cinq ont été retrouvés seulement chez les isolats de BRCV.

Les séquences nucléotidiques de la région située entre les gènes S et M (ORF4 et ORF5), aussi identifiée comme étant impliquée dans le tropisme respiratoire ou entérique de certaines souches de coronavirus, ont été analysées. Tous les isolats de BRCV ont

présenté une mutation dans le gène codant pour une protéine de 4.9 kDa de l'ORF4 comparativement aux autres isolats de BCV. Ce changement provoque la terminaison prématurée de la protéine de 4.9 kDa pour tous les isolats de BRCV étudiés.

Les gènes des glycoprotéines d'enveloppe HE et S1 de la souche de DH québécoise BCQ.2590 ont été clonés dans le vecteur de transfert eucaryote pAdCMV5 et les glycoprotéines HE et S1 ont pu être exprimées de façon transitoire dans les cellules 293. La glycoprotéine S1 recombinante a conservé ses propriétés fusogènes. Ces gènes ont par la suite été introduits dans des adénovirus recombinants non-réplicatifs exprimant les glycoprotéines HE et S1 de façon constitutive dans les cellules 293 complétant pour la fonction de la région E1. Cette dernière région est délétée dans le vecteur de transfert servant au clonage des gènes dans ces adénovirus. Conséquemment, les cellules 293 permettent la réplication des virus recombinants défectifs pour la réplication.

Finalement, l'AdCMV5/HE.DH produit, de même que les plasmides recombinants contenant les gènes S1 et HE ont été inoculés à des souris afin d'étudier l'immunogénicité des protéines recombinantes. Seules les souris immunisées avec l'AdCMV5/HE .DH ont produit des titres en anticorps spécifiques au BCV et réagissant contre la glycoprotéine HE native de la souche homologue BCQ.2590 tel que démontré par immunobuvardage de type Western. Aussi, les titres d'immunofluorescence indirecte et d'ELISA indirecte après deux injections d'AdCMV5/HE.DH données à deux semaines d'intervalle étaient respectivement de 160 et 3,8 pour le groupe de souris Balb/C et de 80 et 3,8 pour les souris C3H. Des titres en inhibition de l'hémagglutination de 320 ont également pu être détectés chez ces groupes de souris 56 jours post-injection.

# **INTRODUCTION**

Les coronavirus sont des virus pathogènes répandus chez la majorité des espèces animales domestiques et chez l'homme. Tous les coronavirus possèdent au moins 4 protéines structurales : la glycoprotéine de surface (S) constituant les larges péplomères à la surface du virion, la glycoprotéine de la matrice (M), la phosphoprotéine de la nucléocapside (N) et la petite protéine de la membrane (E). Selon les analyses sérologiques, on distingue trois différents groupes antigéniques chez les coronavirus. Les virus appartenant au deuxième groupe antigénique possèdent une glycoprotéine additionnelle à leur surface, l'hémagglutinine-estérase (HE) formant de courtes projections granulaires. Les glycoprotéines d'enveloppe HE et S sont toutes deux capables d'hémagglutiner les érythrocytes et d'induire la production d'anticorps neutralisants.

Le coronavirus bovin (BCV) est un membre du deuxième groupe antigénique, tout comme le coronavirus hémagglutinant de l'encéphalomyélite porcine (HEV), le coronavirus respiratoire humain HCV-OC43, et le coronavirus de l'entérite transmissible des dindes (TCV).

Le BCV est responsable de différentes pathologies entériques telles la diarrhée néonatale du veau (DNV), la dysenterie d'hiver (DH) et les diarrhées chroniques chez les bovins adultes. De plus, BCV peut également infecter le système respiratoire supérieur des veaux en croissance et ainsi causer des pneumonies interstitielles. Le coronavirus respiratoire (BRCV) est restreint à cette dernière infection et est maintenant reconnu comme l'un des principaux agents étiologiques de la fièvre de transport des bovins.

Bien qu'un seul sérotype de BCV ait été identifié jusqu'à présent, des études ont montré que les souches québécoises associées à des épidémies de DH peuvent être différenciées de celles de la DNV par leurs profils d'hémagglutination à différentes températures, par inhibition de l'hémagglutination (IHA) et selon leur activité acétyl-

estérase (AE). De plus, les isolats de DH possèdent une activité destructrice de récepteurs (RDE) beaucoup plus élevée que celle des isolats associés à la DNV. La glycoprotéine HE est responsable des activités AE et RDE du BCV. Des différences situées dans le gène HE ont été observées antérieurement entre les séquences de souches de BCV virulentes et non-virulentes. Par exemple, la souche québécoise virulente BCV.2590 possède six substitutions d'acides aminés comparativement à la souche vaccinale de référence Mebus. Cependant, malgré les variations observées au niveau du gène HE, il n'a pas encore été déterminé si l'un ou plusieurs de ces changements étaient responsables des différentes pathologies cliniques rencontrées lors d'une infection par le BCV.

La glycoprotéine de surface S du BCV est responsable de l'attachement du virus sur la cellule-cible. Elle a donc un rôle important à jouer dans le tropisme tissulaire du virus. Il a déjà été démontré que le coronavirus respiratoire porcine (PRCV) diffère du coronavirus de la gastroentérite transmissible porcine (GET) par la présence d'une délétion dans le gène S et que cette délétion serait responsable du tropisme tissulaire distinct et de la pathogénicité de ces deux souches virales.

De plus, des études suggèrent que la région située entre les gènes S et M (ORF4 et ORF5) est également impliquée dans le tropisme du virus. L'ORF4 code pour des protéines non-structurales de 4.9 kDa et 4.8 kDa, alors que l'ORF5 code pour une protéine non-structurale de 12.7 kDa et pour une protéine structurale de 9.5 kDa (E). Les souches respiratoires de certains coronavirus comme HCV-OC43 et HEV possèdent seulement deux cadres de lecture ouverts dans la région ORF4/ORF5 alors que la souche de référence Mebus du BCV en compte quatre. Les souches respiratoires semblent donc avoir d'importantes délétions dans la région ORF4 et certains auteurs ont d'ailleurs postulé que le fait de posséder deux cadres de lectures en moins pour les souches respiratoires aurait un rôle à jouer dans le changement de tropisme.

Dans le cadre de ce projet de recherche, différents objectifs avaient été ciblés. Le premier objectif était de séquencer les gènes HE et S1, ainsi que les régions ORF4 et ORF5 d'isolats de BCV associés à la DH, la DNV ou des problèmes respiratoires. Notre hypothèse était que l'analyse de ces séquences pourrait permettre de différencier génomiquement les isolats et d'identifier, s'il-y-a lieu, des différences spécifiques aux isolats de DH, de DNV ou de BRCV. Puis, le deuxième objectif était de construire des adénovirus recombinants exprimant les protéines HE et S1 dans leurs conformations natives afin d'élucider les différences observées au niveau des propriétés biologiques et génomiques. Le dernier objectif consistait à démontrer si les glycoprotéines HE et S1 exprimées dans des cellules infectées par des adénovirus recombinants avaient conservé l'immunogénicité initiale et si la réponse humorale induite serait dirigée davantage contre la souche homologue que la souche de référence Mebus.



# **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## 2.0 CORONAVIRUS

### 2.1 GÉNÉRALITÉS

#### 2.1.1 HISTORIQUE

Le premier coronavirus a été isolé chez le poulet en 1937 par Beaudette et Hudson. Quelques années plus tard, l'agent pathogène responsable de l'hépatite murine (MHV-JHM) a été identifié aux États-Unis (Cheever *et al.*, 1949) et à Londres (Gledhill et Andrewes, 1951). Puis, Tyrrell et Bynoe (1965) ont utilisé des cultures de trachées embryonnaires humaines pour propager le premier coronavirus humain *in vitro*. La famille des *Coronaviridae* ainsi que le genre *Coronavirus* ont ensuite été définis (Almeida et Tyrrell, 1967; McIntosh *et al.*, 1967). Depuis ce temps, le nombre d'espèces de coronavirus et leur importance sont considérables causant différentes pathologies retrouvées chez les humains, les bovins, les porcs, les chats, les chiens, les rats, les souris, les dindes et les poulets.

#### 2.1.2 CLASSIFICATION

En 1997, le Comité International pour la Taxonomie des Virus (ICTV) a proposé la création d'un nouvel ordre, celui des *Nidovirales*, pour y regrouper les virus des genres Coronavirus, Torovirus et Artérovirus. Bien que ces virus soient très différents du point de vue de leurs propriétés morphologiques, physico-chimiques et biologiques, ils possèdent un génome dont l'organisation et le mode de réplication sont très similaires. En effet, dans tous les cas, le génome consiste en une molécule d'acide ribonucléique (ARN) de polarité positive, monocaténaire et linéaire, qui dans les phases précoces du cycle de réplication est transcrite en un intermédiaire réplcatif de polarité négative

servant de matrice pour la synthèse d'un réseau d'ARN messagers (ARNm) sous-génomiques partageant leurs extrémités 3' (van Marle *et al.*, 1995; de Vries *et al.*, 1997). Les gènes codant pour les protéines non-structurales ou enzymes associées aux fonctions de la réplication se retrouvent au niveau de l'extrémité 5' terminale et occupent près des deux tiers du génome, tandis que les gènes structuraux qui ne représentent qu'un tiers du génome se retrouvent au niveau de l'extrémité 3' terminale.

Les virus de ce nouvel ordre ont été regroupés en deux familles, *Arteriviridae* et *Coronaviridae*, cette dernière comprenant deux genres, soient les Coronavirus et les Torovirus (Cavanagh *et al.*, 1997; de Vries *et al.*, 1997)

### 2.1.3 DIFFÉRENTIATION ANTIGÉNIQUE

Les différentes espèces de coronavirus ont été séparées en trois sous-groupes antigéniques distincts (Tableau 1) sur la base des résultats d'analyse des réactions croisées selon différents tests sérologiques (Pederson *et al.*, 1978; Horzinek *et al.*, 1982; Dea *et al.*, 1990; Spaan *et al.*, 1990). Parmi les tests sérologiques utilisés, on retrouve les tests d'inhibition de l'hémagglutination (IHA), de séroneutralisation (SN), d'immunofluorescence (IF) et d'ELISA. L'épreuve d'hybridation avec une sonde reconnaissant le gène codant pour la protéine de la nucléocapside a été rapportée pour l'étude des relations génomiques (Schockley *et al.*, 1987; Verbeek *et al.*, 1991). Le coronavirus bovin (BCV), le coronavirus hémagglutinant de l'encéphalomyélite porcine (HEV), le coronavirus respiratoire humain (HCV-OC43), de même que le coronavirus de l'entérite transmissible des dindes (TCV) appartiennent tous au second groupe antigénique et possèdent une glycoprotéine structurale additionnelle correspondant à l'hémagglutinine-estérase (HE) (Hogue *et al.*, 1984; Dea *et al.*, 1990). Ces coronavirus hémagglutinants partagent des déterminants antigéniques localisés sur chacune de leurs protéines structurales tel que démontré par les analyses d'immunobavardage de type

**TABLEAU 1: Groupes antigéniques des coronavirus et leurs hôtes naturels**

---

Groupe antigénique	Virus	Hôte
I	HCV-229E	Humain
	GET	Porc
	CCV	Chien
	FeCV	Chat
	FIPV	Chat
	RbCV	Lapin
II	HCV-OC43	Humain
	MHV	Souris
	BCV	Bovin
	HEV	Porc
	TCV	Dinde
	SDAV	Rat
	RbEVC	Lapin
III	IBV	Poulet

---

Les coronavirus sont classés dans trois groupes antigéniques distincts selon les résultats d'analyses de réactions croisées observées notamment par les épreuves d'immunofluorescence indirecte, d'ELISA, d'immunobavardage et d'immunomicroscopie électronique (Pedersen *et al.*, 1978; Schockley *et al.*, 1987; Dea et Tijssen, 1989a). HCV-229E, coronavirus respiratoire humain (souche 229E); GET, virus de la gastro-entérite transmissible des porcs; CCV, coronavirus canin; FeCV, coronavirus entérique félin; FIPV, virus de la péritonite infectieuse féline; RbCV, coronavirus du lapin; HCV-OC43, coronavirus respiratoire humain (souche OC43); MHV, virus de l'hépatite murine; BCV, coronavirus entérique bovin; HEV, virus hémagglutinant de l'encéphalomyélite porcine; TCV, coronavirus entérique de la dinde; SDAV, virus de la sialodacryadénite des souris; RbEVC, coronavirus entérique du lapin; IBV, virus de la bronchite infectieuse aviaire.

Adapté de Holmes et Lai, 1996.

Western et d'immunoprécipitation (Vautherot *et al.*, 1990; Dea *et al.*, 1990). De plus, les coronavirus hémagglutinants BCV et TCV partagent des déterminants antigéniques impliqués dans la neutralisation et l'inhibition de l'hémagglutination (Dea *et al.*, 1989c)

## **2.2 STRUCTURE DES CORONAVIRUS**

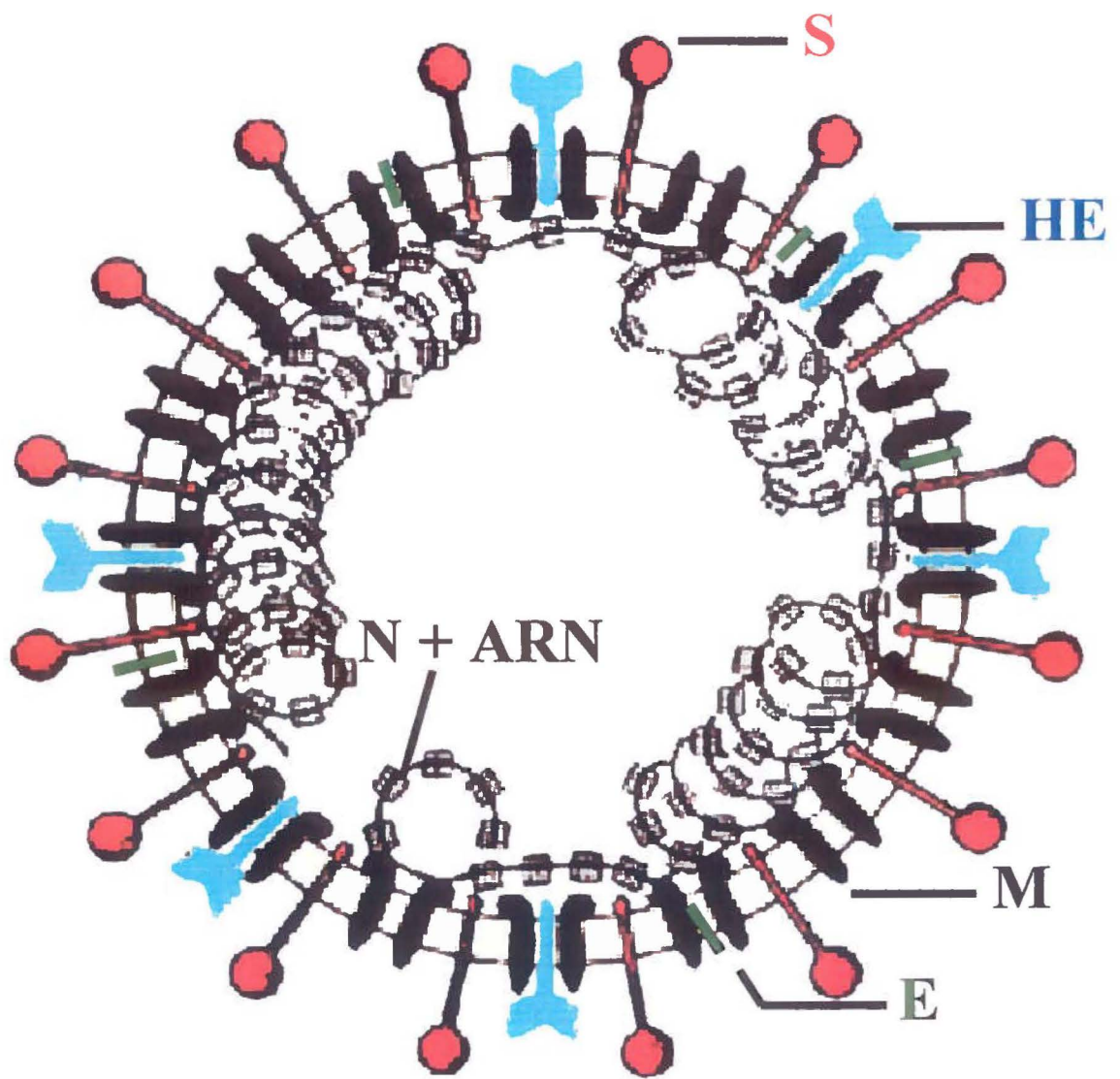
### **2.2.1 MORPHOLOGIE**

Les coronavirus sont des particules pléomorphes, de forme plutôt sphérique, possédant un diamètre variant de 120 à 160 nanomètres (nm) (Figure 1). Le virion est enveloppé d'une double couche lipidique. Tous les coronavirus sont caractérisés par la présence d'une frange de péplomères d'environ 10 à 20 nm de longueur, largement espacés et ancrés dans la membrane, formant des projections se terminant en renflement à la surface du virion (Sturman et Holmes, 1983). Certains coronavirus du groupe antigénique II (Tableau 1) portent également à leur surface des projections plutôt granulaires correspondant à la glycoprotéine hémagglutinine-estérase (HE) (Callebaut et Pensaert, 1980; King et Brian, 1982; Hogue *et al.*, 1984; King *et al.*, 1985; Hogue et Brian, 1986; Deregt *et al.*, 1987; Dea et Tijssen, 1988; Dea *et al.*, 1989b). Trois autres protéines structurales sont présentes dans l'enveloppe de tous les coronavirus : la glycoprotéine de la membrane (M), la glycoprotéine de surface (S) et la petite protéine de la membrane (E). Finalement, la nucléocapside, de symétrie hélicoïdale, est composée de la phosphoprotéine (N) associée à l'ARN génomique viral (Spaan *et al.*, 1988; Cavanagh *et al.*, 1994; Holmes et Lai, 1996).

Figure 1: Représentation schématique d'un coronavirus hémagglutinant (sous-groupe II)

- N : Phosphoprotéine de la nucléocapside associée à l'ARN viral
- S : Glycoprotéine des péplomères
- M : Glycoprotéine de la membrane
- HE : Glycoprotéine hémagglutinine-estérase
- E : Petite protéine de la membrane

Adapté de Holmes et Lai, 1996.



### 2.2.2 PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

La densité de flottaison des virions sur gradient de saccharose se situe entre 1.15 et 1.19 g/cm<sup>3</sup> (Cavanagh *et al.*, 1994). Les coronavirus entériques conservent leur infectivité pendant plusieurs mois à -20°C et à des valeurs de pH variant de 3.0 à 11.0. Toutefois, les coronavirus respiratoires sont plus sensibles et un pH de 5.0 à 6.0 est optimal (Sturman et Holmes, 1983; Cavanagh *et al.*, 1994). Les solvants lipidiques, la formaldéhyde et les détergents non-ioniques détruisent l'enveloppe lipidique, le pouvoir infectieux de même que l'activité hémagglutinante des coronavirus (Spaan *et al.*, 1988; Dea *et al.*, 1989c; Cavanagh *et al.*, 1994).

### 2.2.3 GÉNOME VIRAL

Le génome des coronavirus est constitué d'une molécule d'ARN monocaténaire, non-segmenté et de polarité positive mesurant environ 30 kilobases (kb). Ainsi, l'ARN se comporte comme un ARNm et est infectieux aussitôt qu'il est transfecté dans une cellule susceptible (Lai, 1990). De plus, l'ARN sert également de matrice pour la traduction des protéines virales *in vitro* (Leibowitz *et al.*, 1982). Une coiffe est présente à l'extrémité 5' du génome et il est polyadénylé en 3'. L'ARN génomique s'associe à la nucléocapside formant une capsid de symétrie hélicoïdale.

Le génome est composé de six à sept régions qui contiennent chacune un ou plusieurs cadres de lectures ouverts (ORFs). Ces ORFs, codant pour des protéines structurales ou non structurales, sont séparés par des séquences intergéniques (SI) contenant des signaux qui guident la transcription des ARNm sous-génomiques (Spaan *et al.*, 1990). Durant la réplication du virus, un réseau d'ARNm sous-génomiques se



chevauchant en leur extrémité 3'est produit (Figure 2). Cependant, seul l'ORF situé en 5' est habituellement traduit (Rottier *et al.*, 1981).

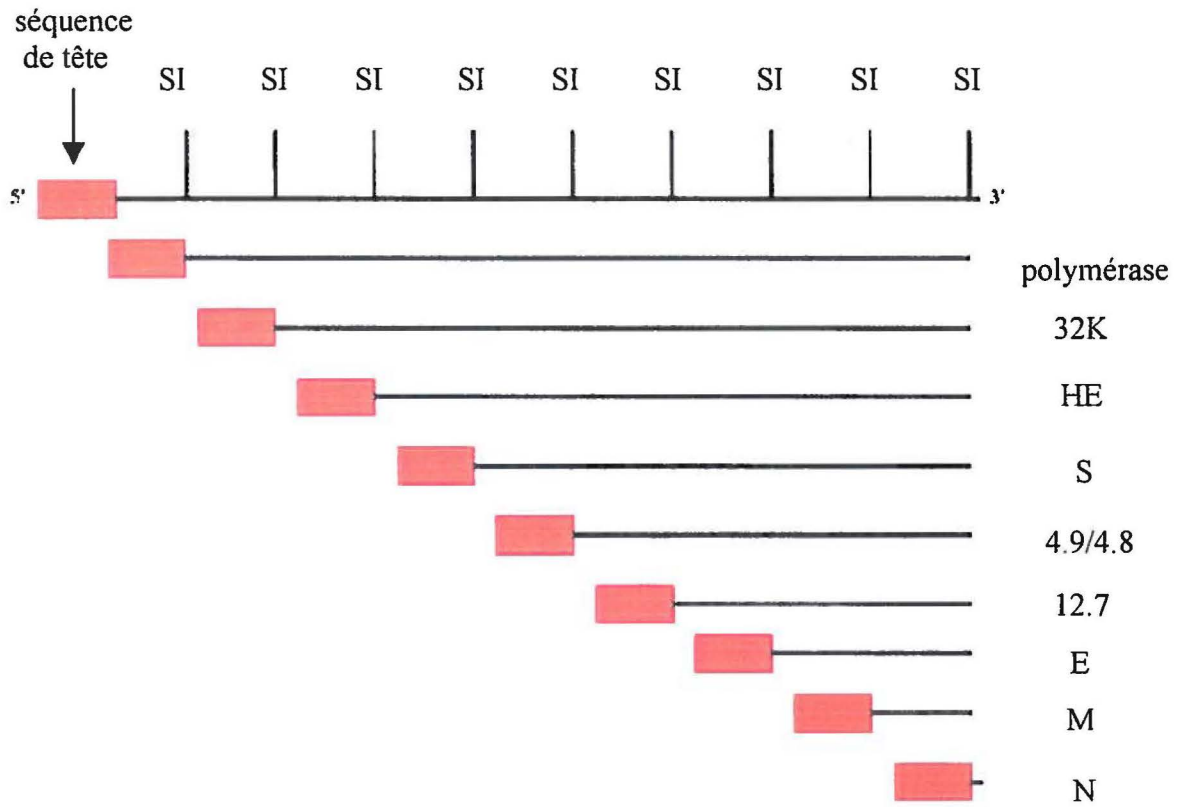
Le génome contient une séquence de tête en son extrémité 5' et les 20 premiers kilobases, soit les deux tiers du génome, forment les ORF1a et ORF1b codant pour des protéines impliquées dans la réplication de l'ARN viral (Bournsnell *et al.*, 1987; Spaan *et al.*, 1988; Pachuk *et al.*, 1989; Lai, 1990; Lee *et al.*, 1991). Il existe un pseudo-nœud et une séquence de sept nucléotides essentiels pour le changement du cadre de lecture effectué par les ribosomes dans la région de chevauchement entre 1a et 1b (Brierley *et al.*, 1987) Le reste du génome code pour des protéines structurales et non-structurales. Les coronavirus possèdent au moins quatre protéines structurales : la glycoprotéine des péplomères (S), la petite protéine membranaire (E), la glycoprotéine de la matrice (M) et la phosphoprotéine de la nucléocapside (N), codées respectivement par les ORF 3, 5, 6 et 7 (Siddell, 1983; Spaan *et al.*, 1988). Quelques coronavirus possèdent une protéine structurale additionnelle, l'hémagglutinine-estérase (HE) formant des projections granulaires situées à la base des péplomères et codée par l'ORF 2 (Siddell, 1983; Abraham *et al.*, 1990; Hogue *et al.*, 1989).

## 2.2.4 PROTÉINES STRUCTURALES

### 2.2.4.1 Protéine de la nucléocapside (N)

La protéine de la nucléocapside est la protéine virale la plus abondante présente dans les cellules infectées par un coronavirus et ce, durant tous les stages d'infection. Elle peut être détectée de 3 à 5 heures suivant l'infection et sa synthèse est maintenue pendant tout le cycle viral (Holmes *et al.*, 1981; Rottier *et al.*, 1981; Niemann *et al.*, 1982; Stohlman *et al.*, 1983; Talbot *et al.*, 1984). La masse moléculaire de N varie entre 50 et 60 kilodaltons (kDa) (Cavanagh *et al.*, 1994) . Elle est synthétisée au niveau des

Figure 2 : Représentation schématique du réseau d'ARNm sous-génomiques produits lors de la réplication des coronavirus



SI : Séquences intergéniques UCUAAAC

: Extrémité 5' du cadre de lecture traduite

Adapté de Cavanagh, 1997.

ribosomes libres dans le cytoplasme puis rapidement phosphorylée au niveau des résidus sérine par une protéine kinase présente dans les cellules infectées (Niemann *et al.*, 1982; Holmes et Lai, 1996). La protéine N se lie ensuite à l'ARN génomique pour former une capsid flexible de symétrie hélicoïdale (Sturman et Holmes, 1977; Laude et Masters, 1995). Plus spécifiquement, il y aurait une interaction entre la N et une séquence d'une dizaine de nucléotides présente dans la région 5' de l'ARN du virion (Stohlman *et al.*, 1988). Chez les virus possédant la glycoprotéine HE (qu'elle soit fonctionnelle ou non), le gène codant pour la N est bicistronique (Verbeek et Tijssen, 1991). Une protéine hydrophobe d'environ 23 kDa (I) est entièrement contenue dans le gène N (Senanayake *et al.*, 1992).

Les analyses de séquences indiquent un faible degré d'homologie entre les gènes N des coronavirus des différents sérogroupes antigéniques. Par exemple, la nucléocapside du BCV ne possède que 29% d'homologie de séquence avec la N du GET ou celle de l'IBV, tandis que ce pourcentage s'élève à 70% pour la N de MHV appartenant au même groupe antigénique (Lapps *et al.*, 1987b). Cependant, une région de 50 acides aminés située à l'extrémité N-terminale présente un taux élevé d'identité de séquences. Il a été suggéré que cette région, conservée parmi tous les coronavirus, soit responsable d'un rôle commun tel la stabilisation du lien entre la nucléocapside et l'ARN (Ollis et White, 1987; Laude et Masters, 1995).

#### **2.2.4.2 Protéine de la Matrice (M)**

La protéine de la matrice est une glycoprotéine transmembranaire possédant une masse moléculaire se situant entre 20 et 38 kDa (Cavanagh *et al.*, 1994; Rottier, 1995). La grande variabilité de la masse moléculaire de M s'explique par la présence, d'une espèce de coronavirus à l'autre, de différents états de glycosylation et par des différences dans le nombre de résidus d'acides aminés (Spaan *et al.*, 1988). La protéine M représente, à elle seule, près de 40% du contenu protéique du virion. Son profil

électrophorétique sur gel de SDS-polyacrylamide démontre la présence de deux à trois petits polypeptides ayant des poids moléculaires rapprochés (Lapps *et al.*, 1987a, 1987 b; Deregt *et al.*, 1987; Dea *et al.*, 1989a, b, c, et d), un précurseur de 20 kDa non-glycosylé étant incorporé dans le virion. La protéine de la matrice est synthétisée au niveau des polysomes associés à la membrane du réticulum endoplasmique rugueux (RER) et elle est probablement insérée dans la membrane par un polypeptide signal (Niemann *et al.*, 1982; Holmes et Lai, 1996).

La glycoprotéine M traverse la couche bilipidique des particules virales à au moins trois reprises via ses trois domaines hydrophobes se présentant sous forme d'hélice alpha, à l'exception d'environ 10% du domaine N-terminal qui se retrouve à la surface externe de la membrane virale. La partie C-terminale, située dans la membrane, permet la liaison avec la nucléocapside (Armstrong *et al.*, 1984; Rottier *et al.*, 1986; Spaan *et al.*, 1988; Rottier, 1995).

La protéine de la membrane joue un rôle clé dans le processus de bourgeonnement des coronavirus (Dubois-Dalcq *et al.*, 1982; Tooze *et al.*, 1984). Premièrement, lorsque les coronavirus croissent en présence de tunicamycine, il y a formation de virions non-infectieux ne possédant pas de péplomères (Holmes *et al.*, 1981; Rottier *et al.*, 1981; Dea *et al.*, 1989a; Mounir et Talbot, 1992). Puisque les particules virales assemblées en présence de cet inhibiteur de la glycosylation sont dépourvues des protéines S et HE, la M semble donc la seule glycoprotéine d'enveloppe nécessaire au bourgeonnement viral. De plus, il existe une corrélation entre la localisation périnucléaire de la glycoprotéine M et les sites de bourgeonnement de nouvelles particules virales (Dubois-Dalcq *et al.*, 1982; Rottier, 1995). Étant donné qu'il y a accumulation de la M au niveau de l'appareil de Golgi, et que cette protéine soit absente de la membrane plasmidique, les coronavirus bourgeonnent intracellulairement plutôt qu'à partir de la membrane plasmidique. Cependant, la glycolysation de la matrice n'est pas essentielle pour le bourgeonnement (Niemann *et al.*, 1982; Laude *et al.*, 1992). Il existe deux différents procédés de

glycosylation de la protéine M selon les coronavirus. Pour les précurseurs intracellulaires des virus IBV, GET et TCV, les oligosaccharides provenant d'un intermédiaire dolichol-phosphate se lient aux résidus d'asparagine par un lien glycosydique de type « N » (Deregt *et al.*, 1987; Dea et Tijssen, 1988). Ce mécanisme de glycosylation est sensible à la tunicamycine (Rottier *et al.*, 1981). Tandis que pour les virus MHV et BCV, les oligosaccharides s'attachent aux résidus sérine et thréonine de l'extrémité N-terminale de la protéine par un lien glycosydique de type « O ». Ce dernier mécanisme de glycosylation est sensible au monensin de sodium, un inhibiteur de l'appareil de Golgi (Gebhart et Ruddon, 1986). L'utilisation de tunicamycine (Stern et Sefton, 1982) et de monensin de sodium (Niemann *et al.*, 1982), des inhibiteurs de la N-glycosylation et de la O-glycosylation respectivement, a démontré que le bourgeonnement des particules virales s'effectue même lorsque la protéine M est non-glycosylée.

Une autre des fonctions importantes de la protéine M est de favoriser l'incorporation de la protéine S des péplomères dans l'enveloppe virale. Récemment, une équipe de chercheurs a étudié les interactions entre les protéines S et M du MHV (De Haan *et al.*, 1999). Dans les cellules infectées, les deux protéines se localisent au niveau des mêmes compartiments, alors que lorsqu'elles sont exprimées individuellement, elles se retrouvent dans des compartiments différents. Les gènes codant pour les protéines S et M ont été exprimés dans le bactériophage T7 et les interactions démontrées par immunoprécipitation et par immunofluorescence après la co-expression des deux gènes. Les interactions entre la M et la S se produisent au niveau des domaines transmembranaires et amphipathiques. La délétion des deux premiers ou deux derniers domaines transmembranaires a conduit à une baisse importante du nombre de complexes M-S produits.

Les analyses de séquences révèlent 86% d'identité entre la M de BCV et celle de MHV (Spaan *et al.*, 1988), et plus de 95% entre la M de BCV et celle de HCV-OC43 (Mounir et Talbot, 1992) tous des virus du groupe antigénique II. Par contre, les taux

d'identité chutent sensiblement lorsque les séquences de leur protéine M sont comparées à celles d'autres groupes de coronavirus.

Finalement, malgré le fait que la S est généralement considérée comme la protéine la plus immunogène, il a été démontré, à l'aide du virus MHV, que des anticorps spécifiques au domaine externe de la protéine M peuvent neutraliser le virus. Cependant, le complément doit absolument être présent pour que ces anticorps monoclonaux (AcMo) soient neutralisants (Collins *et al.*, 1982; Lecomte *et al.*, 1987; Fleming *et al.*, 1989).

#### 2.2.4.3 Glycoprotéine des péplomères (S)

La glycoprotéine des péplomères possède une masse moléculaire de 160 à 220 kDa et confère au virus sa morphologie caractéristique (Sturman et Holmes, 1983). Les péplomères, formant la couronne typique des coronavirus, proviendraient d'un agencement trimérique ou tétramérique de la protéine S (Delmas et Laude, 1990).

La glycoprotéine S est responsable de l'activité fusogène du virus (Storz *et al.*, 1981; Sturman *et al.*, 1985) et de l'attachement du virus aux récepteurs cellulaires (Collins *et al.*, 1982; Williams *et al.*, 1990). Ainsi, à l'aide d'AcMo produits contre la glycoprotéine S, il est possible de neutraliser une infection de coronavirus et d'inhiber la fusion entre les membranes du virus et celle de la cellule-cible (Holmes et Lai, 1996). La glycoprotéine S est également responsable de l'induction et de la production d'anticorps (Ac) protecteurs et neutralisants (Collins *et al.*, 1982; Deregt et Babiuk, 1987; Gilmore *et al.*, 1987; Vautherot *et al.*, 1990; Hussain *et al.*, 1991; Vautherot *et al.*, 1992b; Michaud et Dea, 1993; Cavanagh, 1995). Elle possède aussi la capacité d'hémagglutiner les érythrocytes de rats (Schultze *et al.*, 1991a).

La glycoprotéine S de quelques coronavirus possède un site de clivage protéolytique (Sturman *et al.*, 1985). Chez les coronavirus IBV (Cavanagh et Davis, 1987), MHV et BCV (Deregt *et al.*, 1987; Dea *et al.*, 1989a; Abraham *et al.*, 1990), de la GET (Rasschaert et Laude, 1987), FIPV (de Groot *et al.*, 1987a) et HCV-OC43 (Mounir et Talbot, 1993b), la S est clivée enzymatiquement par des protéases cellulaires en deux sous-unités, S1 et S2, d'environ 100 kDa. La partie S1 située au niveau de l'extrémité N-terminale forme la partie bulbeuse des péplomères, tandis que la portion C-terminale de la molécule forme la partie S2 représentant la tige ainsi que la région d'ancrage des péplomères à l'enveloppe. Cependant, le site de clivage à la trypsine est incomplet pour le virus de la GET et le FIPV; conséquemment, la S ne peut donc pas être scindée par les protéases cellulaires (Horzinek *et al.*, 1982). Pour le HCV-OC43, seulement quelques péplomères sont clivés (Hogue et Brian, 1986). Le clivage dépend toutefois de l'isolat viral et du type de cellules utilisées (Sturman *et al.*, 1985) et ce clivage peut être réalisé *in vitro* en présence de trypsine (Cavanagh *et al.*, 1986a; Dea *et al.*, 1989a).

La glycosylation de la S est de type N (Holmes *et al.* 1981; Niemann *et al.*, 1982; Deregt et Babiuk, 1987; Spaan *et al.*, 1988). La protéine S des coronavirus est très glycosylée, le nombre potentiel de sites de glycosylation variant de 21 (MHV) à 35 (FIPV) (Luytjes *et al.*, 1987; de Groot *et al.*, 1987a).

Il existe une diversité très importante entre les sous-unités S1 des gènes S de différents coronavirus tant au niveau du nombre d'acides aminés que des séquences de nucléotides et on dénombre même des variations entre différentes souches d'un même virus. La diversité au niveau de la sous-unité S1 résulte probablement de mutations et de recombinaisons entre divers coronavirus. La partie N-terminale de la S1 a été associée avec les plus importantes différences antigéniques existant entre les espèces de coronavirus (Rekik et Dea, 1994; Cavanagh, 1995). Cela peut être expliqué par le fait que l'extrémité 5' code pour des régions reliées au tropisme de la cellule hôte et à l'induction de la réponse immune (Cavanagh, 1995). La partie C-terminale de la glycoprotéine S (S2)

semble être moins variable (Schmidt *et al.*, 1987, de Groot *et al.*, 1987b; Rasschaert et Laude, 1987). Toutefois, un déterminant antigénique a été identifié dans la partie N-terminale de la sous-unité S2 comme étant immunodominant (Vautherot *et al.*, 1992b). La S de BCV et HCV-OC43 est tout de même très semblable avec près de 91% d'identité. De même, un isolat de BCV associé à des désordres respiratoires montre 98 % d'identité en acides aminés avec un isolat de BCV entérique (Zhang *et al.*, 1994a).

Selon différentes études portant sur la structure moléculaire, il semble que des altérations au niveau de la S peuvent provoquer un changement dans la pathogénicité (Fleming *et al.*, 1987; Zhang *et al.*, 1991a; Rekik et Dea, 1994). En effet, dans le cas des virus MHV, une variation de la pathogénicité virale a été démontrée pour des souches mutantes échappant à la neutralisation par des AcMo spécifiques contre la S1 (Fleming *et al.*, 1986; Dalziel *et al.*, 1986; Fleming *et al.*, 1987; Yoo *et al.*, 1991). Par ailleurs, le coronavirus respiratoire porcin (PRCV), est un variant du virus de la GET dont la portion S1 de la glycoprotéine des péplomères a été délétée d'une région de 224 aa de son extrémité N-terminale, ce qui a résulté en un changement du tropisme entérique à un tropisme respiratoire (Pensaert *et al.*, 1986; Enjuanes *et al.*, 1993; Ballesteros *et al.*, 1995). Il a même été démontré qu'un changement de seulement deux acides aminés dans le gène S résultent en une variation dans le tropisme du virus de la GET (Ballesteros *et al.*, 1997).

La glycoprotéine S représente une cible majeure pour les Ac et des tests d'ELISA de compétition utilisant des AcMo contre la S ont permis de localiser les déterminants antigéniques de la glycoprotéine S des différents coronavirus. Il a été démontré qu'autant la sous-unité S1 que la sous-unité S2 de la glycoprotéine S peuvent induire la production d'Ac neutralisants (Laude *et al.*, 1986; Deregt et Babiuk, 1987; Vautherot *et al.*, 1992a). Pour les coronavirus murins, au moins quatre sites antigéniques (A, B, C et D), pour un total de six épitopes ont été identifiés sur la glycoprotéine S (Talbot *et al.*, 1984; Wege *et al.*, 1984; Talbot et Buchmeier, 1985). Les épitopes formés par la sous-unité S1 sont ceux qui induisent les Ac neutralisants les plus forts. De plus, l'absence de réactivité des AcMo



suite à la dénaturation des préparations virales par des détergents anioniques indiquent que deux sites antigéniques sont de nature conformationnelle. La structure antigénique de la glycoprotéine S du BCV est semblable à celle du MHV. Ainsi, quatre domaines antigéniques indépendants (A, B, C, D) sont également présents sur la S du virus BCV (Vautherot *et al.*, 1992a). Les domaines antigéniques A et B sont situés sur la sous-unité S1 et induisent la formation d'Ac hautement neutralisants (Deregt et Babiuk, 1987; Michaud et Dea, 1993). De neuf à onze épitopes, regroupés dans quatre domaines antigéniques majeurs ont été identifiés sur l'extrémité N-terminale de la glycoprotéine S du virus de la GET des porcs (Delmas *et al.*, 1986; Laude *et al.*, 1986). Pour le coronavirus IBV, six sites antigéniques sont présents sur la sous-unité S1 et deux sites sur la sous-unité S2 (Koch *et al.*, 1990).

#### **2.2.4.4 L'hémagglutinine- estérase (HE)**

Certains coronavirus possèdent une protéine structurale d'enveloppe additionnelle : l'hémagglutinine-estérase. La HE forme de courtes projections granulaires situées à la base du virion, créant une double frange visible au microscope électronique (Bridger *et al.*, 1978; Sugiyama et Amano, 1981; King et Brian, 1982; King *et al.*, 1985 ; Dea et Garzon, 1991). Les premiers indices de la possibilité qu'une quatrième protéine structurale soit présente dans le cas des coronavirus ayant une capacité d'hémagglutination élevée remontent en 1980 (Callebaut et Pensaert). Comme mentionné auparavant, la protéine des péplomères possède aussi la capacité d'hémagglutination, ce qui a été démontré dans le cas des coronavirus ne possédant qu'une frange de péplomères, comme les virus IBV et de la GET (Cavanagh *et al.*, 1986b; Noda *et al.*, 1988), aussi bien que pour les virus BCV et HCV-OC43 possédant les deux franges de péplomères (Schultze *et al.*, 1991a). Cependant, des études effectuées sur les BCV (King et Brian; 1982; King *et al.*, 1985) et TCV (Dea et Tijssen, 1989a) en présence de bromelain ont montré que même si la protéine S est absente, l'activité hémagglutinante du virus est toujours présente. Cette activité hémagglutinante a alors été attribuée à la présence d'une

quatrième protéine structurale de 140 kDa retrouvée chez les coronavirus du groupe antigénique II (Callebaut et Pensaert, 1980; King et Brian, 1982; King *et al.*, 1985), à l'exception de la souche A59 du virus MHV (Luytjes *et al.*, 1988). Ces virus possèdent une forte capacité d'héماغglutination en comparaison avec les coronavirus des groupes antigéniques I et III (Dea et Tijssen, 1989b; Brian *et al.*, 1995). En plus de la capacité d'héماغglutiner les érythrocytes de différentes espèces animales (Vlasak *et al.*, 1988a, b; Schulze *et al.*, 1991b), la glycoprotéine HE possède des activités enzymatiques comme l'activité acétyl-estérase (AE) et destructrice de récepteurs (RDE) (Vlasak *et al.*, 1988a; Parker *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 1991b; Schultze *et al.*, 1991b). De plus, la HE induit la production d'anticorps neutralisants (Vautherot *et al.*, 1984).

La HE est d'abord synthétisée sous la forme d'une apoprotéine monomérique d'environ 42 kDa qui est ensuite N- glycosylée donnant une protéine finale d'environ 62 à 65 kDa se retrouvant à la surface du virion sous la forme de dimères de 130 à 140 kDa. Ces homodimères sont formés par l'intermédiaire de ponts disulfure (Deregt *et al.*, 1987; Dea *et al.*, 1989b; Hogue *et al.*, 1989; Kienzle *et al.*, 1990). Le gène HE du BCV contient deux ORFs qui ne se chevauchent pas et ont la capacité de coder pour deux protéines de 136 et 83 aa, respectivement. Cependant, il n'a pas encore été démontré si ces protéines sont exprimées au cours de l'infection par le BCV (Brian *et al.*, 1995). Le domaine N-terminal de la HE contient huit sites potentiels de N-glycosylation et est exposé à la surface du virion tandis que l'extrémité C-terminale est ancrée dans la membrane lipidique (Brian *et al.*, 1995). La glycoprotéine HE du BCV compte 424 aa et deux domaines hydrophobes (Kienzle *et al.*, 1990; Parker *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1991b; Dea *et al.*, 1995). Le premier domaine est situé dans la région du peptide signal alors que le second agit comme ancrage pour la HE dans la membrane (Kienzle *et al.*, 1990; Parker *et al.*, 1990).

Malgré le fait que la protéine S est reconnue comme étant la protéine d'attachement qui est principalement responsable du tropisme cellulaire, la HE pourrait

avoir un rôle comme protéine d'attachement additionnelle pour les BCV, HEV et HCV-OC43 et même possiblement initier l'infection en compagnie de la protéine S (Vlasak *et al.*, 1988a; Kienzle *et al.*, 1990). Les glycoprotéines S et HE du BCV reconnaissent toutes deux les résidus d'acide sialique 9-O-acétylé sur les érythrocytes (Schultze *et al.*, 1991a; Storz *et al.*, 1991; Schultze et Herrler, 1992; Kunkel et Herrler, 1993). Les deux protéines se lient donc au même récepteur pour débiter l'infection virale, mais différent tant qu'à leur affinité de liaison (Brian *et al.*, 1995). Par exemple, les deux protéines sont capables d'hémagglutiner les érythrocytes de souris et de rats toutefois, seule la glycoprotéine S peut agglutiner les érythrocytes de poulets (Schultze *et al.*, 1991a, b). Ainsi, la glycoprotéine S semble posséder une habilité de liaison plus forte puisque les cellules de poulets ont moins de molécules d'acide sialique à leur surface (Schultze *et al.*, 1991a, b).

Curieusement, le premier gène HE séquencé fut celui du MHV-A59, un virus non hémagglutinant contenant la séquence génétique de la protéine HE, mais aucun codon d'initiation pour traduire l'ORF (Luytjes *et al.*, 1988). La séquence d'acides aminés de la HE du MHV-A59 présente une séquence F-G-D-S identique au site actif d'acétyl-estérase inclut dans la HE de l'influenza C (Luytjes *et al.*, 1988). L'activité acétyl-estérase associée à la HE des coronavirus a tout d'abord été démontré pour le BCV (Vlasak *et al.*, 1988a). L'hémagglutinine a alors été renommée protéine de l'hémagglutinine-estérase. Cette enzyme est capable d'inactiver les récepteurs de BCV à la surface des cellules susceptibles en hydrolysant un lien ester pour ainsi relâcher le résidu acétate situé en C9 de l'acide sialique (Vlasak *et al.*, 1988a; Schultze *et al.*, 1991a). Cette action, nommée activité destructrice de récepteurs, semble requise pour le relâchement des particules virales et pour faciliter l'entrée du virus dans la cellule en inactivant les résidus qui agissent comme faux récepteurs (Vlasak *et al.*, 1987; Vlasak *et al.*, 1988a; Vlasak *et al.*, 1988b; Herrler *et al.*, 1988; Brian *et al.*, 1995). Par contre, il a été démontré, à l'aide de la souche JHM du virus MHV ayant des niveaux d'activité acétyl-estérase variables, que la glycoprotéine HE n'est pas nécessaire pour la réplication du virus dans les cellules permissives, mais qu'elle peut en affecter la pathogénicité (Yokomori *et al.*, 1995).

Les séquences du gène HE des virus MHV-A59 , BCV et HCV-OC43 (Luytjes *et al.*, 1988; Parker *et al.*, 1989b; Kienzle *et al.*, 1990 : Zhang *et al.*, 1992), de même que la séquence du gène homologue du virus de l'influenza type C (Nakada *et al.*, 1984) démontrent que les acides aminés et la position du site d'activité acétyl-estérase sont très conservés suggérant un origine commune dans l'évolution de ces deux protéines (Luytjes *et al.*, 1988). En raison des recombinaisons fréquentes des coronavirus, il est probable qu'il y ait eu recombinaison durant une co-infection avec le virus de l'influenza C d'où l'acquisition du gène HE dans le génome des coronavirus. (Luytjes *et al.*, 1988).

L'expression du gène cloné HE de BCV a permis de conclure que la protéine HE contient, à elle seule, toutes les informations nécessaires pour l'homodimérisation, les translocations d'un compartiment cellulaire à l'autre, l'ancrage au niveau des membranes des vésicules, le transport à la surface de la cellule comme une protéine membranaire intégrale, l'hémagglutination et l'activité acétyl-estérase (Kienzle *et al.*, 1990; Parker *et al.*, 1990; Yoo *et al.*, 1992).

#### **2.2.4.5 Petite protéine de la membrane (E)**

Cette petite protéine de la membrane est hydrophobe et possède une masse moléculaire variant de 9 à 12 kDa (Cavanagh *et al.*, 1994). Elle est incorporée dans l'enveloppe des virus GET, IBV et MHV (Liu et Inglis, 1991; Godet *et al.*, 1992; Yu *et al.*, 1994) et est codée par un gène présent chez plusieurs autres coronavirus (Holmes et Lai, 1996).

Le rôle potentiel de la protéine E dans l'infection virale est demeuré hypothétique jusqu'aux études de Vennema et collaborateurs en 1996. Ces derniers ont examiné l'assemblage de particules structurellement identiques (VLP) aux virions MHV lors de

l'expression intracellulaire des protéines. Ils ont démontré que les protéines M et E étaient toutes les deux absolument nécessaires, et même suffisantes pour la formation et le relâchement extracellulaire des VLP. La protéine M, exprimée seule, s'accumule dans le Golgi alors qu'en combinaison avec la protéine E, des particules semblables aux virions en forme et en grandeur sont assemblées.

En 1998, un coronavirus mutant délété du gène E a été construit ce qui a permis de démontrer que la protéine E du MHV est nécessaire pour que l'assemblage des virions s'effectue correctement (Fischer *et al.*, 1998). Un an plus tard, les protéines structurales du MHV ont été exprimés dans des virus de la vaccine recombinants (An *et al.*, 1999). Ces constructions ont permis de démontrer que l'expression de la protéine E du MHV induisait l'apoptose dans des cellules DBT, alors que les autres protéines (S, M, N, HE) n'y participaient pas. De plus, l'apoptose induite par le gène E est supprimée par l'expression élevée de l'oncogène Bcl-2, mais est dépendant de l'activation du système protéolytique impliquant des caspases (An *et al.*, 1999).

### 2.2.5 PROTÉINES NON-STRUCTURALES (ns)

En plus des gènes codant pour des protéines structurales, le génome des coronavirus contient quelques ORFs pouvant être transcrits puis traduits en protéines non-structurales (ns). Selon les différentes espèces de coronavirus, le nombre et la position de ces gènes varient. Chez le BCV, quatre cadres de lecture ouverts ont été identifiés entre les gènes S et M codant pour des protéines de 4.9 et 4.8 kDa codées par l'ORF4, et de 12.7 et 9.5 kDa (E) codées par l'ORF5 (Abraham *et al.*, 1990); un ORF localisé à l'extrémité 5' du gène HE codent pour une protéine de 32 kDa (Cox *et al.*, 1989) et un autre situé à l'intérieur du gène N code pour une protéine de 23 kDa (Lapps *et al.*, 1987b). Dans le cas du coronavirus humain HCV-OC43, seulement deux ORFs sont localisés entre les gènes S et M codant pour des protéines de 12.9 et 9.5 kDa (ORF5), un en 5' du

gène HE codant pour la protéine non-structurale de 32 kDa (Labonté *et al.*, 1995) et deux autres situées à l'intérieur du gène N codant potentiellement pour des protéines de 60 et 108 acides aminés (Kamahora *et al.*, 1989; Mounir *et al.*, 1994). Comme la région entre la S et la M est celle où l'on retrouve la seule différence majeure entre les virus BCV et HCV-OC43, certains auteurs ont suggéré que l'absence de deux ORFs dans le génome de HCV-OC43 par rapport à celui de BCV serait peut-être une explication pour la différence de tropisme des virus (Mounir et Talbot, 1993a). Aucune étude n'a encore démontré que les protéines de 4.8 et 12.7 kDa sont synthétisées dans les cellules infectées par les coronavirus, tandis que le gène codant pour une protéine de 4.9 kDa ne semble pas être traduit (Hofmann *et al.*, 1993).

Jusqu'à maintenant, peu de notions sont connues sur les protéines non-structurales des coronavirus. Toutefois, il est possible que les petites protéines codées par l'ORF4 (4.8 et 4.9 kDa) agissent comme régions d'ancrage pour les protéines structurales durant l'assemblage du virus ou qu'elles maintiennent l'association membranaire de la polymérase virale durant la réplication (Bournsnell *et al.*, 1984; Skinner *et al.*, 1985). Ces protéines ne sont toutefois pas essentielles à la réplication puisqu'elles sont absentes ou tronquées du génome du HCV-OC43 et de trois souches du virus HEV porcin. De même, la conservation de la protéine d'environ 12.9 kDa chez plusieurs coronavirus suggère qu'elle occupe une fonction importante dans la biologie des coronavirus. La protéine de 32 kDa est une protéine non-structurale, phosphorylée au niveau des résidus sérine et thréonine, qui s'accumule dans le cytoplasme des cellules infectées par les virus BCV (Cox *et al.*, 1991), MHV (Luytjes *et al.*, 1988), TCV (Dea *et al.*, 1988) et HCV-OC43 (Labonté *et al.*, 1995). La fonction de cette phosphoprotéine codée par le gène ns2 est inconnue jusqu'à présent. Toutefois, il a été démontré que les protéines non-structurales phosphorylées présentes chez d'autres virus à ARN de polarité positive sont impliquées dans la réplication virale (DeGroot *et al.*, 1990; Hardy *et al.*, 1990). De plus, comme on retrouve le gène codant pour la protéine de 32 kDa seulement chez les coronavirus du groupe antigénique II où le gène HE est présent, il est probable

que des interactions existent entre les gènes HE et ns2 ou les protéines HE et ns2 (Luytjes *et al.*, 1988).

## 2.3 RÉPLICATION VIRALE

La réplication des coronavirus se déroule dans le cytoplasme des cellules infectées. La durée du cycle de multiplication est de 14 à 18 heures, tandis que la période de latence est de 6 à 7 heures (Siddell *et al.*, 1982; Tooze *et al.*, 1984).

### 2.3.1 Attachement et pénétration

La première étape du cycle de réplication viral est l'attachement du virion à la membrane plasmidique d'une cellule susceptible (Holmes et Lai, 1996). Les différentes espèces de coronavirus se lient ensuite à leur récepteur spécifique. Autant la glycoprotéine S que la HE ont la capacité de s'attacher aux récepteurs cellulaires (Spaan *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1990). Pour le BCV et le HCV-OC43, les protéines S et HE reconnaissent toutes deux les résidus d'acides neuraminique 9-O-acétylés à la surface des érythrocytes, par contre le récepteur à la surface d'autres cellules permissives n'a pas encore été identifié (Schultze *et al.*, 1991a; Storz *et al.*, 1991; Schultze et Herrler, 1992; Kunkel et Herrler, 1993). Le récepteur pour le virus MHV est une glycoprotéine biliaire appartenant à la famille des antigènes carcinoembryonnaires de la superfamille des immunoglobulines (Williams *et al.*, 1991; Dveksler *et al.*, 1993). D'autre part, les virus de la GET des porcs et le coronavirus humain HCV-229E se lient à l'aminopeptidase N (Delmas *et al.*, 1992; Yeager *et al.*, 1992).

Après l'attachement de la protéine S à son récepteur cellulaire, le virus pénètre dans la cellule en fusionnant sa membrane avec la membrane cytoplasmique ou les membranes endosomales de la cellule (Gallagher *et al.*, 1991; Kooi *et al.*, 1991).

### 2.3.2 Transcription et réplication virale

Après la pénétration et la décapsidation des particules virales à l'intérieur de la cellule, l'ARN génomique, de polarité positive, est traduit pour la synthèse d'une ARN polymérase ARN dépendante à partir des ORF 1a et 1b se chevauchant (Holmes et Lai, 1996; de Vries *et al.*, 1997). L'inhibition de la synthèse protéique à n'importe quel moment de l'infection bloque la synthèse de l'ARN viral, ce qui suggère que la polymérase est probablement traduite de façon continue durant tout le cycle de réplication (Sawicki et Sawicki, 1986). Puis, l'ARN polymérase transcrit le brin positif de l'ARN viral en brin négatif. Ce dernier servira de matrice pour la synthèse de l'ARN génomique, de même que pour la synthèse de cinq à sept ARNm sous-génomiques (van Marle *et al.*, 1995; Hsue et Masters, 1997; Sethna et Brian, 1997) nommés en ordre décroissant selon leur taille (Lai, 1990). Les ARNm sont polyadénylés en 3' et coiffés en 5'. Chacun de ces ARNm possède en son extrémité 3' la séquence complète de l'ARNm qui lui est immédiatement plus petit, et une séquence additionnelle en 5' codant pour le produit du gène (Spaan *et al.*, 1988).

Jusqu'à présent, le mécanisme exact pour la transcription de l'ARNm sous-génomique des coronavirus n'a pas encore été élucidé, par contre deux modèles ont été proposés. Il est fort probable que des éléments des deux modèles coexistent lors de la transcription.



Dans le premier modèle, la transcription discontinue se produirait lors de la synthèse du brin d'ARN négatif (Baric *et al.*, 1983; Lai *et al.*, 1983; Spaan *et al.*, 1983). Ainsi, la transcription débiterait à l'extrémité 3' du brin de polarité négative à partir des séquences de tête agissant comme amorces et où le brin négatif servirait de matrice pour la transcription de l'ARN génomique et d'ARNm sous-génomiques. Puis, la transcription se terminerait avec la dissociation de ces séquences de tête du produit de la transcription (Holmes et Lai, 1996); leur détachement de la matrice serait médié par une activité endonucléotidique de l'ARN-polymérase (Barik *et al.*, 1985; Lai, 1986). Les séquences de têtes libres dans le cytoplasme des cellules se lieraient par la suite aux régions intergénomiques (SI), où l'on retrouve des séquences consensus, et serviraient d'amorces utilisées par l'ARN polymérase pour la transcription des ARNm sous-génomiques (Lai, 1990). Toutefois, les raisons pour lesquelles la transcription initiale se termine suite à la dissociation de l'amorce de la séquence de tête et comment les liaisons subséquentes de l'amorce aux régions SI sont induites demeurent encore obscures. Ce modèle de la transcription amorcée par les séquences de têtes libres a été proposé par Makino et collaborateurs (1986a, b), d'après des études de recombinaisons génétiques avec les coronavirus murins.

Le second modèle de transcription discontinue se déroule plutôt lors de la synthèse du brin d'ARN négatif (Sawicki et Sawicki, 1990) et contrairement au premier modèle, les régions SI agiraient comme des terminateurs de transcription plutôt que des initiateurs (Holmes et Lai, 1996). La transcription débiterait à l'extrémité 5' de l'ARN génomique pour produire un brin négatif. Pendant la synthèse de ce brin, la polymérase s'arrêterait à une région SI pour ensuite sauter à l'extrémité 3' de la séquence de tête située au niveau de l'extrémité 5' terminale de l'ARN génomique viral (Sawicki et Sawicki, 1990; Holmes et Lai, 1996). Les régions SI serviraient donc de séquences d'arrêt ou de séquences interagissant avec l'amorce d'ARN pour permettre à la polymérase de sauter. Tous les ARNm négatifs sous-génomiques ainsi formés posséderaient une séquence de tête antisens à l'extrémité 3'. Donc, ils pourraient tous être utilisés comme matrice pour la transcription d'ARNm et d'ARN génomique de polarité positive (Holmes et Lai, 1996).

### 2.3.3 Assemblage des virions

L'assemblage des virions est probablement initié par l'interaction entre la protéine N et l'ARN génomique. A l'extrémité 3' du gène 1b, une séquence de 61 nucléotides (nt) sert de signal spécifique pour amorcer l'encapsidation de l'ARN viral. Cette séquence n'est pas contenue dans les ARNm sous-génomiques (van der Most *et al.*, 1991; Fosmire *et al.*, 1992). La formation de la nucléocapside est suivie de l'attachement de la N aux membranes intracellulaires où sont préalablement ancrées des molécules de la protéine M (Holmes et Lai, 1996).

### 2.3.4 Bourgeonnement

Le bourgeonnement des particules virales n'est pas observé au niveau de la membrane plasmique. Il s'effectue plutôt au niveau des membranes intracellulaires, soit dans le RER et les vésicules de l'appareil de Golgi (Dubois-Dalcq *et al.*, 1982; Tooze *et al.*, 1984; Tooze et Tooze; 1985). Le virion acquiert alors sa membrane bilipidique et les glycoprotéines S et HE. Les particules virales migrent ensuite à travers l'appareil de Golgi et s'accumulent dans de grandes vésicules du système de transport de la cellule. Finalement, les particules virales sont relarguées après que les vésicules aient fusionné avec la membrane cytoplasmique (Griffiths et Rottier, 1992).

## 2.4 CORONAVIRUS BOVINS

### 2.4.1 IMPORTANCE CLINIQUE

La diarrhée est l'une des causes majeures de pertes économiques pour l'industrie de l'élevage des bovins laitiers et de boucherie. Malgré le fait qu'un seul sérotype de BCV ait été identifié jusqu'à présent, ces virus sont impliqués dans différentes pathologies entériques telles la diarrhée néonatale des veaux (DNV) et la dysenterie d'hiver (DH) des adultes (Mebus *et al.*, 1973; Saif, 1990). De plus, le virus peut aussi infecter les voies respiratoires supérieures des veaux en engraissement pouvant conduire à des pneumonies interstitielles (Saif *et al.*, 1986; Reynolds *et al.*, 1985; Tsunemitsu et Saif, 1995; Storz *et al.*, 1996).

### 2.4.2 PATHOLOGIES CLINIQUES

#### 2.4.2.1 Diarrhée néonatale du veau

La diarrhée néonatale du veau (DNV) associée aux coronavirus a été rapportée pour la première fois au Nebraska en 1972 (Mebus *et al.*, 1973). Des BCV ont par la suite été isolés au Québec chez des veaux naissants (Dea *et al.*, 1980a, b). La diarrhée néonatale survient habituellement chez des veaux âgés d'une à trois semaines et certaines bêtes sont parfois susceptibles jusqu'à l'âge de trois mois (Sharpee *et al.*, 1976; Saif et Heckert, 1990). L'état du système immunitaire des animaux, la dose de virus infectante, la virulence de la souche et la présence d'autres agents opportunistes influencent tous la gravité de l'infection par le BCV (Dea *et al.*, 1982). La principale route d'infection est orale-fécale et les vaches gestantes sont celles qui relâchent les plus grandes quantités de virus dans leurs fèces (Crouch *et al.*, 1985; Collins *et al.*, 1987). Les principaux signes cliniques observés sont une diarrhée très liquide et profuse résultant le

plus souvent en une forte déshydratation, un amaigrissement, de l'anorexie et même la mort. Les animaux infectés qui échappent à la mort demeurent habituellement des porteurs chroniques de l'infection.

#### **2.4.2.2 Dysenterie d'hiver**

La dysenterie d'hiver (DH) est une pathologie maintenant associée à une infection par un coronavirus et elle cause beaucoup de dommages dans l'industrie du bétail à travers le monde (Campbell et Cookingham, 1978; Saif *et al.*, 1988; Durham *et al.*, 1989; Dea *et al.*, 1995). C'est une diarrhée aiguë qui est prévalante surtout durant les mois d'automne et d'hiver, lorsque les animaux entrent en stabulation et que le virus est stabilisé par l'environnement plus froid (Benfield et Saif., 1990). Dans un troupeau, l'infection apparaît de façon soudaine et l'entassement des animaux à cette période de l'année fait en sorte que le virus se dissémine rapidement à travers tout le cheptel. Ainsi, la majorité des animaux sont atteints dans les quatre à sept jours. Cependant, le virus persiste seulement pour une courte période de temps dans le troupeau contrairement à la DNV. La DH est caractérisée par une diarrhée foncée, liquide et hémorragique affectant les bovins de plus d'une année d'âge (Saif *et al.*, 1990, 1991; Benfield et Saif, 1990; Dea *et al.*, 1995). Une réduction de la production lactée, de l'anorexie et une diminution de la condition physique en général sont par la suite observés chez les animaux malades.

#### **2.4.2.3 Infections du système respiratoire supérieur**

Bien que surtout reconnu pour causer des infections entériques, le BCV est également responsable d'infections des voies respiratoires supérieures chez les animaux en croissance (Reynolds *et al.*, 1985; Storz *et al.*, 1996). Les bovins éprouvent alors des difficultés à respirer normalement ce qui est attribuable à des lésions de pneumonie

interstitielle. Les animaux infectés oralement avec un isolat de BCV causant des troubles respiratoires développent avant tout une diarrhée puis, par la suite des problèmes touchant les voies respiratoires supérieures (Kapil *et al.*, 1991). Le coronavirus respiratoire bovin (BRCV) est maintenant reconnu comme l'un des principaux agents étiologiques de la fièvre de transport des bovins (Storz *et al.*, 1996).

#### 2.4.2.4 Diagnostic

Les coronavirus s'adaptent difficilement en cultures cellulaires. En 1973, Mebus et collaborateurs ont réussi à isoler un coronavirus responsable de diarrhée chez le veau sur des cultures primaires de reins embryonnaires bovins (FBK). Toutefois, malgré la multiplication du virus après plusieurs passages sur ces cellules, aucun effet cytopathique (ECP) n'a été observé. Les cellules HRT-18, provenant d'une adénocarcinome intestinal humain, ont par la suite été décrit comme une lignée cellulaire permissive permettant la réplication du coronavirus entérique bovin et l'induction d'un ECP (Tompkins *et al.*, 1974; Laporte *et al.*, 1980), tout comme les cellules Madin-Darby de reins bovins (MDBK) et les cellules Vero (Dea *et al.*, 1980b).

Couramment, le diagnostic d'une infection par le BCV est confirmé suite à l'observation du virus dans les fèces en microscopie électronique (EM) après coloration négative avec l'acide phosphotungstique (Mebus *et al.*, 1975; Flewett, 1978; Pomeroy *et al.*, 1978; Gibbs *et al.*, 1980; Jensen *et al.*, 1980). Toutefois, il n'est pas rare que les projections de surface, caractéristiques du virus, se détachent lors de la préparation de l'échantillon ou de sa conservation. Il devient alors plus ardu d'identifier les particules virales à cause de leur ressemblance avec les débris des membranes cellulaires. Une technique d'immuno-électromicroscopie après une incubation en présence d'un antisérum anti-BCV suivi d'une deuxième incubation en présence de la protéine A couplée à des particules d'or colloïdal permet d'augmenter la sensibilité et la spécificité de l'EM

(Dea et Garzon., 1991). Une technique de contre-immuno-électrophorèse a aussi été décrite pour détecter les antigènes de coronavirus dans les contenus intestinaux (Dea *et al.*, 1979).

Des tests d'ELISA de captage, quoique moins sensibles, peuvent aussi être utilisés pour diagnostiquer une infection par le BCV. Dans ces tests, les particules virales présentes dans les selles sont captées par les Ac provenant d'un antisérum hyperimmun ayant préalablement été attachés au fond des plateaux de microtitrage (Athanassiou *et al.*, 1994). Les tests d'ELISA permettent d'évaluer rapidement un grand nombre d'échantillons d'où leur avantage sur l'EM. L'utilisation d'AcMo permet d'augmenter de façon significative la sensibilité des tests d'ELISA de captage (Smith *et al.*, 1996). La présence des antigènes du virus au niveau des entérocytes peut aussi être mise en évidence par immunofluorescence sur coupes congelées d'intestin et par immunoperoxydase sur des coupes d'intestin fixées à la formaline et enrobées dans la paraffine (Dar *et al.*, 1998).

L'utilisation de sondes moléculaires correspondant à de l'ADN complémentaire (ADNc) d'une région du gène N s'est aussi avérée très sensible pour la détection du virus dans les échantillons de selles (Schockley *et al.*, 1987; Verbeek et Tijssen, 1988; Verbeek *et al.*, 1990) Les sondes ont été couplées au P<sup>32</sup> (Verbeek *et al.*, 1990) ou à la digoxygénine permettant dans ce dernier cas une révélation immunologique après incubation des membranes de nitrocellulose en présence d'anticorps anti-digoxygénine couplé à la biotine et d'un conjugué avidine-peroxydase (Verbeek et Tijssen, 1988).

Récemment, un test RT-PCR a aussi été utilisé pour détecter des particules de BCV dans les fèces. Une région de 407 pb du gène N très conservée parmi les différentes souches de BCV a été amplifiée chez des bovins adultes inoculés expérimentalement avec des souches de DNV ou DH (Tsunemitsu *et al.*, 1999).

## EXISTENCE DE PLUSIEURS SÉROGROUPE DE BCV

### 2.4.3.1 Souches américaines et du Japon (DH/DNV)

Comme le virus est associé à différentes pathologies cliniques, plusieurs études ont suggéré l'existence de plus d'un sérotype pour le BCV. Tout d'abord, Tsunemitsu et Saif (1995) ont examiné les différences antigéniques et biologiques entre différentes souches de BCV responsables d'épidémies de DNV ou de DH en Amérique ou au Japon. L'effet cytopathique induit en cultures cellulaires était semblable pour toutes les souches. Tous les isolats étaient capables d'hémagglutiner les érythrocytes de souris et aucune différence significative n'a été observée dans les titres d'hémagglutination (HA) tant à 4°C qu'à 37°C. Cependant, même si toutes les souches possédaient la capacité d'hémagglutiner les globules de poulets à 4°C, les titres HA étaient variables entre les différents BCV. L'hémagglutination à 37°C était possible pour quelques isolats mais il n'y avait aucune corrélation entre les patrons d'activité d'HA ou de RDE et les deux pathologies. De plus, des tests d'IF, d'IHA et de SN n'ont pas permis d'établir davantage de différences entre ces isolats. Basé sur ces résultats, trois groupes de BCV ont été formés contenant chacun des souches associées aux deux pathologies.

Récemment, une autre étude semblable a été réalisée par Fukutomi, Tsunemitsu et Akashi (1999). Le gène M des différentes souches de BCV américaines et japonaises a été amplifié par PCR. Plus de 93% des particules coronavirales détectées en microscopie électronique l'ont été également par PCR. Comme précédemment, toutes les souches étudiées hémagglutinaient les érythrocytes de souris à 4°C et 37°C avec des titres HA similaires. A 37°C, les titres HA observés avec des globules de poulets variaient selon les souches. Les auteurs ont donc suggéré que des différences au niveau des propriétés d'attachement du récepteur de la S existent parmi les souches de BCV. Les isolats ont été séparés en deux groupes : dans le premier groupe, les souches antigéniquement

semblables aux souches de référence Mebus et Kakegawa, et les isolats montrant des différences antigéniques significatives ont été classés dans un second groupe.

#### 2.4.3.2 Souches québécoises (DH /DNV)

Au Québec, différentes souches de BCV ont été isolées de bovins provenant de fermes laitières de quatre régions géographiques différentes où les animaux présentaient des signes cliniques associés à la DNV ou à la DH (Michaud et Dea, 1993; Rekik et Dea, 1994; Dea *et al.*, 1995). Les isolats de DNV propagées sur cellules HRT-18, une lignée cellulaire ayant été établie à partir d'un adénocarcinome rectal humain (Thompkins *et al.*, 1974), étaient faiblement fusogéniques (tout comme la souche prototype Mebus) ou encore non-fusogéniques, mais cytolytiques. Toutefois, toutes les souches de DH étaient hautement fusogéniques lorsque le milieu de culture était supplémenté de trypsine pancréatique. Trois groupes antigéniques distincts ont été définis suite à des analyses de réactivité croisée utilisant des AcMo neutralisants dirigés contre la glycoprotéine S (Michaud et Dea, 1993). Les isolats de DH ont pu être distingués de ceux de la DNV par leurs profils d'héماغglutination (Dea *et al.*, 1995). Leur capacité d'héماغglutiner des globules de rats était comparable à 4°C, mais les souches de DH avaient une activité HA plus faible à 37°C et une activité RDE plus élevée. De plus, les isolats de BCV du Québec ont pu être différenciés du point de vue sérologique par des tests d'IHA utilisant des sérums hyperimmuns produits contre la souche Mebus. Ces résultats ont permis de séparer les isolats de BCV dans deux sous-groupes distincts : ceux ayant un profil de réactivité similaire à celui de la souche Mebus, et les autres qui réagissent différemment de la souche de référence.



#### 2.4.4.3 Comparaison entre les coronavirus bovins entériques et respiratoires

Le coronavirus respiratoire porcin (PRCV) diffère du coronavirus de la GET par la présence d'une délétion de 250 résidus d'acides aminés au niveau de l'extrémité N-terminale de la portion S1 de la glycoprotéine des péplomères, en plus de la présence de mutations ponctuelles. Des expériences ont démontré que cette délétion serait responsable du tropisme tissulaire distinct et de la pathogénicité de ces deux souches virales (Pensaert *et al.*, 1986; Rasschaert *et al.*, 1990; Ballesteros., 1997) . Il a été démontré que seulement deux changements d'acides aminés au niveau de la partie N-terminale de la glycoprotéine S du virus de la GET résulte en la perte du tropisme entérique (Ballesteros., 1997). Suite à cette découverte, le gène S de plusieurs souches de BCV entériques et respiratoires (BRCV) a été comparé.

Une souche allemande isolée à partir d'écouvillons nasaux d'un bovin souffrant d'une maladie respiratoire a été identifiée comme faisant partie de la famille des coronavirus par immuno-électromicroscopie et par des tests d'IHA utilisant un antisérum spécifique au BCV (Zhang *et al.*, 1994a). L'amplification par PCR du gène S de ce BRCV a démontré qu'il n'y avait aucune délétion ou insertion dans la séquence lorsque comparée à la souche de BCV entérique LY-138. Seulement quelques mutations ponctuelles distribuées au hasard du gène ont été retrouvées, le site de clivage et le domaine fusogénique ayant été conservés. Les activités AE et HA étaient également préservées. L'habileté du BRCV à se répliquer dans les cellules HRT-18, ayant conservé plusieurs des propriétés des cellules épithéliales de l'intestin, indique que le virus était probablement en mesure d'infecter à la fois les systèmes respiratoire et gastro-entérique des bovins.

Quelques années plus tard, d'autres souches de BRCV ont été isolées de bovins provenant de huit états différents des États-Unis et ayant eu des problèmes respiratoires.

Chouljenko et collaborateurs (1998) ont cloné l'extrémité 3' du génome viral de deux de ces isolats. En général, les séquences de nucléotides et d'acides aminés des BRCV étaient plus conservées entre elles qu'avec les BCV entériques. Une délétion de quatre nucléotides était observée 31 à 34 pb en amont de l'AUG de l'ORF 12.7 kDa pour les isolats de BRCV. De même, la glycine était remplacée par une valine à la position 53 de la protéine E dans le cas des isolats virulents inclus dans la comparaison. Également, onze changements d'acides aminés spécifiques aux souches respiratoires ont été identifiés au niveau de la sous-unité S1 du gène S. De plus, les deux BRCV n'hémagglutinaient pas les érythrocytes de poulets (Storz *et al.*, 1996). Conséquemment, ces changements d'acides aminés dans le gène S sont peut-être responsables de la perte de la capacité d'hémagglutination.

#### **2.4.4 CONSTRUCTION D'UN VACCIN CONTRE LE BCV**

##### **2.4.4.1 Glycoprotéine HE**

La glycoprotéine HE possède deux propriétés importantes : l'hémagglutination et la capacité d'induire la production d'Ac neutralisants (King *et al.*, 1985; Deregt et Babiuk, 1987). Quelques groupes de chercheurs se sont intéressés à son utilisation potentielle en tant que vaccin contre le BCV. Ainsi, les gènes HE du BCV ont été insérés dans le génome du virus de la polyhédrose nucléaire d'*Autographica californica* (Parker *et al.*, 1990). La glycoprotéine HE synthétisée par les cellules infectées par le virus recombinant était capable d'induire la production d'Ac inhibant.

Quelques temps plus tard, le gène HE a été inséré dans un vecteur de transfert adénovirus humain de sérotype 5 afin de produire un adénovirus recombinant (Yoo *et al.*, 1992). Les souris inoculées avec le virus recombinant ont développé des Ac spécifiques contre la HE capables de neutraliser l'infection induite par BCV. De plus, la protéine HE exprimée par les cellules infectées par l'adénovirus recombinant a conservé les mêmes

propriétés biologiques de la protéine HE native BCV. Les cellules infectées par le virus recombinant exprimaient une HE qui était glycosylée, dimérisée et ayant conservée ses épitopes neutralisants conformationnels. Les activités d'HA et d'AE ont aussi été préservées. Ces résultats indiquent que l'adénovirus pourrait être utilisé comme vecteur pour produire un vaccin induisant une réponse immune dirigée contre la glycoprotéine HE de BCV.

L'adénovirus recombinant HE a été utilisé, quelques années plus tard, par la même équipe de chercheurs pour immuniser de façon intranasale et entérique des rats afin de vérifier si une immunité mucoale et systémique pouvait être induite (Baca-Estrada *et al.*, 1995). Les Ac produits étaient capables de neutraliser l'infection par le BCV *in vitro*. De plus, on a rapporté l'activation de l'immunité mucoale et systémique suite aux essais d'immunisation avec du virus recombinant HE.

#### 2.4.4.2 Glycoprotéine S

La glycoprotéine S est la composante virale majeure des coronavirus des points de vue de ses activités biologiques et de ses propriétés immunologiques. Comme il a été mentionné auparavant, elle est responsable de l'activité fusogène du virus et de l'attachement au récepteur cellulaire. Elle possède aussi la capacité d'induire des Ac neutralisants et celle d'hémagglutiner les globules de rats.

Lorsqu'on compare la séquence en acides aminés de la portion S1 de la glycoprotéine S du BCV à celle du MHV, une séquence additionnelle de 49 à 138 acides aminés (JHM, A59) est retrouvée dans le gène du BCV (Luytjes *et al.*, 1987). La fonction de cette séquence supplémentaire est inconnue, mais on retrouve une séquence de 142 à 152 acides aminés similaire à cette région de la S1 du BCV dans la partie N-

terminale de la S1 de MHV-4 (Parker *et al.*, 1989b). Cette région est très polymorphique chez les différents variants de MHV résistant à la neutralisation suggérant un rôle dans la pathogénicité.

La portion S1 du gène S du BCV a été exprimée dans des cellules d'insectes à l'aide d'un baculovirus recombinant. Ce virus recombinant a permis de localiser deux épitopes neutralisants majeurs dans la S1 (A et B) (Yoo *et al.*, 1990). Afin de vérifier si ces deux épitopes sont associés avec la région de BCV similaire à la région polymorphe du MHV-4, une série de six mutants ayant des délétions dans le gène S1 ont été construits et exprimés dans les cellules d'insectes (Yoo *et al.*, 1991). Un signal membranaire de translocation a été inclus dans les constructions pour s'assurer que la protéine soit bien glycosylée. Les résultats de cette étude ont démontré que la région additionnelle présente dans le BCV semble associée aux déterminants antigéniques A et B et donc à la pathogénicité.

Le produit du gène S du MHV a quant à lui été exprimé en utilisant un adénovirus recombinant de sérotype 5 (Wesseling *et al.*, 1993). Les souris inoculées avec la protéine recombinante ont produit des Ac neutralisant le virus *in vitro*, quoique les titres étaient assez faibles. De plus, une protection de 100% contre l'infection par le MHV fut observée chez les souris ayant été préalablement injectées simultanément avec des adénovirus recombinants exprimant les protéines S et N.

Récemment, le gène S du virus de la GET des porcs a aussi été cloné et exprimé dans un vecteur baculovirus (Sestak *et al.*, 1999). La protéine recombinante peut être utilisée comme antigène dans un test d'ELISA de compétition pour différencier entre les infections par le virus de la GET et le virus PRCV.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## **3.1 CULTURES CELLULAIRES**

### **3.1.1 Origine des cellules**

#### **3.1.1.1 Adénocarcinome intestinal humain**

La lignée cellulaire HRT-18 a été établie à partir d'un adénocarcinome intestinal humain (Tompkins *et al.*, 1974). Elle a été obtenue du Dr Jean-François Vautherot de l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA), Jouy-en-Josas, France. Le clone G de la lignée HRT-18 (HRT-18G) a été développé récemment et nous a été gracieusement fourni par le Dr Johannes Storz du département de Microbiologie Vétérinaire et Parasitologie de l'École de Médecine Vétérinaire de Louisiane, États-Unis. Les HRT-18G sont reconnues pour leur permissivité aux souches de BCV entériques et respiratoires (Thompkins *et al.*, 1974; Laporte *et al.*, 1980; Storz *et al.*, 1996).

#### **3.1.1.2 Rein d'embryon humain**

Les cellules 293 ont été dérivées de cellules rénales embryonnaires humaines. Ces cellules ont été transformées suite à leur transfection avec l'ADN du gène précoce 1 (E1) de l'adénovirus humain de sérotype 5 (Ad5) par la technique de précipitation au phosphate de calcium (Graham *et al.*, 1977). Cette lignée a été obtenue du Dr Bernard Massie de l'Institut de Recherche en Biotechnologie (IRB), Conseil National de la recherche du Canada. Les cellules 293 peuvent être infectées efficacement par les adénovirus 1, 2, 5, et 7 (Graham *et al.*, 1977).

### 3.1.2 Culture des cellules

Les cellules étaient maintenues dans le milieu modifié de Dulbecco avec une base saline d'Eagle (DMEM) (GIBCO Laboratories Inc., Grand Island, NY, États-Unis) auquel était ajouté 100 unités (U) par millilitre (ml) de pénicilline (GIBCO) et 100 µg/ml de streptomycine (GIBCO), 1% (2 millimolaires (mM)) de L-glutamine (GIBCO) et 5 à 10 % (volume sur volume (v/v)) de sérum fœtal bovin (SFB, Multi Ser<sup>TM</sup>) préalablement décomplémenté 30 minutes (min) à 56°C. Pour les cellules HRT-18G, 1% de pyruvate de sodium MEM (100 mM) (GIBCO) était également ajouté, tandis que pour les cellules 293, le milieu de culture contenait aussi 2% d'hépès (1M) (GIBCO). Les lignées cellulaires étaient propagées dans des flacons de culture en plastique de formats F25 (25 cm<sup>2</sup>), F75 (75 cm<sup>2</sup>) ou F150 (150 cm<sup>2</sup>) (Corning Glass Works, NY, États-Unis) ou dans des plateaux de 6, 24 ou 96 puits (Nalge Nunc International, Nalgene, NY, É-U.) Les cultures cellulaires étaient incubées à une température de 37°C en présence de 5% (v/v) de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>).

Lorsque les cellules avaient atteint 100% de confluence (deux fois par semaine), les feuillets cellulaires étaient rincés avec une solution saline phosphatée (PBS) ajustée à un pH de 7.4 (GIBCO). Puis, les cellules étaient dispersées et détachées de la surface du flacon avec une solution 1X de trypsine (Worthington Biochemical Co, Freehold, NJ, É-U) dissoute dans du PBS ne contenant pas de calcium (Ca<sup>++</sup>), ni de magnésium (Mg<sup>++</sup>) afin de défavoriser l'attachement des cellules entre elles et avec le substrat de culture. De plus, la solution était supplémentée de 0.04% d'acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA; Sigma Chemical Co., St-Louis, MO, É-U) nécessaire pour disperser le feuillet cellulaire. Le dénombrement des cellules viables, après une coloration avec une solution de 1% de bleu de Trypan, était effectué à l'aide de l'hémacytomètre. Les cellules étaient par la suiteensemencées dans un nouveau flacon à une concentration de 100 000 cellules/ml.

## **3.2 ORIGINE ET IDENTIFICATION DES VIRUS**

### **3.2.1 Souches de référence**

La souche de référence du coronavirus bovin, Mebus (ATCC VR-874) ainsi que la souche prototype du coronavirus hémagglutinant de l'encéphalomyélite porcine (ATCC VR-740) ont été obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, É-U). La souche de référence du coronavirus respiratoire bovin OK-0514-3 a été obtenue du Dr J. Storz. La souche HCV-OC43 du coronavirus humain nous a été gracieusement fournie par le Dr P. J. Talbot, Centre de recherche en Santé, INRS-Institut Armand-Frappier, Qc, Canada.

### **3.2.2 Isolats cliniques**

Les isolats cliniques de coronavirus bovins associés à la DNV ou à la DH ont été obtenus de fermes laitières de cinq différentes régions du Québec, entre 1986 et 1996 (Michaud et Dea, 1993; Rekik et Dea, 1994). Un isolat de coronavirus respiratoire (BRCV 3994) provenait du Québec, tandis que les deux autres BRCV, qui avaient été isolées suite à des épidémies de problèmes respiratoires survenues en Ontario, nous ont été fournis par la Dre S. Carman, Department of Microbiology and Pathology, Ontario Veterinary College, Guelph, Ont, Canada (Tableau 2).



**TABLEAU 2 : Pathologies cliniques associées aux différents isolats de coronavirus bovins utilisés lors des analyses des variations génomiques**

Isolat	Provenance	Pathologie
MEBUS	ATCC (1972)	DNV
BCQ.2590	Québec (1991)	DH
BCQ.7373	Québec (1992)	DH
BCQ.571	Québec (1989)	DNV
BCQ.1523	Québec (1994)	DNV
OK-0514	Oklahoma (1996)	BRCV
BCO.43277	Ontario (1998)	BRCV
BCO.44175	Ontario (1998)	BRCV
BCQ.3994	Québec (1999)	BRCV

### **3.3 PROPAGATION DES VIRUS**

#### **3.3.1 Infections des feuillets cellulaires**

Les différents isolats de coronavirus ont été propagés sur les cellules HRT-18G, tandis que les adénovirus recombinants l'ont été sur les cellules 293 adhérentes (293A). Lorsque les différents feuillets cellulaires étaient confluents, le milieu de culture était vidangé des flacons et les feuillets rincés à deux reprises avec du PBS. Par la suite, une quantité connue de virus, habituellement diluée 1/10 dans du milieu de culture, était déposée sur le feuillet cellulaire. Les flacons étaient ensuite incubés 90 min à 37<sup>0</sup>C avec une légère agitation pour favoriser l'adsorption du virus aux cellules. Puis, le milieu de maintien était ajouté. Pour les cellules HRT-18G, ce milieu était supplémenté de 10 U/ml de trypsine pancréatique bovine (Sigma grade XIII) et ne contenait pas de SFB, car ce dernier inhibe l'effet de la trypsine. Les flacons étaient finalement incubés à 37<sup>0</sup>C jusqu'à ce qu'un effet cytopathique (ECP) soit observé au microscope photonique à inversion, soit après 3 à 5 jours.

### **3.4 PURIFICATION DES SUSPENSIONS VIRALES**

#### **3.4.1 Technique de dilution limite**

Les isolats de BRCV propagés en cultures cellulaires ont été sous-clonés par la technique de dilution limite pour s'assurer de leur homogénéité. Les souches de BCV avaient déjà subi le même traitement auparavant. Des cellules HRT-18G ont tout d'abord étéensemencées dans des plateaux de 96 puits à fond plat. Lorsque les feuillets cellulaires étaient confluents, des dilutions sérielles de virus allant de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-10</sup> ont été préparées dans du milieu DMEM. Un volume de 100 µl de chaque dilution a été utilisé pour infecter les cellules, huit puits pour chaque dilution. Après une période d'adsorption

de 90 min, un volume de 100  $\mu$ l de milieu de croissance a été ajouté. Les surnageants de cultures correspondant à la plus haute dilution où un ECP était toujours visible ont été redilués dans du milieu puis, utilisés pour infecter un nouveau plateau de 96 puits. Après trois passages, la plus haute dilution produisant toujours un ECP a été conservée dans 1 ml de milieu DMEM complet à  $-80^{\circ}\text{C}$  ou utilisée immédiatement pour infecter des cellules afin de multiplier le nouveau clone produit.

### 3.4.2 Détermination du titre infectieux

Le titre infectieux de chaque virus a été déterminé selon la méthode de Karber (Payment et Trudel, 1989) à l'aide de la formule suivante :

$$\text{DICT}_{50} = -\Delta - \delta (S-0,5)$$

où  $\text{DITC}_{50}$  est la dose infectieuse en culture de tissus correspondant à la dilution virale causant de l'effet cytopathique dans 50% des cultures infectées,  $\Delta$  représente la valeur de la dilution où 100 % de dégénérescence est observée,  $\delta$  est la valeur du  $\log_{10}$  du facteur de dilution et S correspond à la somme des puits dégénérés (100% de dégénération étant égal à 1).

### 3.4.3 Récolte et clarification des surnageants de cellules infectées

Lorsque l'ECP affectait plus de 50% du feuillet cellulaire, les cellules étaient décollées des flacons et les virus libérés des cellules par trois cycles de gel-dégel. A chaque cycle, les flacons étaient d'abord congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$  puis, placés à  $37^{\circ}\text{C}$  afin d'être décongelés rapidement pour éviter d'abîmer les péplomères des coronavirus. Les suspensions virales obtenues étaient ensuite transvidées dans des tubes coniques de 50 ml (Corning Glass Works) et centrifugées (Sorvall RT 6 000D) à 3 000 rotations par minute

(rpm) pendant 30 min à 4<sup>0</sup>C pour éliminer les débris cellulaires. Les surnageants alors clarifiés étaient aliquotés et conservés à -80<sup>0</sup>C.

### **3.4.4 Concentration des souches virales**

#### **3.4.4.1 Semi-purification**

Les suspensions virales clarifiées étaient transférées dans des tubes de 50 ml en polycarbonate (Beckman Instruments Inc., Palo Alto, Ca., É-U) contenant 15 ml d'une solution de sucrose 30% (Boehringer Mannheim) dissoute dans une solution de 0,02 molaire (M) de tampon Tris-NaCl (TBS) à un pH de 8,0. Puis, les suspensions étaient ultracentrifugées à 30 000 rpm pour 3 heures à 4<sup>0</sup>C à l'aide du rotor T-35 (Beckman L8-55 Ultracentrifuge, Beckman Instruments). Le surnageant était rejeté et le culot était resuspendu à 4<sup>0</sup>C pendant toute la nuit dans 200 µl de TBS. Le jour suivant, le virus semi-purifié était conservé à -80<sup>0</sup>C.

#### **3.4.4.2 Purification**

Les virus semi-purifiés étaient ensuite ultracentrifugés à travers un gradient de 20 à 50 % de saccharose à 28 000 rpm pendant 16 heures à 4<sup>0</sup>C dans le rotor SW 40-Ti. Puis, les 2 bandes virales visibles entre 30-40% et 40-50% étaient récoltées et diluées 1:10 dans du TBS. Les bandes étaient ensuite recentrifugées à 28 000 rpm pendant 3 heures à 4<sup>0</sup>C (rotor SW 40-Ti) afin d'éliminer le saccharose. Finalement, le culot viral était resuspendu dans 50 µl de TBS et conservé à -80<sup>0</sup>C.

### **3.5 DÉTERMINATION DES PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES ET ENZYMATIQUES**

#### **3.5.1 Test d'hémagglutination**

Des globules de rats frais du jour étaient préalablement lavés par une première centrifugation dans une solution d'Alsever (GIBCO) puis, à deux reprises dans du PBS à 2 000 rpm pendant 20 min à 4<sup>0</sup>C. Un volume de 400 µl de globules était ajouté à 100ml d'une solution de PBS supplémentée de 0,4% de sérum albumine bovin (BSA; Sigma Chemical CO.).

Pour le test d'HA, des plateaux de 96 puits à fond rond étaient tout d'abord rincés avec du PBS. Puis, 95 µl d'une solution de PBS-BSA 0,4% était ajoutés aux puits de la première rangée et 50 µl dans tous les autres puits. Par la suite, 5 µl d'une suspension virale étaient additionnés à tous les puits de la première rangée afin d'obtenir une dilution de 1/20. Des dilutions sérielles à base 2 étaient alors exécutées de 1/20 (1<sup>ère</sup> rangée) à 1/10240 (dernière rangée). Finalement, chaque puits était supplémenté de 50 µl de la solution de globules de rats et les plateaux étaient placés à 4<sup>0</sup>C pour 2 heures. L'hémagglutination des globules se traduisait par l'agglutination des cellules en agrégats et non par la sédimentation des érythrocytes formant un point rouge au fond du puits. Le titre HA était évalué selon la réciproque de la plus haute dilution produisant une agglutination complète des érythrocytes.

#### **3.5.2 Test d'inhibition de l'hémagglutination**

Avant de procéder au test d'IHA, des dilutions à rebours des préparations virales utilisées dans le test HA étaient toujours effectuées afin de bien vérifier la concentration

finale d'unités HA. Puis, des plateaux de 96 puits étaient préparés tel que décrit en 3.5.1. Un volume de 5 µl de sérum anti-Mebus (5801) était ajouté à la première rangée de puits et dilué de façon sérielle. Par la suite, un volume de 50 µl de virus ajusté à 8 unités HA était ajouté à chaque puits. Les plateaux étaient ensuite incubés à 37 °C pendant 1 heure pour permettre aux anticorps de s'attacher aux virus. Les plateaux étaient alors refroidi à 4 °C pendant 30 min et 50 µl de la solution de globules de rats (0,4%) étaient ajoutés à chaque cupule. Suivant une incubation de 2 heures à 4°C, une première lecture du titre IHA était faite correspondant à la réciproque de la plus haute dilution sérique d'antisérum capable d'inhiber l'hémagglutination de 8 unités HA du virus. Le mélange était incubé durant toute la nuit à la température de la pièce (TP) et une deuxième lecture était prise.

### **3.5.3 Mesure de l'activité enzymatique destructrice de récepteurs**

L'activité RDE de chaque virus était déterminée en plaçant les plateaux de 96 puits des tests d'HA à 37 °C pour 2 heures immédiatement après l'incubation à 4°C, et ce dans le but d'activer l'activité enzymatique résultant en l'élution ou détachement des particules virales des érythrocytes. Le titre RDE correspondait au rapport du titre HA à 4°C sur celui obtenu à 37 °C. Une baisse du titre était observé à 37°C si l'activation de l'enzyme détruisait les complexes virus-érythrocytes.

### **3.5.4 Mesure de l'activité acétyl-estérase**

L'AE a été déterminée selon la technique décrite par Vlasak *et al.*, (1988a) avec les modifications suggérées par Storz *et al.*, (1992). Un volume de 15 µl de virus semi-purifié était ajouté à 1 ml de PBS contenant 1 mM de p-nitrophénylacétate (PNPA; Sigma Chemical CO). L'hydrolyse du substrat était mesuré par spectrophotométrie (Ultrospec II, Pharmacia) à une longueur d'onde de 405 nanomètres (nm) à toutes les minutes

pendant 5 min. Les différentes lectures obtenues après 5 min étaient finalement comparées.

### **3.6 EXTRACTION DE L'ARN VIRAL ET AMPLIFICATION DU GÉNOME**

#### **3.6.1 Extraction de l'ARN viral à partir de virus purifié**

L'extraction de l'ARN viral était effectuée selon une technique modifiée initialement décrite par Chomczynski et Sacchi (1987). Un volume de 50 µl de virus purifié était d'abord placé dans un tube eppendorf de 1,5 ml (Fisher Scientific Ltd) traité avec un inhibiteur de ribonucléases. Puis, 400 µl de Trizol (GIBCO) et 50 µl d'acétate de sodium 2M à pH 4,0 étaient ajoutés au virus. Les tubes étaient agités par inversion à 5 reprises puis, incubés pour 5 min à TP. Par la suite, un volume de 200 µl de chloroforme (Molecular Biology Grade, Fisher Scientific, Ltd) était ajouté et les tubes étaient homogénéisés par forte agitation manuelle pendant 15 sec puis, incubés sur la glace 15 min afin de permettre la séparation des différentes phases. Les tubes étaient par la suite centrifugés à 10 060 X g pendant 15 min à 4<sup>0</sup>C. La phase aqueuse, contenant l'ARN viral, était prélevée et ajoutée à 20 µg de glycogène (Boehringer Mannheim). Après une légère agitation, les tubes étaient laissés à TP pour 5 min. L'ARN était ensuite précipité avec 1 ml de 2-propanol (HPLC Grade, Fisher Scientific) pendant 3 heures à -20<sup>0</sup>C. Après une centrifugation de 15 min à 10 060 X g à 4<sup>0</sup>C, le culot était lavé à l'éthanol (EtOH) 75%, puis asséché sous vide 5 à 10 min et finalement, resuspendu dans 20 µl d'eau distillée traitée au diéthyl pyrocarbonate (DEPC: Sigma Chemical CO) supplémenté de 1 µl d'inhibiteur de ribonucléases (RNA guard®; Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Qc, Canada). L'ARN viral était conservée à -80<sup>0</sup>C en vue d'utilisation ultérieure.

### 3.6.2 Extraction d'ARN viral à partir de feuillets cellulaires infectés

Lorsqu'un F25 de cellules HRT-18G infectées par BCV était utilisé pour obtenir de l'ARN viral, le surnageant du flacon était retiré 2 à 3 jours post-infection (p.i.) et 1ml de Trizol par 10 cm<sup>2</sup> de flacon était ajouté. Le F25 était ensuite laissé à TP pour 5 min puis recouvert de 0,2 ml de chloroforme par ml de Trizol. Après une incubation de 3min à TP, la suspension de cellules infectées était transférée dans des tubes eppendorfs et centrifugées à 10 060 X g pendant 15 min à 4<sup>0</sup>C. La phase supérieure était alors récoltée et l'ARN était précipitée par l'ajout de 0,5 ml de 2-propanol par ml de Trizol, de même que 10% d'acétate de sodium 3M, et l'incubation des tubes pendant 3 heures ou durant toute la nuit à -20<sup>0</sup>C. Les culots étaient ensuite lavés à l'EtOH 75%, séchés sous vide, resuspendus dans 20 µl d'H<sub>2</sub>O-DEPC et 1 µl d'ARN guard® et, finalement, conservés à -80<sup>0</sup>C.

### 3.6.3 Choix des amorces pour l'amplification des gènes HE et S1 ainsi que des régions ORF4 et ORF5.

Les amorces utilisées pour amplifier les différentes régions de l'ARN génomique des isolats de BCV et BRCV lors de la réaction de la transcriptase inverse (RT) et de la réaction de la polymérase en chaîne (PCR) ont été choisies à partir des séquences publiées de la souche de référence Mebus du BCV (Tableau 3) (Kienzle *et al.*, 1990; Abraham *et al.*, 1991; numéros d'accès Gen Bank M 30612 et M 31053) .



**TABLEAU 3 : Amorces utilisées pour l'amplification des gènes HE et S1  
et des régions ORF4 et ORF5 des souches de coronavirus bovins.**

Amorce	Séquence	Région amplifiée
S1.Ad5 sens	5' <b>GGATCC GGATCC</b> <u>GCC GCC GCC</u> ATG TTT TTG ATA CTT TTA ATT TCC 3'	S1de la glycoprotéine S
S1. Ad5 antisens	5' <b>GGATCC GGATCC</b> TCA TCT ACG ACT TCG TCT TTT TG 3'	S1de la glycoprotéine S
HE.Ad5 sens	5' <b>GGATCC GGATCC</b> <u>GCC GCC GCC</u> ATG TTT TTG CTT CTT AGA TTT GTT C 3'	glycoprotéine HE
HE.Ad5 antisens	5' <b>GGATCC GGATCC</b> TCA CTA AGC ATC ATG CAG CCT AGT ACC 3'	glycoprotéine HE
BCV.5327 sens	5' <b>GGATCC GGATCC</b> ATG TGG TGG TTG TTG TGA TGA 3'	ORF4 et ORF5
BCV.ORF4 as	5' <b>GAATTC GAATTC</b> AAC GTC ATC CAC ATC AAG AAC 3'	ORF4 et ORF5

Les caractères en gras représentent les sites de restriction des enzymes *Bam*HI (GGATCC) et *Eco*RI (GAATTC).

La région soulignée représente la séquence de Kosak qui favorise l'expression des protéines dans le système eucaryote (Kosak,1987).

### 3.6.4 Réaction de transcription inverse

Un volume de 5  $\mu\text{l}$  d'ARN viral était ajouté à un mélange de 6  $\mu\text{l}$  d' $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC et de 2  $\mu\text{l}$  d'une amorce antisens diluée à 25 picomoles (pmol) par  $\mu\text{l}$  servant à amplifier la région désirée. Les tubes étaient ensuite chauffés à 70°C pendant 10 min afin de dénaturer l'ARN puis, rapidement refroidi sur de la glace pendant 3 min pour permettre l'appariement des amorces. Un volume de 6  $\mu\text{l}$  d'un mélange réactionnel contenant 2  $\mu\text{l}$  de 2'-déoxyribonucléoside 5'-triphosphates (dNTP; GIBCO) à une concentration de 10 mM, 1  $\mu\text{l}$  d'ARN guard, 2  $\mu\text{l}$  de dithiothréitol (DTT; GIBCO) et 4  $\mu\text{l}$  d'une solution de 5X First Strand buffer (GIBCO) était ajouté aux eppendorfs et ces derniers étaient incubés à 37°C pour 3 min. Après l'ajout de 1  $\mu\text{l}$  de l'enzyme transcriptase inverse du virus Moloney de la leucémie murine (RT; GIBCO), le mélange était incubé à 42°C pour 1 heure afin de permettre la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc). Finalement, l'enzyme était inactivé par une incubation des tubes à 95°C pour 5 min.

### 3.6.5 Réaction de polymérase en chaîne

Un volume de 2  $\mu\text{l}$  d'ADNc était tout d'abord déposé dans un eppendorf avec 18  $\mu\text{l}$  d' $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC. Dans un second tube, un mélange de 60,7  $\mu\text{l}$  d' $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC, 2  $\mu\text{l}$  de dNTP (10mM), 2  $\mu\text{l}$  d'une amorce sens diluée à 25 pmol/ $\mu\text{l}$  et 2  $\mu\text{l}$  d'une amorce anti-sens diluée à 25 pmol/ $\mu\text{l}$  étaient combinés ensemble. Ce dernier mélange était ensuite ajouté au 20  $\mu\text{l}$  contenant l'ADNc, en plus d'un mélange de 15,3  $\mu\text{l}$  contenant 10  $\mu\text{l}$  de tampon de PCR 10X (GIBCO), 5  $\mu\text{l}$  de chlorure de magnésium ( $\text{MgCl}_2$ ; GIBCO) et 0,3  $\mu\text{l}$  de Taq DNA polymérase (GIBCO). Finalement, 2 gouttes d'huile minérale (Fisher Scientific Ltd) étaient déposées à la surface du mélange réactionnel. Les tubes étaient par la suite placés dans un thermocycler (DNA Thermal Cycler, Perkin-Elmer) pour y effectuer 35 cycles de la réaction de la polymérase en chaîne (PCR). Au cours des 5

premiers cycles, les tubes étaient soumis à des étapes de dénaturation à 94<sup>0</sup>C pendant 1 min, d'hybridation à 42<sup>0</sup>C pendant 1 min et d'élongation de 1min 30 sec à 72<sup>0</sup>C. Les 30 derniers cycles étaient similaires aux premiers à l'exception de l'étape d'hybridation qui s'effectuait alors à 55<sup>0</sup>C. Finalement, une étape d'élongation supplémentaire de 10 min à 72<sup>0</sup>C était exécutée pour épuiser l'enzyme.

### **3.6.6 Électrophorèse en gel d'agarose**

Tout d'abord, de l'agarose (Boehringer Mannheim) était préparé à une concentration finale de 1% dans un tampon Tris-acétate-EDTA (TAE). Le tampon TAE 50X consistait en 242 grammes (g) de Tris Base (Boehringer Mannheim), 100 ml de EDTA 0,5M et 70 ml d'acide acétique glaciale (Fisher Scientific Ltd) dans un volume total de 1 litre (L). L'agarose était dissout dans le TAE 1X à la chaleur (au micro-ondes pendant 3 min) puis, refroidi jusqu'à TP. Afin de permettre la coloration des fragments d'ADN, un volume de 50 µl de bromure d'éthidium (EtBr; BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, É-U) était aussi ajouté. Après durcissement du gel, 10 µl de chaque échantillon de produit de PCR était déposé dans des puits pour électrophorèse. La migration était effectuée à 105 volts (V) pendant 45 min. La grandeur en longueur des amplicons était déterminée selon leur distance de migration en comparaison à celle de fragments d'ADN du marqueur étalon (1 kb DNA ladder; GIBCO) de longueur connue.

Lorsque désiré, les produits de PCR étaient ensuite purifiés par une extraction au phénol-chloroforme et précipitation avec 2 volumes d'EtOH 100% et 10% d'acétate de sodium (NaAc) 3M. Les culots d'ADN amplifié étaient alors resuspendus dans 50 µl de Tris-HCl 10 mM à un pH de 8,5.

### 3.7 CLONAGE DES GÈNES HE, S1 ET DES RÉGIONS ORF4 ET ORF5.

#### 3.7.1 Ligation

Les produits de PCR obtenus suite à l'amplification des gènes HE, S1 et des régions ORF4 et ORF5 de la souche de DH de référence du Québec BCQ.2590 ont été directement insérés dans un vecteur de clonage de type T (TA cloning system, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, É-U). Le vecteur de clonage pCR™ 2.1 bicaténaire possède une base T à chacune de ses extrémités 5' permettant facilement le clonage des produits amplifiés par la Taq DNA polymérase qui ajoute une base A en leurs extrémités 3'. La quantité d'ADN requise pour la ligation a été calculée selon la formule :

$$\text{Produit de PCR (ng)} = \frac{(\text{pb du produit de PCR}) (50 \text{ ng de vecteur pCR}^{\text{TM}} 2.1)}{\text{Grandeur du vecteur} = 3\,900 \text{ pb}}$$

Ainsi, la quantité requise de produit de PCR (entre 0,3 et 1 µl) a été ajoutée à 1 µl de tampon de ligation, 2 µl d'une solution de 25 mM du vecteur pCR™ 2.1 et 1 µl de ligase (T4 DNA ligase, Invitrogen). Le mélange a été complété par de l'H<sub>2</sub>O stérile jusqu'à un volume final de 10 µl. Les tubes ont ensuite été incubés à 14 °C pendant toute la nuit.

#### 3.7.2 Transformation

Par la suite, le mélange de ligation a été utilisé pour transformer des bactéries compétentes InvαF' One Shot fournies avec la trousse « TA cloning ». Dans un premier temps, un volume de 2 µl de 2-mercaptoéthanol était ajouté aux bactéries compétentes. Par la suite, 2 µl du mélange de ligation a été ajouté dans les cellules. Les tubes étaient ensuite placés sur la glace pour une période de 30 min puis, on effectuait un choc

thermique de 45 sec à 42 °C. Les tubes étaient par la suite placés sur la glace pour 2 min. Un volume de 250 µl du milieu SOC (2,0% tryptone, 0,5% d'extrait de levure, 10 mM NaCl, 5mM de chlorure de potassium (KCl), 10 mM MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>) et 20 mM de glucose) était ajouté et les tubes placés dans un agitateur (G24 Environmental Incubator, New Brunswick Scientific CO, Edison, NJ, É-U) à 225 rpm pour 60 min à 37 °C. Subséquemment, 50 et 200 µl de la suspension de bactéries transformées étaient étalés sur des pétris (Fisher Scientific Ltd). Ces pétris contenaient du milieu de culture Luria Bertani (LB; 1,0% tryptone (Difco Laboratories, Détroit, MI, É-U), 0,5% d'extrait de levure (Gibco), 1,0% NaCl à pH 7,0, 1,5% d'agar (Difco Laboratories) et 50 µg/ml de carbenicilline (Boehringer Mannheim). De plus, afin de permettre la sélection des clones, 40 µl d'une solution de 40 mg/ml de 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal; 400 mg (Boehringer Mannheim) dans 10 ml de diméthylformamide (Fisher Scientific Ltd) était étalée sur chaque pétri. Les pétris étaient finalement incubés à 37 °C pendant 18 heures pour permettre la croissance des bactéries sous la forme de colonies blanches ou bleues. Avant la sélection, les pétris étaient placés à 4°C pendant 2 à 3 heures pour bien faire ressortir la couleur des colonies.

### 3.7.3 Sélection des clones

Les clones recombinants ont été sélectionnés d'après leur résistance à la carbenicilline et leur couleur blanche. Pour vérifier la présence de plasmides recombinants, les bactéries choisies ont ensuite étéensemencées dans 4 ml de milieu LB contenant 100 µg/ml de carbenicilline et incubées à 37°C toute la nuit sous une agitation de 300 rpm. Le lendemain, un volume de 1,5 ml de la culture de bactéries était centrifugé dans un eppendorf de 1,5 ml à 10 060 X g pendant 5 min. Une fois le surnageant enlevé, un volume additionnel de 1,5 ml a subi le même traitement. Le culot d'ADN a ensuite été traité par lyse alcaline (Sambrook *et al.*, 1989).

### 3.7.4 Méthode de lyse alcaline

Le culot d'ADN obtenu en 3.7.3 était d'abord resuspendu vigoureusement dans un volume de 100  $\mu$ l de la solution I contenant 50 mM de glucose (Sigma Chemical CO), 25 mM Tris-HCl à pH 8,0 et 10 mM d'EDTA pH 8,0. Puis, 200  $\mu$ l de la solution de lyse (0,2 N d'hydroxide de sodium (NaOH; Fisher Scientific Ltd), 1,0 % de sodium dodécyl sulfate (SDS; Boehringer Mannheim)) était ajouté et les tubes étaient mélangés par inversion et laissés à TP pour un maximum de 5 min. Par la suite, la réaction de lyse était neutralisée suite à l'ajout, sous faible agitation, de 150  $\mu$ l de la solution III (60 ml d'acétate de potassium 5,0 M, 11,5ml d'acide acétique glaciale et 28,5 ml d'H<sub>2</sub>O) Après une incubation de 5 min sur la glace, les tubes étaient centrifugés à 10 000 X g pendant 15 min à 4<sup>0</sup>C puis, le surnageant était placé dans un nouveau tube, et mélangé à un volume égal de phénol-chloroforme pour en extraire l'ADN. Puis, l'ADN était précipité à -70<sup>0</sup>C par l'ajout de 2 volumes d'EtOH 100% et de 10% d'NaAc 3M à un pH de 5,6. Les tubes étaient ensuite centrifugés à 10 000 X g pendant 30 min à 4<sup>0</sup>C puis, les culots d'ADN étaient lavés et séchés de 5 à 10 min. Finalement, les culots étaient resuspendus dans 20  $\mu$ l de Tris-HCl 10mM pH 8,5 contenant 20  $\mu$ g de RNase A et placés à 37<sup>0</sup>C pendant 30 min.

### 3.7.5 Digestion enzymatique

Préalablement à la digestion, la concentration d'ADN plasmidique était mesurée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 260 nm en utilisant un volume de 4  $\mu$ l d'ADN préparé en 3.7.4 dilué dans 796  $\mu$ l d'H<sub>2</sub>O distillée. Une concentration de 100 ng/ $\mu$ l était ensuite digérée avec 1 à 5 unités d'endonucléase par  $\mu$ g d'ADN. Ainsi, de 3 à 5  $\mu$ l d'ADN étaient combinés avec 2  $\mu$ l de tampon One Phor All (OPA; GIBCO) et 1  $\mu$ l d'enzyme de restriction *Bam*HI (Pharmacia Biotech). Le mélange était complété à 10  $\mu$ l avec de l'H<sub>2</sub>O distillée. Les tubes étaient alors placés dans un bain-marie à 37<sup>0</sup>C pour 2

heures. L'ADN digéré était ensuite analysé par électrophorèse en gel d'agarose. La présence de l'insert désiré à l'intérieur du plasmide fut déterminé par la présence d'une bande sur le gel migrant à la distance correspondant à la longueur de l'insert. Les bactéries transformées par un plasmide recombinant furent sélectionnées en vue de leur amplification.

### 3.7.6 Production d'ADN purifié

La trousse commerciale d'extraction d'ADN « maxi-prep de QIAGEN » (QIAGEN Inc., Mississauga, ON, Canada) a été utilisée selon les directives du manufacturier. Un volume de 100 ml de milieu de culture LB supplémenté de 50 µg/ml de carbénicilline était d'abord déposé dans un erlenmeyer de 500 ml et inoculé avec des cellules bactériennes transformées. Les cultures étaient alors placées à 37°C sous une agitation de 300 rpm durant toute la nuit. Le lendemain, les bactéries étaient récupérées par une centrifugation de 6 000 X g (DAMON/International Equipment Company B-22 centrifuge) pendant 20 min à 4°C. Par la suite, les culots étaient resuspendus dans 10 ml de tampon P1 (50 mM Tris-HCl à pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) et transférés dans des nouveaux tubes de polycarbonate (Nalgene Oak Ridge, Fisher Scientific Ltd). Les cellules étaient ensuite lysées dans 10 ml de tampon P2 (200 mM NaOH, 1,0% SDS). Après un maximum de 5 min de contact, un volume de 10 ml de tampon de neutralisation P3 (3,0 acétate de potassium à un pH de 5,5) était ajouté. Suivant une incubation de 20 min sur la glace, les tubes étaient centrifugés à 20 000 X g pendant 30 min. Les surnageants étaient ensuite rapidement placés dans une colonne de résine échangeuse d'anions préalablement équilibrée avec le tampon QBT (750 mM NaCl, 50mM MOPS à pH7,0, 15% EtOH et 0,15% Triton X-100). La colonne était alors lavée avec 60 ml de tampon QC (1,0 mM NaCl, 50 mM MOPS à pH 7,0 et 15 % EtOH) puis, l'ADN était élué avec 15 ml de tampon QF (1,25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl à pH 8,5 et 15% EtOH). L'ADN de l'éluat était ensuite précipité par l'addition de 10,5 ml (0,7 volume) de 2-propanol et récupéré par centrifugation à 15 000 X g pour 30 min. Le

culot d'ADN était finalement lavé à l'EtOH 70%, recentrifugé à 15 000 X g pour 10 min, puis séché à l'air pendant 10 min. Finalement, l'ADN était resuspendu dans 300 µl de 10 mM Tris-HCl pH 8,5.

### 3.7.7 Séquençage

La concentration de la préparation d'ADN purifié a été déterminée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 260nm. La quantité appropriée d'ADN a ensuite été traitée pour le séquençage en utilisant une méthode modifiée de Sanger *et al.* (1977) basée sur l'arrêt de la synthèse de la double chaîne d'ADN suite à l'incorporation de résidus de didéoxynucléotides-triphosphate. Le séquençage a été effectué par le personnel du laboratoire de séquençage de l'INRS-Institut Armand-Frappier. Les diverses séquences de BCV et BRCV obtenues ont par la suite été analysées à l'aide du programme informatique GeneWorks 2.4 (IntelliGenetics Inc., Mountain View, CA, É-U).

## 3.8 EXPRESSION DES GLYCOPROTÉINES S1 ET HE

### 3.8.1 Adénovirus

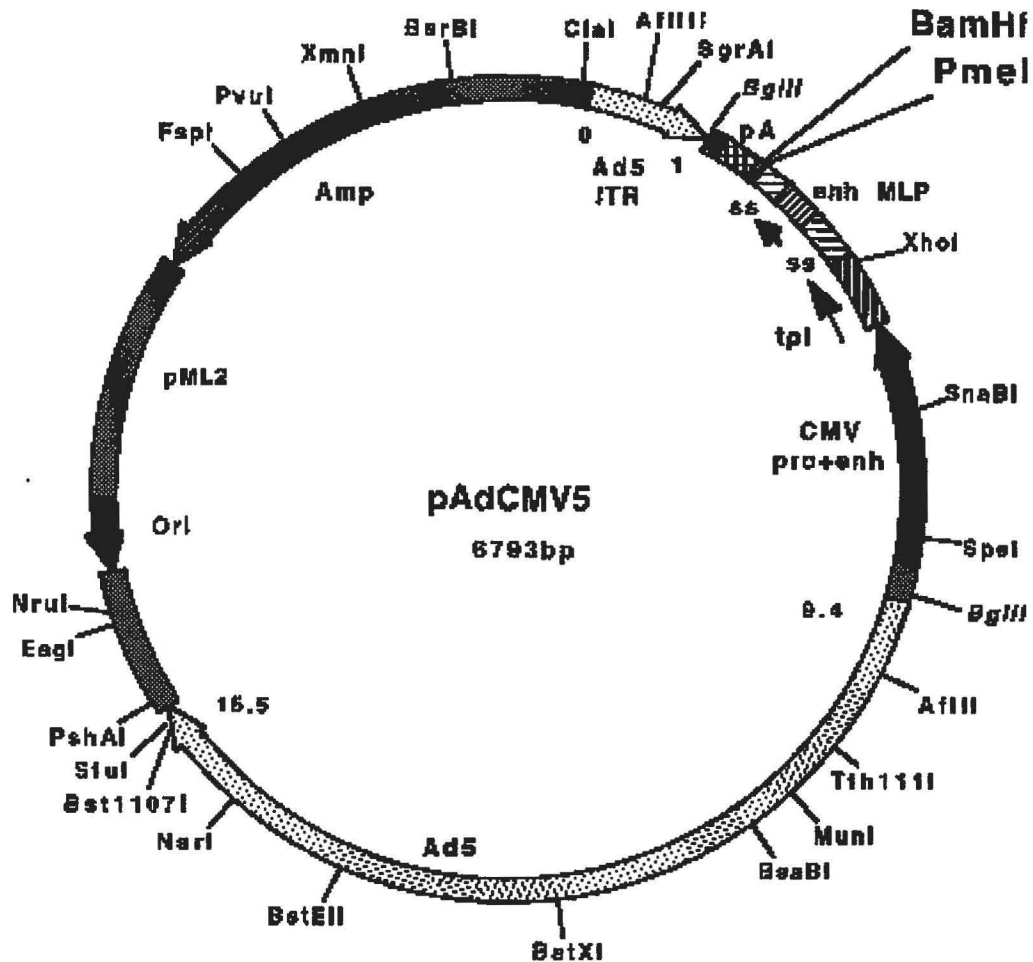
Les adénovirus sont des virus non enveloppés possédant une capsidie icosaédrique (Horne *et al.*, 1959). Ils sont pathogènes pour de nombreuses espèces animales dont l'homme. Il existe 5 groupes d'adénovirus chez l'humain : A, B, C, D et E. L'adénovirus de sérotype 5 (Ad5), très bien connu au niveau génétique et biochimique et très peu pathogène pour l'homme, est fréquemment utilisé comme vecteur d'expression (Lavery *et al.*, 1990). Le génome de l'Ad5 est caractérisé par un ADN bicaténaire linéaire de 36 000 pb possédant des séquences répétées inversées (ITR) à ses extrémités



(Maat *et al.*, 1980; Lippe *et al.*, 1989). De plus, l'Ad5 peut être multiplié à de hauts titres en culture cellulaire. Durant le cycle viral, on distingue deux phases d'expression des gènes: la phase précoce pendant laquelle sont exprimés les gènes codant pour les protéines associées à la réplication de l'ADN viral, suivie de la phase tardive où sont exprimées les gènes codant pour les protéines structurales et celles nécessaires à l'assemblage (Bridge *et al.*, 1991). Les régions précoces divisées en E1 à E4 correspondent à des gènes transcrits durant la première partie du cycle infectieux. La région E1 est celle qui a été la plus étudiée car elle est indispensable pour la réplication de l'ADN génomique et est aussi responsable du pouvoir transformant du virus. Ainsi, une délétion de la région E1 engendre un virus non-réplicatif, et peu ou même non pathogène (Ginsberg *et al.*, 1989). D'autre part, la région E3 n'est pas nécessaire à la croissance du virus mais joue un rôle dans l'échappement du virus aux défenses de l'hôte (Wold et Gooding, 1991).

Afin de vérifier l'expression génétique des deux glycoprotéines majeures d'enveloppe S1 et HE de la souche BCQ.2590, les gènes correspondant ont été sous-clonés dans le vecteur de transfert pAdCMV5 obtenu du Dr B. Massie (IRB) (Figure 3). Les plasmides recombinants ont été utilisés pour vérifier l'expression transitoire de ces deux glycoprotéines dans des cellules humaines 293. Dans le cas du gène HE, nous avons poursuivi les travaux amorcés par Ann Barbara Kourtesis (1998) sur la construction d'un adénovirus recombinant défectif pour la réplication, notamment les travaux sur l'identification sérologique du produit d'expression et ceux portant sur l'immunogénicité.

**FIGURE 3 : Carte génétique du vecteur de transfert pAdCMV5**



Les segments numérotés de 0 à 1 et de 9.4 à 15.5 sont les portions de l'adénovirus type 5 impliquées dans la recombinaison homologue afin de produire un adénovirus recombinant. Le vecteur de transfert possède un enhancer (enh) et un promoteur (pro) cytomégalovirus (CMV), un gène conférant la résistance à l'ampicilline (amp), un réplicon *E. coli* pML2, un site de polyadénylation (pA), un promoteur majeur tardif (MLP). Ss, signal d'épissage; ITR, séquences terminales inversées répétées, tpl, séquence de tête tripartite; Ori, origine de répliation dans les cellules *E. coli*. Les sites de restriction représentés sont les sites uniques présents dans l'AdCMV5.

Tiré de Massie *et al.*, 1998

## 3.8.2 Glycoprotéine S

### 3.8.2.1 Préparation de la sous-unité S1 du gène S

Le gène S1 (2 304 pb) de la souche de référence québécoise de DH : BCQ.2590 a d'abord été amplifié par PCR à l'aide des amorces S1Ad5/AS et S1Ad5/S. L'amorce sens contient un motif GCC répété à trois reprises correspondant à la séquence consensus de Kosak (Kosak, 1987) permettant un positionnement optimal de la polymérase et une transcription efficace du gène. De plus, les deux amorces utilisés possédaient à leur extrémité 5' deux sites *Bam*HI en tandem. Le produit de PCR a d'abord été inséré dans le vecteur pCR<sup>TM</sup>2.1 pour la transformation de bactéries compétentes tel que décrit dans les sections 3.7.1 et 3.7.2. Les colonies recombinantes ont été criblées par lyse alcaline et digérées par *Bam*HI. L'ADN des clones possédant l'insert S1 d'une longueur de 2 304 pb a été purifié tel que décrit en 3.6.6 par une extraction au phénol-chloroforme. Finalement, la quantité d'ADN a été dosée au spectrophotomètre.

### 3.8.2.2 Préparation du vecteur pAdCMV5

Un volume de 6 µl de pAdCMV5 (1,1 mg/ml) a été combiné à 1 µl de *Bam*HI, 4 µl de tampon OPA et 9 µl d'H<sub>2</sub>O. Ce mélange a été digéré à 37<sup>0</sup>C pendant 2 heures. Puis, un volume de 55.6 unités de phosphatase alcaline intestinal de veau (CIAP; GIBCO) dans 30 µl de la dilution appropriée du tampon de déphosphorylation (GIBCO) ont été ajoutés à la préparation du plasmide digéré. Une incubation de 30 min à 37<sup>0</sup>C a permis la déphosphorylation du vecteur. La CIAP a ensuite été inactivée par une extraction dans la solution phénol-chloroforme. Finalement, l'ADN précipité a été resuspendu dans un volume final de 20 µl de 10 mM Tris-HCl pH 8,5 et la quantité fut dosée au spectrophotomètre.

### 3.8.2.3 Plasmides recombinants pAdCMV5/ S1.DH

#### 3.8.2.3.1 Ligation

Un volume de 200 ng/ $\mu$ l du vecteur pAdCMV5 a été utilisé pour la ligation. Des rapports de vecteur:insert de 1:1, 1:3 et 1:6 ont été préparés. Un tube témoin ne contenant que le vecteur pAdCMV5 sans insert a également été préparé pour s'assurer que la déphosphorylation du vecteur avait bien été effectuée. Par la suite, les tubes contenant un mélange du vecteur et de l'insert, et le tube témoin, ont été incubés à 90<sup>0</sup>C pendant 2 min pour permettre la linéarisation des structures secondaires de la S1. Puis, 2  $\mu$ l d'un tampon de ligation 5X (GIBCO) et 1  $\mu$ l de ligase T4 (GIBCO) ont été ajoutés à chaque tube. Le volume final de 10  $\mu$ l a été complété avec de l'H<sub>2</sub>O et les mélanges de ligation ont été incubés à 16<sup>0</sup>C durant toute la nuit.

#### 3.8.2.3.2 Transformation

Un volume de chaque réaction de ligation correspondant à 10 ng de vecteur pAdMVCV5 fut d'abord dilué dans un volume final de 10  $\mu$ l. d'H<sub>2</sub>O stérile puis, ajouté à 75  $\mu$ l de bactéries compétentes (*E.coli* HB101, GIBCO). Les cellules ont ensuite été placées sur la glace pour une période de 30 min. Après un choc thermique à 42<sup>0</sup>C pendant 60 sec, les tubes ont été refroidis sur la glace pour 2 min et un volume de 450  $\mu$ l de milieu SOC a été ajouté. Les tubes, placés à l'horizontal, ont ensuite été incubés à 37<sup>0</sup>C sous une agitation d'environ 250 rpm pendant 1 heure. Finalement, 100  $\mu$ l de chaque mélange de transformation fut étalé sur des pétri LB contenant 50  $\mu$ g/ml de carbénicilline et les pétris furent incubés à 37<sup>0</sup>C pour une nuit.

### **3.8.2.3.3 Criblage des colonies transformées par le vecteur recombinant pAdCMV5/S1.DH**

Tout d'abord, 25 eppendorfs de 1,5 ml contenant chacun 25  $\mu$ l d' $H_2O$  stérile ont été préparés. Puis, 38 colonies bactériennes résistantes à la carbénicilline choisies au hasard ont été piquées avec un cure-dent stérile et resuspendues dans le tube d' $H_2O$ . Par la suite, un volume de 25  $\mu$ l d'une solution de tampon de lyse 2X (0,5 M EDTA à pH 8,0, 1,1% SDS final, 0,056% bleu de bromophénol, 3,5 ml glycérol et jusqu'à 22,5 ml d' $H_2O$ ), supplémenté le jour même de NaOH (0,1ml NaOH pour 0,9 ml de tampon de lyse 2X), a été ajouté aux tubes contenant les bactéries potentiellement recombinantes. Les échantillons ont alors été placés à TP pour 5 min puis, un volume de 25  $\mu$ l de chacun a été analysé sur gel d'agarose 1%. Les clones positifs présentaient un profil différent du vecteur déphosphorylé puisque la longueur du plasmide était augmentée de 2 400 pb correspondant à la longueur de l'insert incorporé. Les clones sélectionnés ont ensuite été mis en culture et ont subi une lyse alcaline tels que décrit en 3.7.3 et 3.7.4. Une digestion a alors été effectuée comme en 3.7.5 en utilisant toutefois les enzymes XhoI et MluI afin de déterminer l'orientation de l'insert. Il existe un site unique XhoI dans le vecteur pAdCMV5 situé à 355 nt en amont du site d'insertion BamHI. L'insert S1 ne contient pas le site de restriction XhoI, mais possède un site MluI unique à la position 537. Comme l'enzyme MluI ne coupe pas dans le vecteur de transfert pAdCMV5, un fragment de 893 pb observé suite à la digestion des plasmides recombinants pAdCMV5/S1.DH indiquait que l'insert était inséré dans la bonne orientation.

### **3.8.2.3.4 Purification d'ADN recombinant pAdCMV5/S1.DH**

Les plasmides recombinants contenant le gène S1 inséré dans le bon sens ont alors été purifiés par la technique maxi-prep (3.7.6), dosés au spectrophotomètre puis, séquencés.

### 3.8.2.4 Transfection des cellules 293

Les cellules 293 adhérentes ont été utilisées pour effectuer la transfection cellulaire. Les cellules ont été distribuées dans 3 plateaux de 6 puits à une concentration finale d'environ 250 000 cellules/ml dans du milieu DMEM contenant 1% de pénicilline/streptomycine, 1% de glutamine, 2% d'hépès et 5% de SFB. Le lendemain, lorsque les tapis cellulaires étaient confluents à environ 50 à 80%, la transfection était exécutée à l'aide de la trousse Fugene (Boehringer Mannheim). Tout d'abord, un volume de 3  $\mu$ l de solution Fugene a été ajouté à 97  $\mu$ l de milieu DMEM additionné d'antibiotiques mais ne contenant pas de SFB. Ce mélange fut ensuite laissé à TP pour 5 min. Puis, le mélange fut ajouté goutte à goutte dans un tube contenant déjà 2  $\mu$ g d'ADN (maxi S1). Le même traitement fut adopté pour un tube contenant l'ADN, du plasmide pAdCMV5 contenant le gène rapporteur GFP (green fluorescent protein) utilisé comme témoin pour la transfection. Ce vecteur témoin fut gracieusement obtenu du Dr B. Massie de l'IRB. Les tubes ont par la suite été mélangés doucement puis, laissés à TP pendant 15 min. Finalement, 100  $\mu$ l du mélange Fugene-ADN fut ajouté goutte à goutte à chaque puits des 3 plateaux de cellules 293 (1 puits témoin par plateau) et les plateaux furent subséquemment incubés à 37°C.

Suivant une période d'incubation de 24, 48 ou 96 heures, l'expression de la GFP fut vérifiée à l'aide d'un microscope à rayonnement ultra-violet (UV) (Leitz DM IL, Wetzlar, Allemagne) et les 3 plateaux de cellules furent fixés pendant 20 min à 4°C avec une solution d'acétone:méthanol (50:50). Puis, les plateaux furent asséchés sous une hotte chimique toute une nuit.

### **3.8.2.5 Test d'immunofluorescence indirecte**

L'expression transitoire de la protéine S1 a été vérifiée par immunofluorescence indirecte (IFI). Les plateaux de la section 3.8.5 ont d'abord tous été réhydratés dans du PBS pour 5 à 10 min. Puis, un volume de 300 µl d'anticorps polyclonal de lapin produit contre la souche BCQ.2590 dilué 1/100 dans du PBS fut ajouté à chaque puits. Les plateaux ont ensuite été placés sous légère agitation à TP pour 1 heure. Les cellules étaient ensuite rincées au PBS à six reprises et 300 µl de conjugué FITC IgG anti-lapin (dilué 1/100) (Boehringer Mannheim) était déposé dans chaque puits. Les plateaux étaient de nouveau placés sous agitation à TP pour une période d'une heure. Après 3 lavages dans du PBS et 3 lavages avec H<sub>2</sub>O, la présence de cellules fluorescentes était vérifiée sous le microscope UV.

### **3.8.3 Expression de la protéine HE par l'adénovirus recombinant**

#### **3.8.3.1 Purification et production de l'AdCMV5/HE.DH**

Tout d'abord, tous les clones AdCMV5/HE.DH obtenus par Ann B. Kourtesis ont été testés par IFI à l'aide des sérums polyclonaux hyperimmuns 5801 (anti-Mebus) et anti-2590. Le clone qui a démontré la plus grande fluorescence sous microscope UV a alors été clarifié puis, purifié par la technique de dilution limite. Le clone purifié choisi par la suite été testé de nouveau en IFI pour s'assurer que la protéine HE s'exprimait toujours après l'étape de purification. Puis, une grande production de ce clone a été effectuée dans des F150, titré et conservé à -80°C.

### 3.8.3.2 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)

La présence de la protéine HE dans les cellules 293 infectées par l'adénovirus recombinant AdCMV5/HE.DH a été vérifiée par SDS-PAGE en utilisant le système électrophorétique (Bio-Rad, Mississauga, Ont., Can.). Brièvement, un gel de séparation de polyacrylamide (12% (p/v) acrylamide/Bis, 0,38M Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % (v/v) SDS, 0,05% (p/v) persulfate d'ammonium, 0,05% (v/v) TEMED) a été coulé entre deux plaques de verre à une épaisseur de 0,75 millimètre. Lorsque polymérisé, un gel de regroupement (4% (p/v) acrylamide/Bis, 0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % (v/v) SDS, 0,05% (p/v) persulfate d'ammonium, 0,05% (v/v) TEMED) a été ajouté par dessus le gel de séparation.

Puis, des lysats de cellules 293 infectées avec l'adénovirus recombinant ou des lysats de cellules HRT-18G infectées avec le virus sauvage BCQ.2590 ont été préparés dans un tampon de lyse (100mM Tris-HCl à pH 7.6, 750mM NaCl, 5% NP-40, 2,5% DOC-sodium deoxycholate et 0,5% SDS). Les lysats cellulaires ont ensuite été passés immédiatement à travers une seringue de 18G à dix reprises avant d'être déposés sur glace pendant une heure, puis, clarifiés et bouillis 5 min à 100<sup>0</sup>C dans un tampon de dénaturation (0,05 M Tris-HCl pH 6,8, 8% (v/v) glycérol, 1,6% (p/v) SDS, 0,001% (p/v) bleu de bromophénol) en présence ou en absence de 5% (v/v) de 2-mercaptoéthanol. Les échantillons ont ensuite été placés dans les puits du gel de polyacrylamide et une charge de 200V a été appliquée pendant près de 4 heures dans un tampon d'électrophorèse (120 mM Tris, 1 M glycine, 0,5 (p/v) SDS).



### 3.8.3.3 Immunobuvardage de type Western

Les protéines séparées par SDS-PAGE ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose d'une porosité de 45  $\mu\text{m}$  (Bio-Rad) dans un appareil Trans Blot Cell (Bio Rad Labs). Le transfert a été effectué sous une charge constante de 60 V appliquée pendant 2 heures dans un tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM glycine pH 8,3, 20% (v/v) méthanol). Puis, les membranes ont été incubées avec agitation dans un tampon de blocage (TBS 0,05M à un pH de 9.6 contenant 1% de lait écrémé) pendant toute la nuit à TP.

Les membranes ont ensuite été incubées dans une solution de sérum de lapin hyperimmun anti-2590 diluée 1/100 dans le tampon de blocage pendant 1 heure avec agitation. Après 6 lavages de 5 minutes dans du TBS, une solution d'anti-IgG de lapin conjuguée à la peroxydase (1/1000 dans blotto1%) a été ajoutée sur les membranes pour une période de 1 heure à 37°C toujours sous agitation. Les membranes ont alors été lavées de nouveau dans du TBS. Finalement, les complexes immuns ont été révélés dans une solution contenant 20 ml de 4-chloro-1-naphtol (Sigma), 80 ml de TBS et 660  $\mu\text{l}$  de peroxyde d'hydrogène (Sigma). La réaction a été arrêtée par un lavage à l'H<sub>2</sub>O.

## 3.9 Immunisation et tests de détection des anticorps

### 3.9.1 Immunisation des souris

Un total de 10 souris Balb/C et 10 souris C3H femelles âgées de 5 à 7 semaines ont été utilisées pour l'immunisation. De ce nombre, 2 souris Balb/C et 2 souris C3H ont été inoculées avec 50  $\mu\text{l}$  d'adénovirus recombinant AdCMV5/HE.DH de façon intradermique alors qu'un groupe contrôle a reçu 50  $\mu\text{l}$  d'AdCMV5/GFP. Afin d'augmenter la réponse obtenue, 10  $\mu\text{g}$  d'un plasmide recombinant pcDNA3 contenant le gène de

l'interleukine 2 (pcDNA3/IL-2) murin et une dose de 50 µg d'oligonucléotides contenant des motifs GpC non-méthylés (GpC) a été administré à chacune des souris (25µg de GpC B : GCT AGA CGT TAG CGT et 25 µg de GpC C : TCA ACG TT; Klinman *et al.*, 1999). Ces séquences GpC favorisent la production d'IgG (particulièrement IgG2a), de même que la sécrétion d'interféron  $\gamma$  (Klinman *et al.*, 1999; Gursel *et al.*, 1999; Lewis *et al.*, 1999). Aussi, un volume égal au mélange d'ADN de la solution Sp1017 (Supratek, Laval) agissant comme transporteur a été inoculé à chaque animal.

De plus, les plasmides recombinants pAdCMV5/HE et pAdCMV5/S1 ont parallèlement été utilisés pour immuniser génétiquement chacun 2 souris Balb/C et 2 souris C3H, en plus du plasmide pAdCMV5 servant de contrôle. Chacune des souris a reçu une dose intra-dermique correspondant à 25 µg de plasmide, recombinant ou non, couplé à 50 µg de CpG et 10 µg de pcDNA3/IL-2. Finalement, un volume égal de Sp1017 (Supratek) a été ajouté au mélange d'ADN.

Après une période correspondant à 15 jours post-infection, un échantillon de sang de chaque souris a été récolté et ce dernier a été centrifugé à 1 600 X g à 4<sup>0</sup>C pendant 30 min afin d'en séparer le sérum. Une deuxième dose de chaque virus ou plasmide recombinant a par la suite été administrée à chaque souris 15 jours p.i.. Finalement, un deuxième échantillon de sang a été prélevé sur chaque souris au jour 28 p.i.

Les sérums correspondant aux jours 15 et 28 p.i. ont ensuite été testés par des tests d'IF, d'IHA, de séroneutralisation, d'immunobuvardage de type Western et d'ELISA.

### 3.9.2 ELISA indirecte

Le virus BCQ.2590 purifié a été dilué 1/10 000 dans du tampon carbonate/bicarbonate 0,1 M à pH 9,6 contenant 62.8 ml d'une solution de 84 g par litre de sodium bicarbonate et 12.4 ml d'une solution de 106 g par litre de sodium carbonate dans un volume total de 1 litre. Un volume de 100µl de ce mélange a été réparti dans chaque puits d'un plateau Linbro (ICN) et le plateau a été placé pour toute une nuit à 4<sup>0</sup>C. Après avoir vidé le contenu du plateau, ce dernier a été lavé à deux reprises avec une solution de PBS contenant 0,05% de Tween 80. Le blocage des sites libres non-spécifiques a ensuite été effectué à 37<sup>0</sup>C pendant 2 heures avec 100 µl par puits d'une solution de PBS contenant 5% de sérum de chèvre et 0,5% de Tween 20. Par la suite, chaque sérum obtenu suite à l'immunisation a été dilué de 1/50 à 1/3200 dans une solution de PBS contenant 1% de blotto, 5% sérum de chèvre et 0,5% Tween 20. Un volume de 100 µl par puits de chaque dilution de sérum a été déposé dans le plateau et incubé à 37<sup>0</sup>C pendant 45 minutes. Suite à cinq lavages avec une solution de PBS-Tween 80 0,05%, on ajoute 100 µl par puits du conjugué anti-souris POD (ICN) dilué 1/5000 dans le même tampon ayant servi pour les dilutions des sérums. Le plateau a ensuite été placé à 37<sup>0</sup>C pendant 45 minutes, puis lavé à trois reprises avec une solution de PBS-Tween 80 0,05% et deux fois avec une solution de PBS.

La révélation a été effectuée à TP avec une solution composée d'un volume égal de tampon 3,3' 5,5'-tetraméthyl-benzidine (TMB; Sigma) contenant 0,025 g de TMB, 31,25 ml de diméthyl sulfoxyde (DMSO; Fisher) et 93,75 ml de tampon citrate ( 87.5g de citrate de Na 2H<sub>2</sub>O (Fisher), 3 g d'acide citrique (ICN) et 500 ml d' H<sub>2</sub>O) et de tampon substrat composé de 0,125g de peroxyde d'urée (Sigma) et 125 ml de tampon citrate. Après 20 min, la réaction fut arrêtée et la D.O. d'une longueur d'onde de 450 nm fut déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre (Bio-Tek Instruments, Vermont, É-U).

### 3.9.3 Test de séroneutralisation

Des dilutions sérielles des sérums obtenus suite à l'immunisation ont été préparées dans du milieu de culture DMEM sans sérum contenant 10 U/ml de trypsine et déposées dans un plateau de 96 puits. Puis, un volume de 25 µl de suspension virale, ajustée à une concentration de 400 DICT<sub>50</sub>, a été ajouté dans chaque cupule d'un plateau de 96 puits. Après une incubation de 90 min à TP, les mélanges de suspension virale et de dilution des différents sérums ont été inoculés sur les feuillets cellulaires HRT-18G d'un plateau de 96 puits à fond plat. Les feuillets cellulaires ont ensuite été incubés à 37<sup>0</sup>C pendant une période d'environ 5 jours puis, fixés avec une solution de méthanol contenant 1% de peroxyde d'hydrogène (Fisher). Les titres neutralisants des sérums ont été évalués après coloration des feuillets cellulaires par la technique d'immunoperoxydase.

#### 3.9.3.1 Immunoperoxydase

Un volume de 100 µl d'anticorps polyclonal de lapin produit contre la souche BCQ.2590 dilué 1/100 dans du PBS a été ajouté à chaque puits du plateau contenant les feuillets cellulaires fixés en 3.9.3. Le plateau a ensuite été placé sous légère agitation à 37<sup>0</sup>C pendant 1 heure. Les feuillets cellulaires étaient alors rincés au PBS à trois reprises et un volume de 100 µl d'une préparation d'immunoglobulines de chèvre (100 mg/ml) anti-IgG de lapin marquées à la peroxydase de rainfort (Sigma) était déposé dans chaque puits. Les plateaux ont de nouveau été placés sous agitation à 37<sup>0</sup>C pour une période de 2 heures. Après trois lavages dans du PBS, les feuillets étaient recouverts d'une solution de révélation (0,05 mg/ml de 3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochlorure (DAB; Sigma) à un pH de 7.6 contenant 0,03% de peroxyde d'hydrogène). La réaction était arrêtée avec de l'H<sub>2</sub>O distillée et les titres neutralisants étaient observés au microscope photonique à inversion.

## **RÉSULTATS**

## **4.1 Production et propagation des souches virales**

Les isolats de coronavirus entériques et respiratoires ont été propagés sur les cellules HRT-18G dans un milieu de culture supplémenté de trypsine pancréatique bovine. La destruction des feuillettes cellulaires était observée 3 à 5 jours après l'infection. Les titres infectieux des virus variaient de  $10^{6.5}$  à  $10^{8.5}$  DITC<sub>50</sub>/ml selon les isolats de BCV et BRCV.

## **4.2 Propriétés biologiques et enzymatiques**

### **4.2.1 Activité hémagglutinante et activité destructrice de récepteurs**

La capacité d'hémagglutiner les érythrocytes de rats après une période d'incubation de 2 heures à 4<sup>0</sup>C fut déterminée pour chaque isolat de coronavirus associé soit à la dysenterie d'hiver, la diarrhée néonatale du veau ou à des problèmes respiratoires (Tableau 4). Les titres d'hémagglutination à 4<sup>0</sup>C variaient de 640 à 5 120 pour tous les isolats. Toutefois, lorsque les plateaux étaient placés à 37<sup>0</sup>C pour une période additionnelle de 2 heures, les titres HA des isolats associés à la DH chutaient sensiblement de 1280/2560 à 320/160. La souche de DH BCQ.2590 s'est avérée posséder un titre RDE égal à 16, le plus élevé de tous les isolats. L'activité hémagglutinante des isolats de DNV était peu ou faiblement influencée par la température d'incubation alors que les titres HA des BRCV ne subissaient aucune variation. Outre les isolats associés à la DH, seule la souche de DNV BCQ.1523 possédait une activité RDE égale à 2 et donc la capacité de détruire les récepteurs de la cellule-hôte.

**TABLEAU 4 : Différentiation des isolats de coronavirus bovins selon leur activité hémagglutinante (HA) à différentes températures et leur activité destructrice de récepteur (RDE)**

Isolat	Pathologie	Titre HA 4 <sup>0</sup> C*	Titre HA 37 <sup>0</sup> C*	Titre RDE**
Mebus	DNV	2560	2560	1
BCQ.2590	DH	2560	160	16
BCQ.7373	DH	1280	320	4
BCQ.571	DNV	640	640	1
BCQ.1523	DNV	640	320	2
OK-0514-3	BRCV	1280	1280	1
BCO.43277	BRCV	2560	2560	1
BCO.44175	BRCV	2560	2560	1
BCQ.3994	BRCV	5120	5120	1

\* Les titres HA furent évalués selon la réciproque de la plus haute dilution de virus produisant une agglutination complète des érythrocytes de rats après une incubation de 2 heures à 4<sup>0</sup>C ou à 37<sup>0</sup> C

\*\* Les titres RDE correspondent au rapport du titre HA obtenu à 4<sup>0</sup>C sur celui obtenu à 37<sup>0</sup>C. Un titre RDE de 1 indique qu'il n'y a aucune variation entre les titres HA mesurés aux différentes températures

#### 4.2.2 Inhibition de l'hémagglutination

Les AcMo 1D6-2, 1D6-3 et 9F2-1R, produits antérieurement dans le laboratoire du Dr S. Dea (Milane *et al.*, 1997), sont dirigés contre la glycoprotéine HE de la souche de référence de DH québécoise, BCQ.2590. Ils ont tous la capacité d'inhiber l'activité HA de la souche homologe. Les activités croisées de ces AcMo et du sérum de lapin 5801 dirigé contre la souche de référence Mebus ont été testées afin de vérifier leur capacité à pouvoir différencier les isolats de BCV associés soit à la DH, la DNV ou à des problèmes respiratoires (Tableau 5). D'après les résultats des analyses effectuées par inhibition de l'hémagglutination, ces AcMo ont montré très peu de réactivité contre les souches Mebus et BCQ.571, les titres IHA étant inférieurs à 1/40. Par contre, des titres IHA égaux ou supérieurs à 2 560 ont été obtenus avec les AcMo 1D6-2 et 1D6-3 pour tous les autres isolats. Toutefois, l'AcMo 9F2-1R n'a démontré qu'une très faible réactivité envers les souches respiratoires ontariennes (BCO.43277 et BCO.44175).

#### 4.2.3 Activité acétyl-estérase

L'activité acétyl-estérase est responsable de l'inactivation des récepteurs des cellules-hôtes utilisés par les coronavirus hémagglutinants. La capacité de chaque isolat à cliver le groupe acétyl du récepteur de la cellule-hôte est mesuré par le relâchement d'acétate à partir du substrat. Le PNPA est utilisé comme substrat pour l'enzyme acétyl-estérase dans cette épreuve. Une augmentation de la densité optique (DO) de la solution, après une incubation de 5 min à TP indique le relâchement d'acétate du PNPA. L'activité AE des isolats de BCV variait de 1.481 à 2.608 (Tableau 6). La souche BCQ.2590 possédait le titre le plus élevé et Mebus, le titre le plus faible.



**TABLEAU 5: Réactivité croisée des anticorps monoclonaux dirigés contre la glycoprotéine HE de la souche BCQ.2590 du coronavirus bovin et du sérum polyclonal hyperimmun 5801 (anti-Mebus) envers différents isolats de BCV associés à la DH, la DNV et des problèmes respiratoires tel que démontrée par des tests d'IHA**

Isolat	Pathologie	titre IHA des AcMo ou d'antisérum*			
		1D6-2	1D6-3	9F2-1R	Lapin 5801
Mebus	DNV	40	40	40	640
BCQ.2590	DH	2560	5120	5120	160
BCQ.7373	DH	10240	5120	5120	320
BCQ.571	DNV	<20	<20	<20	160
BCQ.1523	DNV	10240	10240	5120	640
OK-0514-3	BRCV	5120	5120	5120	320
BCO.43277	BRCV	5120	5120	40	320
BCO.44175	BRCV	5120	5120	80	320

\* Les titres IHA ont été déterminés selon la réciproque de la plus haute dilution sérique d'antisérum ou d'AcMo capable d'inhiber l'hémagglutination de 8 unités HA du virus après une incubation de 2 heures à 4<sup>0</sup>C.

**Tableau 6: Activité acétyl-estérase (AE) des différents isolats de BCV associés à la DH, la DNV ou des problèmes respiratoires**

Isolat	Pathologie	Titre AE*
Mebus	DNV	1,481
BCQ.2590	DH	2,608
BCQ.7373	DH	2,181
BCQ.571	DNV	1.782
BCQ.1523	DNV	1,950
OK-0514-3	BRCV	2,202
BCO.43277	BRCV	2,178
BCO.44175	BRCV	2,170
BCQ.3994	BRCV	2,110

\* Les titres d'activité AE ont été déterminés après une incubation de 5 min à TP en présence d'une solution de 1 mM de PNPA. La lecture de la densité optique a été prise à un longueur d'onde de 405 nm.

### **4.3 Amplification et clonage des gènes HE et S1 ainsi que des régions ORF4 et ORF5 des différents isolats de coronavirus et analyses des séquences obtenues**

#### **4.3.1 Gène codant pour la glycoprotéine HE**

##### **4.3.1.1 Amplification des gènes HE par PCR et purification de l'ADN**

Les gènes HE de trois isolats de BRCV (OK-0514, BCO.43277, BCO.44175) et de la souche de référence Mebus ont été amplifiés par la technique de PCR en utilisant les amorces HE.Ad (sens) et HE.Ad (antisens), spécifiques au gène HE. Le gène HE des isolats de DH (BCQ.2590, BCQ.7373) et de DNV (BCQ.571, BCQ.1523) avaient déjà été amplifiés et analysés par Ann B. Kourtesis (1998). Les produits de PCR des isolats de BRCV et de Mebus ont ensuite été analysés par électrophorèse en gel d'agarose. Les amplicons obtenus migraient tous à une position de 1 300 pb comparativement à un marqueur de poids moléculaire, correspondant à la grandeur attendue du gène HE. Par la suite, au moins deux produits de PCR de chaque isolat, provenant de deux extractions d'ARN indépendantes, ont été purifiés par une extraction au phénol-chloroforme pour des fins de comparaison.

##### **4.3.1.2 Analyses des séquences**

###### **4.3.1.2.1 Comparaison des séquences nucléotidiques du gène HE**

Les séquences nucléotidiques des gènes HE de trois souches de BRCV ont été comparées à celles de la souche de référence Mebus (numéro d'accès Gen Bank M30612), à la souche de référence québécoise de DH BCQ.2590 (numéro d'accès L38962), à la souche de DNV BCQ.571 (numéro d'accès L38964) ainsi qu'aux séquences du gène HE des isolats BCQ.7373 et BCQ.1523 obtenues par Ann B. Kourtesis (1998). Les résultats de la comparaison ont démontré que le gène HE de

chaque isolat contient 1 272 nt (Figure 4a). Ainsi, aucune délétion, insertion ou changement de cadres de lecture n'a été observé.

Les séquences des gènes HE des deux isolats de BRCV ontariens (BCO.43277 et BCO.44175) ont présenté 22 substitutions de nt communes lorsque comparées à la séquence du gène HE de la souche Mebus. De ces 22 changements, 20 ont aussi été observés dans la séquence du gène HE de la souche de BRCV de référence OK-0514.

**FIGURE 4a : Variations observées dans les séquences nucléotidiques des gènes HE de souches associées à des problèmes respiratoires**

Les séquences nucléotidiques des souches OK-0514, BCO.43277 et BCO.44175 ont été comparées à celle de la souche DNV de référence Mebus (ATCC). Les séquences ont été analysées à l'aide du programme d'analyse de séquences Geneworks 2.4 (IntelliGenetics). La séquence consensus est composée du nucléotide le plus commun à chaque position. Les points (...) indiquent que le nucléotide présent à cette position est identique à celui de la séquence consensus. Seuls les changements de nucléotides sont décrits pour chaque souche. Les codons de départ et d'arrêt de la traduction sont soulignés.

Consensus	<u>ATGTTTTG</u> C	TTCCTAGATT	TGTTCTAGTT	AGCTGCATAA	TTGGTAGCCT	50
Mebus	.....T.....	.....	.....	.....	.....	50
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	50
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	50
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	50
Consensus	AGGTTTTGAC	AACCCCTCCTA	CCAATGTTGT	TTCGCATTTA	AATGGAGATT	100
Mebus	.....T.....	.....	.....	.....	.....	100
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	100
BCO.43277	.....T.....	.....	.....	.....	.....	100
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	100
Consensus	GGTTTTTATT	TGGTGACAGT	CGTTCAGATT	GTAATCATGT	TGTTACTACC	150
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....A.....	150
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	150
BCO.43277	.....	.....	.....G.....	.....	.....	150
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	150
Consensus	AACCCCGTA	ATTATCTTA	TATGGACCTT	AATCCTGCCT	TGTGTGGTTC	200
Mebus	.....	.....	.....	.....C.....	.....A.....	200
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	200
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	200
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	200
Consensus	TGGTAAAATA	TCATCTAAAG	CTGGCAACTC	CATTTTTAGG	AGTTTTCACT	250
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	250
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	250
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	250
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	250
Consensus	TTACCGATTT	TTATAATTAC	ACAGGCGAAG	GTCAACAAAT	TATTTCTAT	300
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....T.....	300
OK-0514	.....T.....	.....	.....	.....	.....	300
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	300
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	300
Consensus	GAGGGTGTTA	ATTTTACGCC	TTATCATGCC	TTTAAATGCA	CCACTTCTGG	350
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	350
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	350
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	350
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	350
Consensus	TAGTAATGAT	ATTTGGATGC	AGAATAAAGG	CTTGTTTTAC	ACTCAGGTTT	400
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	400
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	400
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	400
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	400

Consensus	ATAAGAATAT	GGCTGTGTAT	CGCAGCCTTA	CTTTTGTTAA	TGTACCATAT	450
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	450
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	450
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	450
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	450
Consensus	GTTTATAATG	GCTCTGCACA	ATCTACAGCC	CTTTGTAAAT	CTGGTAGTTT	500
Mebus	.....	.....	.....T	.....	.....	500
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	500
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	500
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	500
Consensus	AGTTCTTAAT	AACCCTGCAT	ATATAGCTCG	TGAAGCTAAT	TTTGGGGATT	550
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	550
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	550
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	550
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	550
Consensus	ATTATTATAA	GGTTGAAGCT	GATTTTTATT	TGTCAGGTG	TGACGAGTAT	600
Mebus	.....	.....	.....C.....	.....	.....	600
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	600
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	600
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	600
Consensus	ATCGTACCAC	TTTGTATTTT	CAACGGCAAG	TTTTTGTCGA	ATACAAAGTA	650
Mebus	.....	.....	T.....	.....	.....	650
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	650
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	650
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	650
Consensus	TTATGATGAT	AGTCAATATT	ATTTAATAA	AGACACTGGT	GTTATTTATG	700
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	700
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	700
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	700
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	700
Consensus	GTCTCAATTC	TACTGAAACC	ATTACCACTG	GTTTTGATT	TAATTGTCAT	750
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	750
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	750
BCO.43277	.....	.....	.....	.....C.....	.....	750
BCO.44175	.....	.....	.....	.....C.....	.....	750
Consensus	TATTTAGTTT	TACCCTCTGG	TAATTATTTA	GCCATTTCAA	ATGAGCTATT	800
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	800
OK-0514	.....C	.....	.....	.....	.....	800
BCO.43277	.....C	.....	.....	.....	.....	800
BCO.44175	.....C	.....	.....	.....	.....	800

Consensus	GTTAACTGTT	CCTACGAAAG	CAATCTGTCT	TAATAAGCGT	AAGGATTTTA	850
Mebus	.....	.....	.....	.....C.....	.....	850
OK-0514	.....	.....T.....	.....	.....	.....	850
BCO.43277	.....	.....T.....	.....	.....	.....	850
BCO.44175	.....	.....T.....	.....	.....	.....	850
Consensus	CGCCTGTACA	GGTTGTTGAT	TCACGGTGGA	ACAATGCCAG	GCAGTCTGAT	900
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	900
OK-0514	.....	.....C.....	.....G.....	.....	.....	900
BCO.43277	.....	.....	.....G.....	.....	.....	900
BCO.44175	.....	.....	.....G.....	.....	.....	900
Consensus	AACATGACGG	CAGTTGCTTG	TCAACCCCG	TACTGTTATT	TTCGTAATTC	950
Mebus	.....	...G.....	.....	.....	.....	950
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	950
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	950
BCO.44175	.....	.....	.....	.....C.....	.....	950
Consensus	TACTACCAAT	TATGTTGGTG	TTTATGATAT	CAATCATGGG	GATGCTGGTT	1000
Mebus	.....C.....	.....	.....	.....	.....	1000
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	1000
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	1000
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	1000
Consensus	TTACTAGCAT	ACTCAGTGGT	TTGTTATATG	ACTCACCTTG	TTTTTCGCAG	1050
Mebus	.....	.....	.....	...T.....	.....	1050
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	1050
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	1050
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	1050
Consensus	CAAGGTGTTT	TTAGGTATGA	TAATGTTAGC	AGTGTCTGGC	CTCTCTACCC	1100
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....TT..	1100
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	1100
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	1100
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	1100
Consensus	CTATGGCAGA	TGCCCTACTG	CTGCTGATAT	TAATACCCT	GATGTACCTA	1150
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	1150
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	1150
BCO.43277	.....	T.....	.....	.....	.....	1150
BCO.44175	.....	T.....	.....	.....	.....	1150



Consensus	TTTGTGTGTA	TGATCCGCTA	CCAATTATTT	TGCTTGGCAT	TCTTTTGGGT	1200
Mebus	.....	.....	.....C.....	.....	C.....	1200
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....A.....	1200
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	1200
BCO.44175	.....	.....	.....	.....T.....	.....	1200

Consensus	GTTGCGGTCA	TAATTATTGT	AGTTTTGTTG	TTATATTTTA	TGGTGGATAA	1250
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	1250
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	1250
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	1250
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	1250

Consensus	TGGTACTAGG	CTGCATGATG	<u>CTTAG</u>			1275
Mebus	.....	.....	.....			1275
OK-0514	.....	.....	.....			1275
BCO.43277	.....	.....	.....			1275
BCO.44175	.....	.....	.....			1275

#### 4.3.1.2.2 Analyse des séquences d'acides aminés de la glycoprotéine HE des isolats de BRCV

Les séquences d'acides aminés des différents isolats de BRCV ont été comparées entre elles, et avec celles des souches de BCV associées à la DH ou la DNV analysées dans le mémoire de Ann B. Kourtesis (1998). La figure 4b illustre les séquences d'acides aminés des différents isolats de BRCV comparativement à la souche prototype Mebus (ATCC). Pour chaque isolat, une protéine de 424 résidus d'acides aminés a été obtenue. La majorité des substitutions de nucléotides présentes dans les séquences des isolats de BRCV étudiés affectaient la troisième position du codon n'entraînant ainsi aucune variation d'acide aminé par rapport à la souche de référence Mebus (Tableau 7).

Cependant, tout comme décrit précédemment pour les souches de DH (BCQ.2590, BCQ.7373) et de DNV (BCQ.571, BCQ.1523), une première substitution Leu-Pro a aussi été identifiée à la position 5, au niveau du peptide signal, et une deuxième à la position 367 où une sérine est remplacée par une proline pour toutes les souches de BRCV. Un autre groupe de chercheurs avait déjà observé précédemment ces mutations pour la souche hautement virulente BCV LY-138 (Zhang *et al.*, 1991b). Les autres changements sont situés à la position 392 où une leucine est remplacée par une isoleucine pour tous les isolats sauf BCQ.2590 et Mebus. Un changement d'un résidu asparagine pour une thréonine fut également observé en position 49 pour tous les isolats de BRCV, les souches BCQ.7373 et BCQ.1523. Une seule variation semble spécifique aux coronavirus respiratoires, soit l'aa en position 66 où un acide aspartique est substitué par une glycine. Deux substitutions semblent uniques à la souche OK-0514, soient les résidus 139 et 400, où une valine est remplacée par une glycine et une glycine est changée pour une sérine, respectivement. Finalement, le changement d'une leucine pour une phénylalanine (aa 394) se retrouve uniquement dans la séquence de la souche BCO.44175.

**FIGURE 4b: Comparaison des séquences d'acides aminés de la glycoprotéine HE d'isolats de BRCV à celle de la souche de référence Mebus.**

Les séquences d'acides aminés des souches BRCV OK-0514, BCO.43277 et BCO.44175 ont été déduites de leurs séquences nucléotidiques et comparées à la souche DNV de référence Mebus. Les séquences ont été analysées à l'aide du programme d'analyse de séquences Geneworks 2.4 (IntelliGenetics). La séquence consensus est présentée en haut et seuls les changements d'acides aminés observés sont décrits pour chaque souche.

Consensus	MFLLPFVLV	SCIIGSLGFD	NPPTNVVSHL	NGDWFLFGDS	RSDCNHVVTT	50
Mebus	.....L.....	.....	.....	.....	.....N...	50
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	50
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	50
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	50
Consensus	NPRNYSYMDL	NPALCGSGKI	SSKAGNSIFR	SFHFTDFYNY	TGEGQQIIFY	100
Mebus	.....	.....D.....	.....	.....	.....	100
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	100
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	100
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	100
Consensus	EGVNFTPYHA	FKCTTSGSND	IWMQNKGLFY	TQVYKNMAVY	RSLTFVNVVY	150
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	150
OK-0514	.....	.....	.....	.....G...	.....	150
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	150
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	150
Consensus	VYNGSAQSTA	LCKSGSLVLN	NPAYIAREAN	FGDYKVEA	DFYLSGCDEY	200
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	200
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	200
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	200
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	200
Consensus	IVPLCIFNGK	FLSNTKYDD	SQYFKNKDTG	VIYGLNSTET	ITTGFDFNCH	250
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	250
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	250
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	250
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	250
Consensus	YLVLPSTNYL	AISNELLLTV	PTKAICLNKR	KDFTPVQVVD	SRWNNARQSD	300
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	300
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	300
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	300
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	300
Consensus	NMTAVACQPP	YCYFRNSTTN	YGVYDINHG	DAGFTSILSG	LLYDSPCFSQ	350
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	350
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	350
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	350
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	350

Consensus	QGVFRYDNVS	SVWPLYPYGR	CPTAADINTP	DVPICVYDPL	PIILLGILLG	400
Mebus	.....	.....S.....	.....	.....	..L.....	400
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....S.....	400
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	400
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....F.....	400

Consensus	VAVIIIVVLL	LYFMVDNGTR	LHDA			424
Mebus	.....	.....	.....			424
OK-0514	.....	.....	.....			424
BCO.43277	.....	.....	.....			424
BCO.44175	.....	.....	.....			424

**TABLEAU 7 : Variations observées dans les séquences d'acides aminés de la glycoprotéine HE d'isolats de BRCV comparativement à celles d'isolats de DNV et DH**

Acide aminé	Pathologie et isolats							
	Mebus (ATCC)	DNV		DH		OK-0514	BRCV	
		BCQ.571	BCQ.1523	BCQ.2590	BCQ.7373		BCO.43277	BCO.44175
5	L	P	P	P	P	P	P	P
8	V	*	*	A	*	*	*	*
11	S	*	C	*	*	*	*	*
49	N	*	T	*	T	T	T	T
53	R	*	*	P	*	*	*	*
66	D	*	*	*	*	G	G	G
139	V	*	*	*	*	G	*	*
182	G	*	*	*	R	*	*	*
245	F	*	*	*	L	*	*	*
282	D	*	*	*	G	*	*	*
344	D	*	*	A	*	*	*	*
350	Q	*	*	R	*	*	*	*
367	S	P	P	P	P	P	P	P
392	L	I	I	*	I	I	I	I
394	L	*	*	*	*	*	*	F
400	G	*	*	*	*	S	*	*

Toutes les souches furent comparées à la souche de référence Mebus. Les substitutions d'acides aminés des souches BCQ.2590, BCQ.7373, BCQ.571 et BCQ.1523 par rapport à la souche de référence proviennent des résultats obtenus par Ann B. Kourtesis (1998). Un astérisque (\*) indique que le résidu est identique avec celui de la souche Mebus

## **4.3.2 Gène codant pour la glycoprotéine S**

### **4.3.2.1 Amplification de la sous-unité S1 du gène S par PCR**

Les isolats choisis pour l'analyse moléculaire de la sous-unité S1 du gène S provenaient de cas de DH (BCQ.2590 et BCQ.7373), de DNV (BCQ.571 et BCQ.1523) et de problèmes respiratoires (OK-0514, BCO.43277 et BCO.44175). Les amorces S1.Ad5 sens et S1.Ad5 antisens ont permis l'amplification par la technique de PCR d'un fragment d'environ 2 300 pb comparativement au marqueur de poids moléculaire pour tous les isolats étudiés.

### **4.3.2.2 Analyses des séquences**

#### **4.3.2.2.1 Comparaison des séquences nucléotidiques de la sous-unité S1 du gène S**

Au niveau nucléotidique, les résultats obtenus montrent que la sous-unité S1 du gène S de chaque isolat de BCV contient 2 304 nt (Figure 5a). Ainsi, aucune délétion, insertion ou changement de cadres de lecture n'a été déterminé pour les isolats étudiés.

Pour chacun des isolats, un total de 38 (BCQ.2590), 46 (BCQ.7373), 34 (BCQ.571), 48 (BCQ.1523), 45 (OK-0514), 53 (BCO.43277) et 42 (BCO.44175) substitutions nucléotidiques ont pu être observées par rapport à la souche Mebus provenant de l'ATCC. Les séquences correspondant au site de clivage par la trypsine des sous-unités S1 et S2 de la glycoprotéine S étaient bien préservées chez tous les isolats comparés.

**FIGURE 5a : Variations observées dans les séquences nucléotidiques des sous-unités S1 des gènes S de souches associées à la DH, la DNV ou des problèmes respiratoires**

Les séquences nucléotidiques des souches BCQ.2590, BCQ.7373, BCQ.571, BCQ.1523, OK-0514, BCO.43277 et BCO.44175 ont été comparées à celle de la souche DNV de référence Mebus (ATCC). Les séquences ont été analysées à l'aide du programme d'analyse de séquences Geneworks 2.4 (IntelliGenetics). La séquence consensus est composée du nucléotide le plus commun à chaque position. Les points (...) indiquent que le nucléotide présent à cette position est identique à celui de la séquence consensus. Seuls les changements de nucléotides sont décrits pour chaque souche. Le codon de départ est souligné, de même que le site de clivage par la trypsine de S1/S2.



Consensus	<u>ATGTTTTTGA</u>	TACTTTTAAT	TTCCTTACCA	ACGGCTTTTG	CTGTTATAGG	50
Mebus	.....	.....	.....	..T.....	.....	50
BCQ. 2590	.....	.....	.....	.....	.....	50
BCQ. 7373	.....	.....	.....	..A.....	.....	50
BCQ. 571	.....	.....	.....	..T.....	.....	50
BCQ. 1523	.....	.....	.....	.....	.....	50
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	50
BCO. 43277	.....	.....	.....	.....	.....	50
BCO. 44175	.....	.....	.....	.....	.....	50
Consensus	AGATTTAAAG	TGTACTACAG	TTTCATTAA	TGATGTTGAC	ACTGGTGTC	100
Mebus	.....	.....G..	.....	.....	....C.....C....	100
BCQ. 2590	.....	.....	.....	.....	.....	100
BCQ. 7373	.....	.....	.....	.....	.....	100
BCQ. 571	.....	.....G..	.....	.....A.....	....C.....	100
BCQ. 1523	.....	.....	.....	.....	.....	100
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	100
BCO. 43277	.....	.....	.....	.....	.....	100
BCO. 44175	.....	.....	.....	.....	.....	100
Consensus	CTTCTATTAG	CACTGATACT	GTCGATGTTA	CTAATGGTTT	AGGTACTTAT	150
Mebus	.....	.....T..	.....	.....	.....	150
BCQ. 2590	.....	.....	.....	.....	.....	150
BCQ. 7373	.....T...C.....	.....	.....	.....	.....	150
BCQ. 571	.....	.....	.....	.....	.....	150
BCQ. 1523	.....	.....	.....	.....	.....	150
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	150
BCO. 43277	.....	.....	.....	.....	.....	150
BCO. 44175	.....	.....	.....	.....	.....	150
Consensus	TATGTTTTAG	ATCGTGTGTA	TTAAATACT	ACGTTGTTGC	TTAATGGTTA	200
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	200
BCQ. 2590	.....	.....	.....	.....	.....	200
BCQ. 7373	.....	.....	.....	.....	.....	200
BCQ. 571	.....	.....	.....	.....	.....	200
BCQ. 1523	.....	.....	.....	.....	.....	200
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	200
BCO. 43277	.....	.....	.....	.....	.....	200
BCO. 44175	.....	.....	.....	.....	.....	200
Consensus	CTACCCTACT	TCAGGTCTA	CATATCGTAA	TATGGCACTG	AAGGGACTT	250
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	250
BCQ. 2590	.....	.....	.....	.....	.....	250
BCQ. 7373	.....	.....	.....	.....	.....	250
BCQ. 571	.....	.....	.....	.....	.....	250
BCQ. 1523	.....	.....	.....	.....	.....	250
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	250
BCO. 43277	.....T.....	.....	.....	.....	.....	250
BCO. 44175	.....	.....	.....	.....	.....	250

Consensus	TACTATTGAG	CACACTATGG	TTTAAACCAC	CTTTTCTTTC	TGATTTTACT	300
Mebus	.....	....G.....	.....	.....	.....T..	300
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	.....	300
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....	300
BCQ.571	.....	....G.....	.....	.....	.....GT..	300
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....	300
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	300
BCO.43277	.....	.....G.....	.....	.....	.....	300
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	300
Consensus	AATGGTATTT	TTGCTAAGGT	CAAAAATACC	AAGGTTATTA	AAGATGGTGT	350
Mebus	.....	.....	.....	.....	....A..G.....	350
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	.....	350
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....	350
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	....A..G.....	350
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....	350
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	350
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	350
BCO.44175	.....	.....	.....	.....G.....	.....	350
Consensus	AATGTATAGT	GAGTTTCCTG	CTATAACTAT	AGGTAGTACT	TTTGTAATA	400
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	400
BCQ.2590	....A.....	.....	.....	.....	.....	400
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....	400
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	.....	400
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....	400
OK-0514	....A.....	.....	.....	.....	.....	400
BCO.43277	....A.....	.....	.....	.....	.....	400
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	400
Consensus	CATCCTATAG	TGTGGTAGTA	CAACCACATA	CTACCAATTT	GGATAATAAA	450
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	450
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	.....	450
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....	450
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	.....	450
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	...T..G.....	450
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	450
BCO.43277	.....	.....	.....	.....T.....	T.....	450
BCO.44175	.....	.....	.....	.....T.....	T.....	450
Consensus	TTACAAGGTC	TCTTAGAGAT	CTCTGTTTGC	CAGTATACTA	TGTGCGAGTA	500
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	500
BCQ.2590	.....T.....	.....	.....	.....	.....	500
BCQ.7373	.....T.....	.....	.....	.....	.....	500
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	.....	500
BCQ.1523	.....T.....	.....	.....	.....	.....	500
OK-0514	.....	.....	T.....	.....	.....	500
BCO.43277	.....	.....	T.....	.....	.....	500
BCO.44175	.....	.....	T.....	.....	.....	500

Consensus	CCCAAATACG	ATTGT..ATC	CTAATCTGGG	TAATC..ACGC	GTA..AACTAT	550
Mebus	.....C.....	.....C.....	.....	.....AA.....	.....G.....	550
BCQ.2590	.....	.....A.....	.....	.....C.A.....	.....A.....	550
BCQ.7373	.....	.....C...T	.....	.....C.A.....	.....A.....	550
BCQ.571	.....C.....	.....A.....	.....	.....G.....	.....A.....	550
BCQ.1523	.....	.....C.....	.....C.....	.....A.....	.....A.....	550
OK-0514	.....	.....A.....	.....	.....A.....	.....G.....	550
BCO.43277	.....	.....A.....	.....	.....CAA.....	.....G.....	550
BCO.44175	.....	.....A.....	.....	.....G.....	.....G.....	550
Consensus	GGCATTGGGA	TACAGGTGTT	GTTTCCTGTT	TATATAAGCG	TAATTCACA	600
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	600
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....C.....	.....	600
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....C.....	.....	600
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	.....	600
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....C.....	.....	600
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....C.....	600
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	600
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	600
Consensus	TATGATGTGA	ATGCTGATTA	TTGTATTTC	CATTTTTATC	AAGAAGGTGG	650
Mebus	.....	.....	C.....	.....	.....	650
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	.....A.....	650
BCQ.7373	.....	.....	C.....T	.....	.....A.....	650
BCQ.571	.....	.....	C.....	.....	.....A.....	650
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....A.....	650
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	650
BCO.43277	.....	.....	.....T	.....	.....	650
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	650
Consensus	TACTTTTTAT	GCATATTTTA	CAGACACTGG	TGTTGTTACT	AAGTTTCTGT	700
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	700
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	.....	700
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....	700
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	.....	700
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....	700
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	700
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	700
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	700
Consensus	TTAATGTTTA	TTTAGGCACG	GTGCTTTCAC	ATTATTATGT	CATGCCTTGG	750
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....C.....	750
BCQ.2590	.....	.....	.....C.....	.....	.....	750
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....	750
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	.....	750
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....T.....	750
OK-0514	.....	.....	.....A.....	.....	.....	750
BCO.43277	.....	.....	.....C.....	.....	.....	750
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	750

Consensus	ACTTGTAATA	GTGCTATGAC	TTAGAATAT	TGGGTTACAC	CTCTCACTTC	800
Mebus	.....TC.....	.....	.....	.....	.....	800
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	.....	800
BCQ.7373	.....	.....	.....A.....	.....	.....	800
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	.....	800
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....	800
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	800
BCO.43277	.....	.....C..G..	.....	.....	..C.....	800
BCO.44175	.....	.....C.....	.....	.....	..C.....	800
Consensus	TAAACAATAT	CTACTA...CTT	TCAATCAAAA	TGGTGTATT	TTTAATGCTG	850
Mebus	.....	T.....G.....	.....G..	.....	.....	850
BCQ.2590	.....	.....C.....	.....	.....	.....	850
BCQ.7373	.....	.....C.....	.....	.....	.....	850
BCQ.571	.....	.....C.....	.....	.....	.....	850
BCQ.1523	.....	.....C.....	.....	.....	.....	850
OK-0514	.....	.....G.....	.....G..	.....	.....	850
BCO.43277	.....	.....G.....	.....	C.....	.....	850
BCO.44175	.....	.....G.....	.....G..	C.....	.....	850
Consensus	TTGATTGTAA	AAGTGATTTT	ATGAGTGAGA	TTAAGTGTAA	AACACTATCT	900
Mebus	.....	G.....	.....	.....	.....	900
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	.....	900
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....	900
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	.....	900
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....	900
OK-0514	.....	G.....	.....	.....	.....	900
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	900
BCO.44175	.....	G...C.....	.....	.....	.....	900
Consensus	ATAGCACCAT	CTACTGGTGT	TTATGAATTA	AACGGTTACA	CTGTTCAGCC	950
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	950
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	.....	950
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....	950
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	.....	950
BCQ.1523	.....	.....	.....A.....	..G.....	.....	950
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	950
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	950
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	950
Consensus	AATTGCAAAT	GTTTACCGAC	GTATACCTAA	TCTTCCCGAT	TGTAATATTG	1000
Mebus	.....G.....	.....	.....	.....	.....A..	1000
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	.....	1000
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....	1000
BCQ.571	.....	.....	.....	.....A.....	.....A..	1000
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....	1000
OK-0514	.....G.....	.....	.....	.....	.....	1000
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	1000
BCO.44175	.....G.....	.....	.....	.....	.....C.....	1000



Consensus	CTATAGAATT	GATACTACTG	CTACAAGTTG	TCAGTTGTAT	TATAATTTAC	1300
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	1300
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	.....	1300
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....C.....	1300
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	.....	1300
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....	1300
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	1300
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	1300
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	1300
Consensus	CTGCTGCTAA	TGTTTCTGTT	AGCAGGTTTA	ATCCTTCTAC	TTGGAATAGG	1350
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	1350
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....T.....	.....	1350
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....	1350
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	.....	1350
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....	1350
OK-0514	.....	.....C.....	.....	.....T.....	.....	1350
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	1350
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	1350
Consensus	AGATTTGGTT	TTACAGAACA	ATCTGTTTTT	AAGCCTCAAC	CTGCAGGTGT	1400
Mebus	.....	.....	.....T.....	.....	.....T.....	1400
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	.....	1400
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....	1400
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	.....	1400
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....	1400
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	1400
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	1400
BCO.44175	.....	.....	.....T.....	.....	.....	1400
Consensus	TTTTACTGAT	CATGATGTTG	TTTATGCACA	ACATTGTTTT	AAAGCTCCCA	1450
Mebus	.....C.....	.....	.....	.....	.....T.....	1450
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	.....	1450
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....	1450
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	.....	1450
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....C.....	.....	1450
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	1450
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	1450
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	1450
Consensus	CAAATTTCTG	TCCGTGTAAG	TTGGATGGGT	CTTTGTGTGT	AGGTA..TGGT	1500
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....A.....	1500
BCQ.2590	.....	.....	A.....	.....	.....A.....	1500
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....G.....	1500
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	.....G.....	1500
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....A.....	1500
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....G.....	1500
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....G.....	1500
BCO.44175	.....	.....T.....	.....	.....	.....G.....	1500

Consensus	CCTGGTATAG	ATGCTGGTTA	TAAAAATAGT	GGTATAGGCA	CTTGTCCTGC	1550
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	1550
BCQ. 2590	.....	.....	.....C.....	.....C.....	.....	1550
BCQ. 7373	T.....	.....	.....C.....	.....C.....	.....	1550
BCQ. 571	T.....	.....	.....	.....	.....	1550
BCQ. 1523	.....	.....	.....C.....	.....C.....	.....	1550
OK-0514	T.....	.....	.....C.....	.....	.....	1550
BCO. 43277	T.....	.....	.....C.....	.....	.....	1550
BCO. 44175	T.....	.....	.....C.....	.....	.....	1550

Consensus	AGGTACTAAT	TATTTAACTT	GCCATAATGC	TGCCCAATGT	AATTGTTTGT	1600
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	1600
BCQ. 2590	.....	.....	.....	.....	.....	1600
BCQ. 7373	.....	.....	.....	.....	.....	1600
BCQ. 571	.....	.....	.....	.....T.....	.....	1600
BCQ. 1523	.....	.....	.....	.....	GG.....	1600
OK-0514	.....	.....	.....	.....	GG.....	1600
BCO. 43277	.....	.....	.....	.....	G.....	1600
BCO. 44175	.....	.....	.....	.....	.....	1600

Consensus	GCACTCCAGA	CCCCATTACA	TCTAAAGCTA	CAGGGCCTTA	CAAGTGCCCC	1650
Mebus	.....C.....	.....	.....T.....	.....	.....	1650
BCQ. 2590	.....	.....	.....T.....	.....	.....	1650
BCQ. 7373	.....	.....	.....	.....	.....	1650
BCQ. 571	.....	.....	.....	.....T..C.....	.....	1650
BCQ. 1523	.....	.....	.....	.....	.....	1650
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	1650
BCO. 43277	.....C.....	.....	.....	.....A..	.....	1650
BCO. 44175	.....C.....	.....	.....	.....	.....	1650

Consensus	CAAACATAAT	ATTTAGTTGG	CATAGGTGAG	CACTGTTCGG	GTCTTGCTAT	1700
Mebus	.....	...C.....	.....	.....	.....	1700
BCQ. 2590	.....	...C.....	.....	.....	.....	1700
BCQ. 7373	.....	.....	.....	.....	.....	1700
BCQ. 571	.....	.....	.....	.....	.....	1700
BCQ. 1523	.....	.....	.....	.....	.....	1700
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	1700
BCO. 43277	.....	.....	T.....	.....	.....	1700
BCO. 44175	.....	.....	.....	.....	.....	1700

Consensus	TAAAAGTGAT	TATTGTGGAG	GTAATCCTTG	TACTTGCCAA	CCACAAGCAT	1750
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	1750
BCQ. 2590	.....	.....	.....	.....	.....	1750
BCQ. 7373	.....C	C.....	.....	C.....	.....	1750
BCQ. 571	.....	C.....	.....	.....	.....	1750
BCQ. 1523	.....	.....	.....C.....	.....	.....	1750
OK-0514	.....	.....	.....C.....	.....G.....G..	.....	1750
BCO. 43277	.....	.....	.....	.....G.....	.....	1750
BCO. 44175	.....	C.....	.....	.....G.....	.....	1750

Consensus	TTTTGGGTTG	GTCTGTTGAC	TCTTGTTTAC	AAGGGGATAG	GTGTAATATT	1800
Mebus	.....C.....	.....	.....	.....	.....	1800
BCQ. 2590	.....C.....	.....	.....	.....	.....	1800
BCQ. 7373	.....	.....	.....	.....	.....	1800
BCQ. 571	.....C.....	.....	.....C.....	.....	.....	1800
BCQ. 1523	.....G.....	.....	.....C.....	.....	.....	1800
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	1800
BCO. 43277	.....	.....	.....	.....	.....	1800
BCO. 44175	.....	.....	.....	.....	.....	1800

Consensus	TTTGCTAATT	TTATTTTGCA	TGATGTTAAT	AGTGGTACTA	CTTGTTCTAC	1850
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	1850
BCQ. 2590	.....	.....	.....	.....	.....	1850
BCQ. 7373	.....	.....	.....	.....	.....C.....	1850
BCQ. 571	.....	.....	.....	.....	.....	1850
BCQ. 1523	.....	.....C.....	C.....	.....	.....	1850
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	1850
BCO. 43277	.....	.....	.....	.....	.....	1850
BCO. 44175	.....	.....	.....	.....	.....	1850

Consensus	TGATTTACAA	AAATCAAACA	CAGACATAAT	TCTTGGTGTT	TGTGTTAATT	1900
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	1900
BCQ. 2590	.....	.....	.....	.....	.....	1900
BCQ. 7373	.....	.....	.....	.....	.....	1900
BCQ. 571	.....	.....	.....	.....	.....	1900
BCQ. 1523	.....	.....	.....	.....	.....	1900
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	1900
BCO. 43277	.....	.....	.....	.....	.....	1900
BCO. 44175	.....	.....	.....	.....	.....	1900

Consensus	ATGATCTTTA	TGGTATTACT	GGCCAAGGTA	TTTTTGTGTA	GGTTAATGCG	1950
Mebus	.....	.....A	.....	.....	.....	1950
BCQ. 2590	.....	.....	.....	.....	.....	1950
BCQ. 7373	.....C.....	.....	.....	.....	.....	1950
BCQ. 571	.....	.....G	.....	.....	.....	1950
BCQ. 1523	.....	.....	.....	.....	.....	1950
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	1950
BCO. 43277	.....	.....	.....G..	.....	.....	1950
BCO. 44175	.....	.....	.....	.....	.....	1950

Consensus	ACTTATTATA	ATAGTTGGCA	GAACCTTTTA	TATGATTCTA	ATGGTAATCT	2000
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	2000
BCQ. 2590	.....	.....	.....	.....	.....	2000
BCQ. 7373	.....	.....	.....	.....	.....	2000
BCQ. 571	.....	.....	.....	.....	.....	2000
BCQ. 1523	.....	.....	.....	.....	.....	2000
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	2000
BCO. 43277	.....	.....	.....	.....	C.....	2000
BCO. 44175	.....	.....	.....	.....	.....	2000





Site clivage trypsine S1/S2

				↓		
Consensus	ACAGTAGGTA	GTGGTTACTG	TGTGGATTAC	TCTAC <u>AAAAA</u>	<u>GACGAAGTCG</u>	2300
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	2300
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	.....	2300
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....	2300
BCQ.571	.....	.....	.....T.....	.....	.....	2300
BCQ.1523	.....	.....	.....T.....	.....	.....	2300
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	2300
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	2300
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	2300
Consensus	<u>TAGA</u>					2304
Mebus	.....					2304
BCQ.2590	.....					2304
BCQ.7373	.....					2304
BCQ.571	.....					2304
BCQ.1523	.....					2304
OK-0514	.....					2304
BCO.43277	.....					2304
BCO.44175	.....					2304

#### 4.3.2.2.2 Analyse des séquences d'acides aminés de la sous-unité S1 de la glycoprotéine S des isolats de BCV

L'ensemble des variations observées dans la sous-unité S1 de la glycoprotéine S de tous les isolats étudiés est présenté dans la figure 5b. Chaque séquence contient 768 acides aminés représentant la partie N-terminale du gène S incluant le site de clivage à la trypsine (KRRSRR). Tout comme pour le gène HE, la majorité des substitutions de nucléotides furent observées pour le troisième nucléotide des codons, c'est pourquoi la majorité des changements résultaient en mutations silencieuses.

Le tableau 8 présente les 7 variations d'acides aminés qui semblaient être spécifiques aux BCV associés à des infections entériques. La substitution d'un résidu alanine pour une proline (aa 273) ne fut notée que pour les isolats entériques (DNV, DH), et non pour les isolats de BRCV comme dans le cas de la souche atténuée Mebus. De plus, le changement d'un acide aspartique par une valine (aa 759) ne fut observé uniquement que chez les deux souches de DNV. Pour les deux souches associées à la DH, la substitution d'une lysine par une asparagine fut retrouvée à la position 196. Les autres variations se retrouvaient autant dans les sous-unités S1 des souches de DH et dans celles des souches de DNV.

Les variations d'acides aminés retrouvées uniquement chez les souches de BCV ayant un tropisme plutôt respiratoire sont rapportées dans le tableau 9. Trois de ces changements (aa 256, aa 362 et aa 691) sont retrouvés seulement dans la sous-unité S1 des souches respiratoires ontariennes. Deux autres substitutions (aa 510 et aa 578) sont retrouvées chez les 3 souches de BRCV. D'ailleurs, ces 2 dernières variations avaient été rapportées antérieurement par Chouljenko et collaborateurs (1998) comme étant spécifiques aux souches respiratoires. Toutefois, cette même équipe avait identifié 9 autres substitutions (aa 11, aa 100, aa 115, aa 118, aa 173, aa 179, aa 465, aa 531 et aa 543) qui semblaient être rencontrées seulement chez les souches respiratoires. Ces

variations identifiées par le groupe de Chouljenko et collaborateurs (1998) n'ont pas paru être spécifiques aux souches respiratoires puisqu'elles se retrouvaient soit dans les souches de DNV ou de DH, ou même les deux. Le site de clivage à la trypsine était bien préservé chez tous les isolats étudiés.

**FIGURE 5b: Comparaison des séquences d'acides aminés de la sous-unité S1 de la glycoprotéine S d'isolats de BCV.**

Les séquences d'acides aminés des souches BCQ.2590, BCQ.7373, BCQ.571, BCQ.1523, OK-0514, BCO.43277 et BCO.44175 ont été déduites de leurs séquences nucléotidiques et comparées à celle de la souche DNV de référence Mebus (ATCC). Les séquences ont été analysées à l'aide du programme d'analyse de séquences Geneworks 2.4 (IntelliGenetics). La séquence consensus est présentée en haut et seuls les changements d'acides aminés observés sont décrits pour chaque souche.

Consensus	MFLILLISLP	TAFAVIGDLK	CTTVSINDVD	TGVPSISTDT	VDVTNGLGTY	50
Mebus	.....	M.....	.....	...A.....I	.....	50
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	.....	50
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....FT.....	.....	50
BCQ.571	.....	M.....	.....I..	.....	.....	50
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....	50
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	50
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	50
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	50
Consensus	YVLDRVYLNT	TLLNGYYPT	SGSTYRNMAL	KGTLLLSTLW	FKPPFLSDFT	100
Mebus	.....	.....	.....	.....R.....	.....I	100
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	.....	100
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....	100
BCQ.571	.....	.....	.....	.....R.....	.....V	100
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....	100
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	100
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	100
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	100
Consensus	NGIFAKVKNT	KVIKDGVMYS	EFPAITIGST	FVNTSYSVVV	QPHTTNLDNK	150
Mebus	.....	.....K.....	.....	.....	.....	150
BCQ.2590	.....	.....K.....	.....	.....	.....	150
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....	150
BCQ.571	.....	.....K.....	.....	.....	.....	150
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....FG.....	150
OK-0514	.....	.....K.....	.....	.....	.....	150
BCO.43277	.....	.....K.....	.....	.....	.....F.....	150
BCO.44175	.....	.....V.....	.....	.....	.....F.....	150
Consensus	LQGLLEISVC	QYTMCEYPNT	ICPNLGN.R	VELWHWDTGV	VSCLYKRNFT	200
Mebus	.....	.....H..	.....H.....K..	.....	.....	200
BCQ.2590	.....F.....	.....	.....Q..	..K.....	.....N.....	200
BCQ.7373	.....F.....	.....	.....HS.....Q..	..K.....	.....N.....	200
BCQ.571	.....	.....H..	.....R..	..K.....	.....	200
BCQ.1523	.....F.....	.....	.....H..T.....Q..	..K.....	.....	200
OK-0514	.....	.....	.....Q..	.....	.....	200
BCO.43277	.....	.....	.....K..	.....	.....	200
BCO.44175	.....	.....	.....R..	.....	.....	200

Consensus	YDVNADYLYF	HFYQEGGTFY	AYFTDTGVVT	KFLFNVYLG	VLSHYVMPL	250
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....L.....	250
BCQ.2590	.....	.....K.....	.....	.....	.....	250
BCQ.7373	.....	.....K.....	.....	.....	.....	250
BCQ.571	.....	.....K.....	.....	.....	.....	250
BCQ.1523	.....	.....K.....	.....	.....	.....	250
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	250
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	250
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	250
Consensus	TCNSAMTLEY	WVTPLTSKQY	LLAFNQNGVI	FNAVDCKSDF	MSEIKCKTLS	300
Mebus	.....S.....	.....	.....D.....	.....	.....	300
BCQ.2590	.....	.....	.....P.....	.....	.....	300
BCQ.7373	.....K.....	.....	.....P.....	.....	.....	300
BCQ.571	.....	.....	.....P.....	.....	.....	300
BCQ.1523	.....	.....	.....P.....	.....	.....	300
OK-0514	.....	.....	.....D.....	.....	.....	300
BCO.43277	.....LA.....	.....	.....	.....	.....	300
BCO.44175	.....L.....	.....	.....D.....	.....	.....	300
Consensus	IAPSTGVYEL	NGYTVQPIAN	VYRRIPNLPN	CNIEAWLNDK	SVPSPLNWER	350
Mebus	.....	.....D.....	.....	.....	.....	350
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	.....	350
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....L.....	.....	350
BCQ.571	.....	.....	.....N.....	.....	.....	350
BCQ.1523	.....N.....	S.....	.....	.....	.....K.....	350
OK-0514	.....	.....D.....	.....	.....	.....	350
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	350
BCO.44175	.....	.....D.....	.....	.....	.....	350
Consensus	KTFSNCFNM	SSLMSFIQAD	SFTCNNIDAA	KIYGMCFSSI	TIDKFAIPNG	400
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	400
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	.....	400
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....	400
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	.....	400
BCQ.1523	.....	T.....	.....	.....	.....	400
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	400
BCO.43277	.....	.....T.....	.....	.....	.....V.....	400
BCO.44175	.....	TT.....	.....	.....	.....	400
Consensus	RKVDLQLGNL	GYLQSFNYRI	DTTATSCQLY	YNLPAANVSV	SRFNPSTWNR	450
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	450
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	.....I.....	450
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....	450
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	.....	450
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....	450
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....I.....	450
BCO.43277	G.....	.....	.....	.....	.....	450
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	450

Consensus	RFGFTEQSVF	KPQPAGVFTD	HDVVYAQHCF	KAPTDFCPCK	LDGSLCVG.G	500
Mebus	.....F.....	.....V.....H	.....	.....S.....	.....N.....	500
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	M.....N.....	500
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....S.....	500
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	.....S.....	500
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....N.....	500
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....S.....	500
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....S.....	500
BCO.44175	.....F.....	.....	.....	.....	.....S.....	500
Consensus	SGIDAGYKNS	GIGTCPAGTN	YLTCNAAQC	NCLCTPDPIT	SKATGPYKCP	550
Mebus	P.....	.....	.....	.....	.....	550
BCQ.2590	P.....T..	.....	.....	.....	.....	550
BCQ.7373	.....T..	.....	.....	.....	.....	550
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	.....S.....	550
BCQ.1523	P.....T..	.....	.....	G.....	.....	550
OK-0514	.....T	.....	.....	G.....	.....	550
BCO.43277	.....T	.....	.....	D.....	.....	550
BCO.44175	.....T	.....	.....	.....	.....	550
Consensus	QTKYLVGIGE	HCSGLAIKSD	YCGGNPCTCQ	PQAFLGWSVD	SCLQGDRONI	600
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	600
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	.....	600
BCQ.7373	.....	.....	H.....	.....	.....	600
BCQ.571	.....	.....	H.....	.....	.....	600
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....	600
OK-0514	.....	.....	.....S..R	.....	.....	600
BCO.43277	.....	.....	.....S.....	.....	.....	600
BCO.44175	.....	.....	H.....S.....	.....	.....	600
Consensus	FANFILHDVN	SGTTCSTDLQ	KSNTDIILGV	CVNYDLYGIT	GQGI FVEVNA	650
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	650
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	.....	650
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....	650
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	.....	650
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....	650
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	650
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	650
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	650
Consensus	TYNSWQPLL	YDSNGNLYGF	RDYLTNRTEFM	IRSCYSGRVS	AAFHANSSEP	700
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	700
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	.....	700
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....	700
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	.....	700
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....	700
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	700
BCO.43277	.....	.....T.....	.....	.....	T.....	700
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	T.....	700



Consensus	ALLFRNIKCN	YVFNNTLSRQ	LQPINYFDSY	LGCVVNADNS	TSSVVQTCDL	750
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	750
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	.....	750
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....	750
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	.....	750
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....	750
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	750
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	750
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	750

Consensus	TVGSGYCVDY	STKRRSRR				768
Mebus	.....	.....				768
BCQ.2590	.....	.....				768
BCQ.7373	.....	.....				768
BCQ.571	.....V...	.....				768
BCQ.1523	.....V...	.....				768
OK-0514	.....	.....				768
BCO.43277	.....	.....				768
BCO.44175	.....	.....				768

**TABLEAU 8: Variations d'acides aminés observées dans les séquences de la sous-unité S1 de la glycoprotéine S de souches associées à la DNV, la DH ou les BRCV, comparativement à la souche Mebus, spécifiques aux souches qui possèdent un tropisme entérique**

Acide aminé	Pathologie et isolats							
	Mebus (ATCC)	DNV		DH		BRCV		
		BCQ.571	BCQ.1523	BCQ.2590	BCQ.7373	OK-0514	BCO.43277	BCO.44175
154	L	*	F	F	F	*	*	*
182	E	K	K	K	K	*	*	*
196	K	*	*	N	N	*	*	*
215	E	K	K	K	K	*	*	*
273	A	P	P	P	P	*	*	*
509	N	*	T	T	T	*	*	*
759	D	V	V	*	*	*	*	*

Toutes les souches sont comparées à la souche de référence Mebus (ATCC).

Un astérisque (\*) indique que le résidu est identique avec celui de la souche Mebus.

**TABLEAU 9: Variations d'acides aminés observées dans les séquences de la sous-unité S1 de la glycoprotéine S de souches associées à la DNV, la DH ou les BRCV, comparativement à la souche Mebus, spécifiques aux souches qui possèdent un tropisme respiratoire**

Acide aminé	Pathologie et isolats							
	Mebus (ATCC)	DNV		DH		BRCV		
		BCQ.571	BCQ.1523	BCQ.2590	BCQ.7373	OK-0514	BCO.43277	BCO.44175
256	M	*	*	*	*	*	L	L
362	S	*	*	*	*	*	T	T
510	S	*	*	*	*	T	T	T
578	T	*	*	*	*	S	S	S
691	A	*	*	*	*	*	T	T

Toutes les souches furent comparées à la souche de référence Mebus (ATCC).

Un astérisque (\*) indique que le résidu est identique avec celui de la souche Mebus

### 4.3.3 Gènes codant pour les régions ORF4 et ORF5

#### 4.3.3.1 Choix des souches utilisées

Comme mentionné précédemment, les régions ORF4 et ORF5 ont déjà été identifiées comme ayant un rôle à jouer dans le tropisme respiratoire ou entérique de certaines souches de coronavirus. La souche Mebus entérique (DNV) possède 4 cadres de lecture ouverts dans les régions ORF4 et ORF5 alors que seulement 2 ORFs sont présents dans les mêmes régions pour les souches respiratoires porcine HEV et humaine HCV-OC43. L'ARN des ORF4 et ORF5 des souches de DNV québécoises BCQ.571 et BCQ.1523, de même que des DH BCQ.2590 et BCQ.7373, qui ont un tropisme entérique ont donc été amplifiés pour vérifier si les séquences obtenues avaient un profil similaire à celle de Mebus. Pour les souches respiratoires, un isolat québécois BCQ.3994 a été ajouté aux BRCV ontariens BCO.43277 et BCO.44175 et à la souche de référence OK-0514. Les souches de référence HEV-67N (ATCC VR-7419) et HCV-OC43 (ATCC VR-759) ont également été utilisées pour des fins de comparaison.

#### 4.3.3.2 Amplification des régions ORF4 et ORF5 par PCR

Les isolats choisis ont été amplifiés par la technique RT-PCR à l'aide des amorces ORF4.5327 sens et ORF4 antisens. Les produits d'amplification ont ensuite été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 6). Les fragments amplifiés des souches entériques de DH et de DNV ont tous migré à une position correspondant à 1014 pb comparativement aux fragments d'ADN du marqueur étalon, tout comme la souche de référence Mebus. Cependant, les fragments des souches respiratoires HEV 67N et HCV-OC43 ont présenté une bande à une hauteur beaucoup plus faible correspondant à une longueur de 638 pb. Malgré leur tropisme respiratoire, les fragments génomiques des 4 souches de BRCV amplifiées ont tous migré à une position correspondant à une longueur de 1 014 pb tout comme les cas entériques. Ainsi, il ne semble pas avoir de délétion ni d'insertion de nucléotides pour toutes les

**FIGURE 6 : Amplification par la technique de la polymérase en chaîne (PCR) des régions ORF4 et ORF5 des souches de coronavirus hémagglutinants**

Les produits d'amplification des fragments ORF4 et ORF5 des différents isolats de coronavirus ont été migrés sur gel d'agarose 1,0%. Les amorces ORF4.5327 (sens) et ORF4 (antisens) ont été utilisées pour l'amplification enzymatique de 35 cycles à une température d'appariement de 55°C.

L : Marqueur étalon (1 kb DNA ladder Plus)

1 : Mebus, souche de référence (DNV)

2 : BCQ.2590 (DH)

3 : BCQ.7373 (DH)

4 : BCQ.571 (DNV)

5 : BCQ.1523 (DNV)

6 : HEV 67N

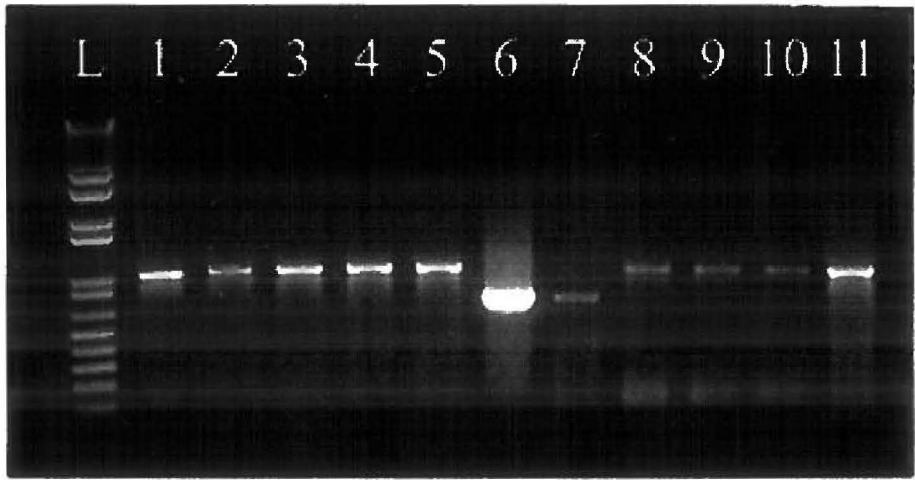
7 : HCV-OC43

8 : OK-0514 (BRCV)

9 : BCO.43277 (BRCV)

10 : BCO.44175 (BRCV)

11 : BCQ.3994 (BRCV)



← 1014 pb  
← 638 pb

souches bovines entériques et respiratoires dans les gènes compris dans les régions ORF4 et ORF5.

#### **4.3.3.3 Analyses des séquences**

##### **4.3.3.3.1 Comparaison des séquences nucléotidiques des gènes codés par les régions ORF4 et ORF5**

Les comparaisons des séquences nucléotidiques de la région de l'ORF4 codant pour des protéines non-structurales de 4.9 et 4.8 kDa et de la région de l'ORF5 comprenant des protéines non-structurales de 12.7 et 9.5 kDa sont présentées dans la figure 7. Les séquences nucléotidiques des souches de référence HEV-67N (ATCC X89861) et HCV-OC43 (ATCC M99576) ont également été utilisées pour fins de comparaison.

Un total de 129 nucléotides se sont succédés pour les isolats de BCV associés à la DH ou la DNV dans la région de l'ORF4 codant pour un protéine de 4.9 kDa. Toutefois, le changement d'une guanine pour une thymine à la position 88 a engendré une mutation non-sens et a ainsi provoqué la terminaison prématurée de la protéine de 4.9 kDa pour tous les isolats de BRCV, un codon d'arrêt TGA (*Amber*) étant introduit dans la séquence de nucléotides. De plus, 4 autres variations ont été observées dans cette région affectant au moins 3 des 4 isolats respiratoires (nt 5, 56, 69 et 83). Dans le cas des souches de référence HEV-67N et HCV-OC43, la région correspondant à l'ORF4 des souches de BCV ne compte que les 60 et 36 premiers nucléotides, respectivement.

En ce qui concerne la région de l'ORF4 codant pour une protéine non-structurale de 4.8 kDa, tous les isolats de BCV ou BRCV possédaient 134 nucléotides. Par rapport à la souche Mebus, le nombre de changement de nucléotides était de 6 pour BCQ.2590, 6 pour BCQ.7373, 5 pour BCQ.571, 6 pour BCQ.1523, 9 pour OK-0514, 7 pour BCO.43277, 9 pour BCO.44175 et 10 pour BCQ.3994. De ces variations, 3 ont été retrouvées pour toutes les souches de BRCV et, 4 autres chez 3 des 4 cas associés à des problèmes respiratoires. La protéine de 4.8 kDa est absente chez les souches HEV-67N et HCV-OC43.

La région codant pour une protéine de 12.7 kDa située dans l'ORF5 contient 427 nucléotides pour tous les isolats de BCV et BRCV. Cette région n'a démontré qu'une ou deux mutations ponctuelles spécifiques à chaque isolat. Une seule variation en position 687 était retrouvée à la fois dans les séquences nucléotidiques des isolats BCQ.2590, OK-0514, BCO.44175 et BCQ.3994. Les souches HEV-67N et HCV-OC43 possèdent 7 changements communs comparativement à la souche Mebus dans la région codant pour la protéine de 12.7 kDa (nt 14, 22, 23, 94, 169, 228 et 261).

Finalement, une seule substitution de nucléotides provoquant un changement d'acide aminé dans le gène codant pour la protéine structurale E de 9.5 kDa contenant 246 nucléotides située dans l'ORF5 fut identifiée en position 862 chez tous les isolats étudiés comparativement à la séquence nucléotidique de la souche Mebus. De plus, deux variations communes (nt 338 et 550) sont présentes chez les souches HEV-67N et HCV-OC43 comparativement à Mebus dans cette région.



**FIGURE 7 : Variations observées dans les séquences nucléotidiques des régions codant pour les ORF4 et ORF5 de souches associées à la DNV, la DH ou à des problèmes respiratoires**

Les séquences nucléotidiques des souches BCQ.2590, BCQ.7373, BCQ.571, BCQ.1523, OK-0514, BCO.43277, BCO.44175 et BCQ.3994 ont été comparées à celle de la souche DNV de référence Mebus(ATCC). Les souches de référence HEV-67N (ATCC) et HCV-OC43 (ATCC) ont aussi servi pour fins de comparaison. Les séquences ont été analysées à l'aide du programme d'analyse de séquences Geneworks 2.4 (IntelliGenetics). La séquence consensus est présentée en haut et seuls les changements d'acides aminés observés sont décrits pour chaque souche. Les codons de départ et d'arrêt de la traduction sont soulignés. Les tirets indiquent une délétion de nucléotides. Les caractères en rouge représentent une substitution de nucléotides résultant en un codon d'arrêt (fin de traduction) pour toutes les souches respiratoires étudiées.

**4.9 kDa** →

Consensus	<u>ATGACGACTA</u>	AGTTCGTCTT	TGATTTATTG	GCTCCTGACG	ATATATTACA	50
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	50
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	.....	50
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....	50
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	.....	50
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....	50
OK-0514	.....A.....	.....	.....	.....	.....	50
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	50
BCO.44175	.....A.....	.....	.....	.....	.....	50
BCQ.3994	.....A.....	.....	.....	.....	.....	50
HEV-67N	.....	..T.....	....G.....	-----C	.....G....AC	38
HCV-OC43	.....	.....	.....C.....	<u>CACTGA</u> ----	-----	36

Consensus	TCCCTTCAAT	CATGTGAAGC	TAATTATAAG	ACCCATGAG	GTCGAGCATA	100
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	100
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	.....	100
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....	100
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	.....	100
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....	100
OK-0514	.....C.....	.....T..	.....	.....T.....	.....T.....	100
BCO.43277	.....C.....	.....TT	.....	.....T.....	.....T.....	100
BCO.44175	.....C.....	.....T..	.....	.....T.....	.....T.....	100
BCQ.3994	.....C.....	.....T..	.....	.....T.....	.....T.....	100
HEV-67N	..TTAAG....T..	TGCCAA..GTT	...T-----	-----	-----	60
HCV-OC43	-----	-----	-----	-----	-----	36

Consensus	TTATAATAGC	TACCACAATG	CCTGCT...TTT	<u>AGTGGGTACT</u>	GTGTCTTATA	150
Mebus	.....	.....	.....G.....	.....	.....	150
BCQ.2590	.....	.....	.....T.....	.....	.....	150
BCQ.7373	.....	.....	.....T.....	.....T.....	.....	150
BCQ.571	.....	.....	.....T.....	.....	.....	150
BCQ.1523	.....	.....	.....T.....	.....	.....	150
OK-0514	.....	.....	.....G.....	.....	.....	150
BCO.43277	.....	.....	.....G.....	.....	.....	150
BCO.44175	.....	.....	.....G.....	.....	.....	150
BCQ.3994	.....	.....	.....G.....	.....	.....	150
HEV-67N	-----	-----	-----	-----	-----	60
HCV-OC43	-----	-----	-----	-----	-----	36

**4.8 kDa** →

Consensus	TAACTAGTAA	ACCTGTAATG	CCAATGGCTA	CAACCATTGA	..GGTACAGAT	200
Mebus	.....	.....	.....	.....	C.....	200
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	T.....	200
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	T.....	200
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	T.....	200
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	T.....	200
OK-0514	.....	.....	.....	.....	A..T..G.....	200
BCO.43277	.....	.....C.....	.....	.....	A.....G.....	200
BCO.44175	.....	.....C.....	.....	.....	A..T..G.....	200
BCQ.3994	.....	.....C.....	.....	.....	A..T..G.....	200
HEV-67N	-----	-----	-----	-----	-----	60
HCV-OC43	-----	-----	-----	-----	-----	36

Consensus	TATACTAA..A	TTATGCCTAT	TACTGTTTTT	ACAACAGTTT	ATTTAGGCGT	250
Mebus	.....T..	.....G	.....C..	.....	.....TG	250
BCQ. 2590	.....T..	.....	.....	.....	.....	250
BCQ. 7373	.....C..	.....	.....	.....	.....	250
BCQ. 571	.....T..	.....	.....	.....	.....	250
BCQ. 1523	.....T..	.....	.....	.....	.....	250
OK-0514	.....C..	.....	C.....C..	...T.....	.....	250
BCO. 43277	.....C..	.....	.....	.....	.....	250
BCO. 44175	.....C..	.....	C.....C..	...T.....	.....	250
BCQ. 3994	.....C..	.....	C.....C..	...T.....	.....T.....	250
HEV-67N	-----	-----	-----	-----	-----	
HCV-OC43	-----	-----	-----	-----	-----	

Consensus	TTCTATAGGT	ATTGACACTA	GCACCACTGG	TTTACCTGT	TTTTCACGGT	300
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	300
BCQ. 2590	.....	.....	.....	.....	.....T.....	300
BCQ. 7373	.....	.....	.....	.....	.....	300
BCQ. 571	.....	.....	.....	.....	.....	300
BCQ. 1523	...T.....	.....	.....	.....	.....	300
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	300
BCO. 43277	.....	.....	.....	.....	.....	300
BCO. 44175	.....	.....	.....	.....	.....	300
BCQ. 3994	.....	.....	.....	.....	.....	300
HEV-67N	-----	-----	-----	-----	-----	
HCV-OC43	-----	-----	-----	-----	-----	

Consensus	ACTAGTTCCA	AACCATATTA	TAATTCAGGT	AGACCTTATA	ACTTTAAGCA	350
Mebus	.....	.....	.....T.....	.....	.....	350
BCQ. 2590	.....	.....	.....	.....	.....	350
BCQ. 7373	.....	.....	.....	.....	.....	350
BCQ. 571	.....	.....	.....	.....	.....	350
BCQ. 1523	.....	.....	.....	.....	.....	350
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	350
BCO. 43277	.....	.....	.....	.....	.....	350
BCO. 44175	.....	.....	.....	.....	.....	350
BCQ. 3994	.....	.....	.....	.....	.....	350
HEV-67N	-----	-----	-----	-----	-----	
HCV-OC43	-----	-----	-----	-----	-----	

				12.7 kDa→		
Consensus	TTATTAATTG	CCAAAGTTTT	TAAGGCCACG	CCCTAGTAAT	<u>GGACATCTGG</u>	400
Mebus	.....	.....	C.....T.....	.....	.....	396
BCQ. 2590	-----	.....	.....	.....	.....	396
BCQ. 7373	-----	.....	.....	.....	.....	396
BCQ. 571	-----	.....	.....	.....	.....T.....	396
BCQ. 1523	-----	.....	.....	.....	.....	396
OK-0514	-----	.....	.....	...T.....	.....	396
BCO. 43277	-----	.....	.....	.....	.....	396
BCO. 44175	-----	.....	.....	...T.....	.....	396
BCQ. 3994	-----	.....	.....	...T.....	.....	396
HEV-67N	-----	-----	-----	-----	-----	12
HCV-OC43	-----	-----	-----	-----	.....T.....	12

Consensus	AAACCTGAGA	TTAAATATCT	CCGTTATACT	AACGGTTTTA	ATGTCTCAGA	450
Mebus	...G.....	.....	.....	.....	.....	446
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	.....	446
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....	446
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	.....	446
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....	446
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	446
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	446
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	446
BCQ.3994	.....	.....	.....	.....	.....	446
HEV-67N	TGC.....A..	AG.....	.....	.....A.....	.....	62
HCV-OC43	...G.....	AG.....	.....T..	.....	.....	62
Consensus	ATTAGAAGAT	GCTTGTTTTA	AATTTAACTA	TAAATTTCT	AAAGTAGGAT	500
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	496
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	.....	496
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....	496
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	.....	496
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....	496
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	496
BCO.43277	.....	.....	.....	.....C.....	.....	496
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	496
BCQ.3994	.....	.....	.....	.....	.....	496
HEV-67N	...C.....	...TC.....	.....A.....	...C.....C	.....	112
HCV-OC43	.....	.....	.....	...C.....	.....	112
Consensus	ATTGTAGAGT	TCCTAGTCAT	GCTTGGTGCC	GTAATCAAGG	TAGCTTTTGT	550
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	546
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	.....	546
BCQ.7373	.....	.....T.....	.....	.....	.....	546
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	.....	546
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....	546
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	546
BCO.43277	.....	.....C.....	.....	.....	.....	546
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	546
BCQ.3994	.....	.....	.....	.....	.....	546
HEV-67N	.....	.....A.T.....	.....	.....C.....	.....T.....	162
HCV-OC43	.....	.....	.....	.....	.....A.....	162
Consensus	GCTACACTCA	CTCTTTATGG	CAAATCCAAA	CATTATGATA	AATATTTTGG	600
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	596
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	.....	596
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....	596
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	.....	596
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....	596
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	596
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	596
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	596
BCQ.3994	.....	.....	.....	.....	.....	596
HEV-67N	.....T..T..	.....T..G...C.....	.....	.....	.....	212
HCV-OC43	.....T.....	.....	T.....	.....	.....	212

Consensus	AGTAATAACT	GGTTTTACAG	CATTCGCTAA	TACTGTAGAG	GAGGCTGTCA	650
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....T..	646
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	.....	646
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....	646
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	.....	646
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....	646
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	646
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	646
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	646
BCQ.3994	.....	.....	.....	.....	.....	646
HEV-67N	..A.....	.....C.....	.....T.....	..T...T.....A	..A.....T..	262
HCV-OC43	.....A..	.....C.....	.....	.....	...T.....T..	262

Consensus	ACAAACTGGT	TTTCTTAGCT	GTTGACTTTA	TTACCTGGCG	GAGACAGGAG	700
Mebus	.....	.....	.....	.....T.....	.....	696
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	T.....	696
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....	696
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	.....	696
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....	696
OK-0514	.....	.....	.....	.....	T.....	696
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	696
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	T.....	696
BCQ.3994	.....	.....	.....T.....	.....	T.....	696
HEV-67N	..T.....	.....T.....	.....	.....	A...C....AGT	312
HCV-OC43	.....	.....	.....	.....	C.....	312

	9.5 kDa →					
Consensus	TTAAATGTTT	ATGGCTGATG	CTTATTTTGC	AGACACTGTG	TGGTATGTGG	750
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	746
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	.....	746
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....	746
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	.....	746
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....	746
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	746
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	746
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	746
BCQ.3994	.....	.....	.....	.....	.....	746
HEV-67N	.....	.....	.....C.....	.....	.....	362
HCV-OC43	.....	.....	.....C.....	.....	.....	362

Consensus	GGCAAATAAT	TTTTATAGTT	GCCATTTGTT	TATTGGTTAT	AATAGTTGTA	800
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	796
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	.....	796
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....	796
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	.....	796
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....	796
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	796
BCO.43277	.....	.....	.....	.....	.....	796
BCO.44175	.....	.....	.....	.....	.....	796
BCQ.3994	.....	.....	.....	.....	.....	796
HEV-67N	.....	.....	.....	.....	.....	412
HCV-OC43	.....	.....	.....	.....C.....	.....	412

Consensus	GTGGCATT	TGGCAACTTT	TAAATTGTGT	ATTCAACTTT	GCGGTATGTG	850
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	846
BCQ. 2590	.....	.....	.....	.....	.....	846
BCQ. 7373	.....	.....	.....	.....	.....	846
BCQ. 571	.....	.....	.....	.....	.....	846
BCQ. 1523	.....	.....	.....	.....	.....	846
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	846
BCO. 43277	.....	.....	.....	.....	.....	846
BCO. 44175	.....	.....	.....	.....	.....	846
BCQ. 3994	.....	.....	.....	.....	.....	846
HEV-67N	.....	.....	.....	.....	.....	462
HCV-OC43	.....	.....	.....	.....	.....	462
Consensus	TAATACCTTA	GTA	CTTCTATTTA	TGTGTTAAT	AGAGGTAGGC	900
Mebus	.....	..G.....	.....	.....	.....	896
BCQ. 2590	.....	.....	.....	.....	.....	896
BCQ. 7373	.....	.....	.....	.....	.....	896
BCQ. 571	.....	.....	.....	.....	.....	896
BCQ. 1523	.....	.....	.....	.....	.....	896
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	896
BCO. 43277	.....	.....	.....	.....	.....	896
BCO. 44175	.....	.....	.....	.....	.....	896
BCQ. 3994	.....	.....	.....	.....	.....	896
HEV-67N	.....	.....	.....	.....	.....	512
HCV-OC43	.....	.....	.....	.....	.....	512
Consensus	AGTTTTATGA	GTTTTACAAT	GATGTAAAAC	CACCAGTTCT	TGATGTGGAT	950
Mebus	.....	.....C.....	.....	.....	.....	946
BCQ. 2590	.....	.....	.....	.....	.....	946
BCQ. 7373	.....	.....	.....	.....	.....	946
BCQ. 571	.....	.....	.....	.....	.....	946
BCQ. 1523	.....	.....	.....	.....	.....	946
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	946
BCO. 43277	.....	.....	.....	.....	.....	946
BCO. 44175	.....	.....	.....	.....	.....	946
BCQ. 3994	.....	.....	.....	.....	.....	946
HEV-67N	.....	.....	.....	.....C.....	.....	562
HCV-OC43	.....	.....	.....	.....C.....	.....	562
Consensus	GACGTTTAG					959
Mebus	.....					955
BCQ. 2590	.....					955
BCQ. 7373	.....					955
BCQ. 571	.....					955
BCQ. 1523	.....					955
OK-0514	.....					955
BCO. 43277	.....					955
BCO. 44175	.....					955
BCQ. 3994	.....					955
HEV-67N	.....					571
HCV-OC43	.....					571

#### 4.3.3.3.2 Analyse des séquences d'acides aminés des protéines associées aux régions ORF4 et ORF5.

Les variations d'acides aminés situées dans la protéine de 4.9 kDa pour les différents isolats comparés sont regroupées dans la figure 8a. Tous les isolats ayant un tropisme entérique comptent 43 acides aminés comparativement à 29 pour les BRCV, ces derniers étant affectés par une mutation non-sens. Les virus associés à la DH ou la DNV n'ont présenté qu'une seule substitution d'acides aminés comparativement à la souche Mebus (aa 43). Deux variations ont été observées pour toutes les souches de BRCV comparativement à la souche Mebus, une phénylalanine en position 19 qui est remplacée par une sérine et une lysine en position 23 qui est substituée par une asparagine. De plus, les isolats OK-0514, BCO.44175 et BCQ.3994 ont présenté 2 autres changements d'acides aminés additionnels; un tryptophane en position 2 est substitué par une lysine et une isoleucine en position 28 est remplacée par une leucine. L'alignement des premiers acides aminés de cette région située en aval du gène S des virus respiratoires porcins HEV-NT9 et HEV-67N, de même que du virus humain HCV-OC43, a démontré que ces virus, au lieu de coder pour une protéine de 4.9 kDa, n'ont la capacité de coder que pour des courts peptides de 24, 20 et 11 acides aminés, respectivement. La comparaison de ces peptides avec les souches de BRCV a révélé que malgré le fait que les BRCV possèdent 4 régions codantes dans les régions ORF4 et ORF5, une mutation non-sens vient causer la terminaison de la traduction de l'ARN pour toutes les souches respiratoires, tout comme la traduction est interrompue pour les virus HEV et HCV-OC43 par un codon d'arrêt suivi d'une délétion.

Les changements d'acides aminés des produits de 4.8, 12.7 et 9.5 kDa codés par les régions ORF4 et ORF5 sont présentés dans la figure 8b. Une forte homologie de séquence en acides aminés a été observée dans ces trois régions. Les résultats des analyses de séquences ont démontré tout de même que 2 substitutions (aa 8 et aa 10) situées dans la région de l'ORF4 codant pour la protéine de 4.8 kDa sont spécifiques à

toutes les souches de BRCV. De plus, un changement d'une glycine par une valine en position 9 et une substitution d'une thréonine par une isoleucine en position 22 sont observés pour les souches respiratoires OK-0514, BCO.44175 et BCQ.3994. La région de l'ORF5 codant pour la protéine non-structurale de 12.7 kDa ne contient que 3 mutations ponctuelles pour l'ensemble des isolats étudiés, alors qu'un seul changement ne fut démontré pour la protéine E (9.5 kDa), où une glycine est substituée par une valine en position 53 pour toutes les souches comparées à la souche de référence Mebus. D'ailleurs, cette variation avait déjà été décrite antérieurement pour les coronavirus porcins HEV-NT9, HEV-VW572, HEV-67N (Vieler *et al.*, 1996) et le coronavirus humain HCV-OC43 (Mounir *et al.*, 1993).

#### 4.3.3.3 Dépôt des séquences analysées dans GenBank

Les séquences des isolats de DH, DNV et BRCV analysées au cours de ce travail ont été déposées dans la banque de données GenBank. Les numéros d'accès suivants leurs ont été attribués : BCQ.2590 (AF239317 pour la sous-unité S1 du gène S et AF239313 pour les régions ORF4 et ORF5); BCQ.7373 (AF239306 pour la sous-unité S1 du gène S et AF239314 pour les régions ORF4 et ORF5); BCQ.571 (AF239318 pour la sous-unité S1 du gène S et AF239315 pour les régions ORF4 et ORF5); BCQ.1523 (AF239307 pour la sous-unité S1 du gène S et AF239316 pour les régions ORF4 et ORF5); BCO.43277 (AF239308 pour le gène HE et la sous-unité S1 du gène S, AF239310 pour les régions ORF4 et ORF5); BCO.44175 (AF239309 pour le gène HE et la sous-unité S1 du gène S, AF239311 pour les régions ORF4 et ORF5); BCQ.3994 (AF239312 pour les régions ORF4 et ORF5).



**FIGURE 8a : Comparaison des séquences d'acides aminés de la région de l'ORF4 codant pour une protéine de 4.9 kDa de souches associées à la DH, la DNV ou à des problèmes respiratoires.**

Les séquences d'acides aminés des souches BCQ.2590, BCQ.7373, BCQ.571, BCQ.1523, OK-0514, BCO.43277, BCO.44175 et BCQ.3994 ont été déduites de séquences nucléotidiques et comparées à celle de la souche de référence Mebus (ATCC VR-874). Les séquences ont été analysées à l'aide du programme d'analyse de séquences Geneworks 2.4 (IntelliGenetics). Les séquences des souches HEV-NT9, HEV-67N et HCV-OC43 proviennent de la banque de séquences GenBank (numéro d'accès X89861, X89863 et M99576). Seuls les changements d'acides aminés observés sont décrits pour chaque souche.

Mebus (ATCC)	MTTKFVFDLL	APDDILHPFN	HVKLIIRPIE	VEHIIIATTM	PAV	43
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	.....F	43
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....F	43
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	.....F	43
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....F	43
OK-0514	..K.....	.....S..	....N.....L..			29
BCO.43277	.....	.....S..	....N.....			29
BCO.44175	..K.....	.....S..	....N.....L..			29
BCQ.3994	..K.....	.....S..	....N.....L..			29
HEV-NT9	.....I.....V.....	TL..H..VTLSI	CQSF			24
HEV-67N	.....IN.....---	-GFH..VTLSI	CQSF			20
HCV-OC43	.....S..	H				11

**FIGURE 8b : Comparaison des séquences d'acides aminés des produits de l'ORF de 4.8 (a) , 12.7 (b) et 9.5 kDa (c) d'isolats de BCV associés à la DH, la DNV ou à des problèmes respiratoires.**

Les séquences d'acides aminés des souches BCQ.2590, BCQ.7373, BCQ.571, BCQ.1523, OK-0514, BCO.43277, BCO.44175 et BCQ.3994 ont été déduites des séquences nucléotidiques et comparées à celle de la souche de référence Mebus (ATCC VR-874). Les séquences ont été analysées à l'aide du programme d'analyse de séquences Geneworks 2.4 (IntelliGenetics). La séquence consensus est présentée en haut et seuls les changements d'acides aminés observés sont décrits pour chaque souche.

INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHES EN SANTÉ PUBLIQUE  
BIOMÉTRIE

A)

Consensus	MPMATTIDGT	DYTNIMPITV	FTTVYLGVSI	GIDTSTTGFT	CFSRY	45
Mebus	.....	.....S.....	S.....C.....	.....	.....Y.....	45
BCQ. 2590	.....	.....	.....	.....	.....	45
BCQ. 7373	.....	.....	.....	.....	.....	45
BCQ. 571	.....	.....	.....	.....	.....	45
BCQ. 1523	.....	.....	.....F.....	.....	.....	45
OK-0514	.....EVA	.....	SI.....	.....	.....	45
BCO. 43277	.....E..A	.....	.....	.....	.....	45
BCO. 44175	.....EVA	.....	SI.....	.....	.....	45
BCQ. 3994	.....EVA	.....	SI.....	.....	.....	45

B)

Consensus	MDIWKPEIKY	LRYTNGFNVS	ELEDACFKFN	YKFPKVGYCR	VPSHAWCRNQ	50
Mebus	.....R.....	.....	.....	.....	.....	50
BCQ. 2590	.....	.....	.....	.....	.....	50
BCQ. 7373	.....	.....	.....	.....I.....	.....	50
BCQ. 571	.....	.....	.....	.....	.....	50
BCQ. 1523	.....	.....	.....	.....	.....	50
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	50
BCO. 43277	.....	.....	.....	.....S.....	.....T.....	50
BCO. 44175	.....	.....	.....	.....	.....	50
BCQ. 3994	.....	.....	.....	.....	.....	50

Consensus	GSFCATLTLY	GKSKHYDKYF	GVITGFTAFA	NTVEEAVNKL	VFLAVDFITW	100
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	100
BCQ. 2590	.....	.....	.....	.....	.....	100
BCQ. 7373	.....	.....	.....	.....	.....	100
BCQ. 571	.....	.....	.....	.....	.....	100
BCQ. 1523	.....	.....	.....	.....	.....	100
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	100
43277	.....	.....	.....	.....	.....	100
44175	.....	.....	.....	.....	.....	100
BCQ. 3994	.....	.....	.....	.....	.....	100

Consensus	RRQELNVYG					109
Mebus	.....					109
BCQ. 2590	.....					109
BCQ. 7373	.....					109
BCQ. 571	.....					109
BCQ. 1523	.....					109
OK-0514	.....					109
43277	.....					109
44175	.....					109
BCQ. 3994	.....					109

C)

Consensus	MFADAYFAD	TVWYVGQIIF	IVAICLLVII	VVVAFLATFK	LCIQLCGMCN	50
Mebus	.....	.....	.....	.....	.....	50
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....	.....	50
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....	.....	50
BCQ.571	.....	.....	.....	.....	.....	50
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....	.....	50
OK-0514	.....	.....	.....	.....	.....	50
43277	.....	.....	.....	.....	.....	50
44175	.....	.....	.....	.....	.....	50
BCQ.3994	.....	.....	.....	.....	.....	50

Consensus	TLVLSPSIYV	FNRGRQFYEF	YNDVKPPVLD	VDDV		84
Mebus	...G.....	.....	.....	.....		84
BCQ.2590	.....	.....	.....	.....		84
BCQ.7373	.....	.....	.....	.....		84
BCQ.571	.....	.....	.....	.....		84
BCQ.1523	.....	.....	.....	.....		84
OK-0514	.....	.....	.....	.....		84
43277	.....	.....	.....	.....		84
44175	.....	.....	.....	.....		84
BCQ.3994	.....	.....	.....	.....		84

#### **4.4 EXPRESSION DES GLYCOPROTÉINES S (sous-unité S1) ET HE**

Afin d'obtenir les glycoprotéines S (sous-unité S1) et HE purifiées, les gènes respectifs de la souche DH BCQ.2590 ont été clonés dans des vecteurs eucaryotes en vue de leur expression dans des cellules de mammifères. Ainsi, la conformation des glycoprotéines natives devait être conservée. Pour l'expression dans des cellules eucaryotes, nous avons opté pour le plasmide pAdCMV5 servant pour la construction d'adénovirus recombinants. Les objectifs futurs seront d'étudier la réactivité d'AcMo anti-HE et anti-S1 contre les protéines tronquées exprimées dans un système permettant de conserver la conformation des déterminants antigéniques afin de déterminer la topographie des épitopes sur S1 et HE, et puis pour déterminer quels sont les déterminants qui permettent de différencier sérologiquement entre les souches de BCV DNV, DH et BRCV. Dans ce projet, nous étions intéressé à démontrer si les animaux inoculés à l'aide d'adénovirus recombinants ou de façon génétique produisaient une réponse humorale davantage dirigée contre la souche homologue que la souche Mebus, comme ceci avait été préalablement démontré avec les sérums de lapin hyperimmuns anti-BCQ.2590 (Kourtesis, A. K. 1998). Les travaux ont porté surtout sur le clonage et l'expression de la sous-unité S1 de la glycoprotéine S, puisque les travaux sur le gène HE avaient préalablement été réalisés dans le laboratoire. Dans le cas du gène HE, les travaux ont porté sur la confirmation de l'expression de la protéine par les adénovirus recombinants non-réplicatifs en utilisant des techniques d'immunobuvardage et d'immunofluorescence.

##### **4.4.1 Amplification de la sous-unité S1 du gène S**

La sous-unité S1 du gène S de la souche de DH BCQ.2590 a été amplifiée en utilisant les amorces S1.Ad5 sens et S1.Ad5 antisens. Un fragment de 2 304 pb a été obtenu sur gel d'agarose suite à la réaction de polymérase en chaîne comprenant 35 cycles à une température d'appariement de 55<sup>0</sup>C .

#### 4.4.2 Production du plasmide recombinant pAdCMV5/S1.DH

Afin de produire un plasmide recombinant pAdCMV5/S1.DH, le fragment du gène S1 obtenu par PCR de même que le pAdCMV5 ont tous deux été digérés avec l'enzyme de restriction *Bam* HI permettant le clonage. La figure 9 illustre un clone sélectionné possédant la sous-unité S1 du gène S de BCQ.2590 inséré dans le vecteur pAdCMV5 suite à l'analyse par électrophorèse sur gel d'agarose. Un fragment de 2 304 pb correspondant à la longueur attendue de la sous-unité S1 de la glycoprotéine S comparativement au marqueur étalon fut obtenu suite à la digestion du clone pAdCMV5/S1.DH avec l'enzyme *Bam* HI.

#### 4.4.3 Expression transitoire

L'expression transitoire de la sous-unité S1 de la glycoprotéine S a été vérifiée par immunofluorescence indirecte en utilisant le sérum de lapin hyperimmun 5801, dirigé contre la souche Mebus et un autre dirigé contre la souche BCQ.2590. Un seul plasmide recombinant a été sélectionné suite à la transfection. La figure 10a illustre l'étendue de la fluorescence observée dans des cellules 293 transfectées avec le plasmide recombinant pAdCMV5 exprimant de façon transitoire la sous-unité S1 de la glycoprotéine S tel que révélée suite à une incubation en présence du sérum dirigé contre la souche BCQ.2590. A plus fort grossissement, l'effet fusogène, caractéristique de la glycoprotéine S, a également pu être observé (Figure 10b). Les tests d'IF ont indiqué que la sous-unité S1 de la glycoprotéine S était exprimée dans le cytoplasme des cellules infectées, et qu'il y avait probablement des molécules de S1 qui avaient emprunté le système de sécrétion des cellules pour atteindre la surface et entraîner la fusion des cellules environnantes.

De plus, 8 AcMo (BCA1, BCA2, BCA7, BCB1, BCH3, BCH5, BCH8 et BCF4) produits antérieurement dans notre laboratoire et dirigés contre la sous-unité S1 de la glycoprotéine S ont également été utilisés en IF (Michaud et Dea, 1993).

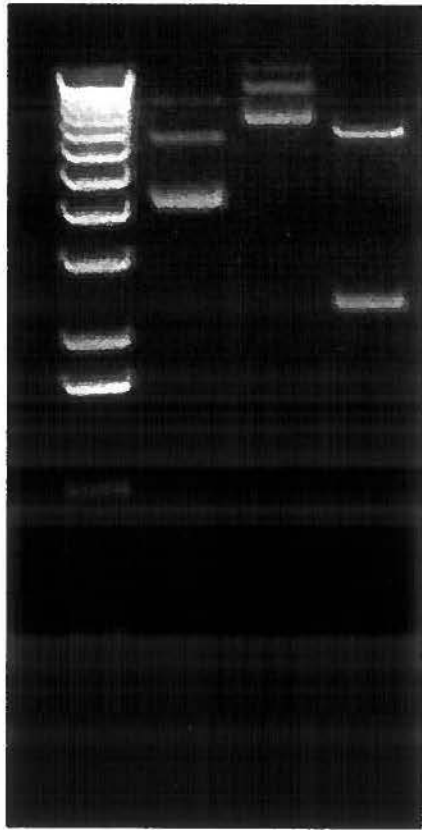
**FIGURE 9 : Profil électrophorétique sur gel d'agarose du plasmide recombinant pAdCMV5/S1.DH sélectionné.**

Les produits de digestion ont été migrés sur gel d'agarose de 1,0%. Les amorces S1.Ad5 sens et S1.Ad5 antisens ont été utilisées pour l'amplification enzymatique de la sous-unité S1 du gène S.

L : Marqueur étalon (1kb DNA ladder )  
1 : pAdCMV5 non digéré  
2 : pAdCMV5/S1.DH non digéré  
3 : pAdCMV5/S1.DH digéré avec l'enzyme *Bam* HI



**M 1 2 3**



← 2 304 pb

**FIGURE 10 : Immunofluorescence indirecte des cellules 293A transfectées avec le plasmide recombinant pAdCMV5/S1.DH.**

L'expression transitoire de la sous-unité S1 de la glycoprotéine S a été révélée suite à une première incubation avec le sérum de lapin hyperimmun dirigé contre la souche BCQ.2590, et une seconde incubation avec un anticorps anti-IgG de lapin marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine.

A : Cellules 293A transfectées avec le pAdCMV5 seul

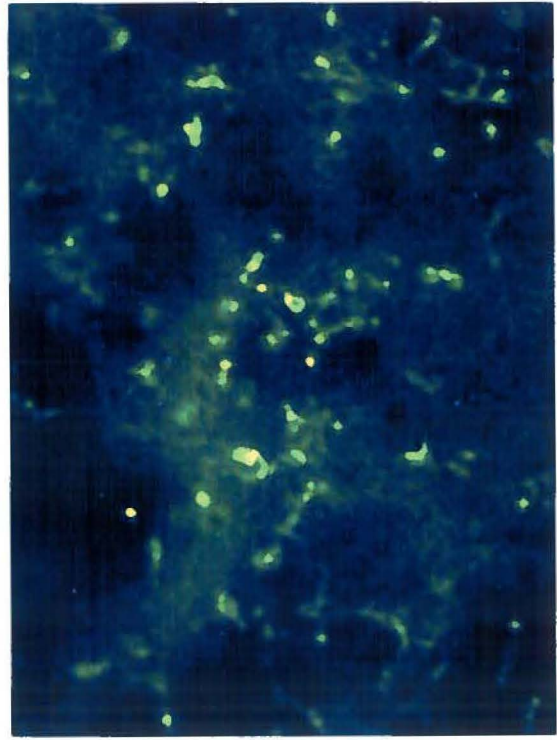
B : Aspect général du profil d'immunofluorescence obtenu suite à l'expression transitoire de la sous-unité S1 de la glycoprotéine S clonée dans le vecteur de transfert pAdCMV5

C : Effet fusogène de la sous-unité S1 de la glycoprotéine S lors de l'expression transitoire dans des cellules 293A

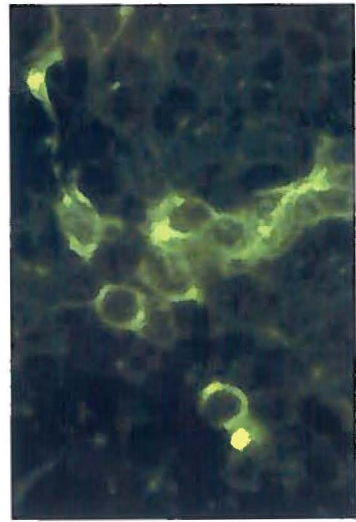
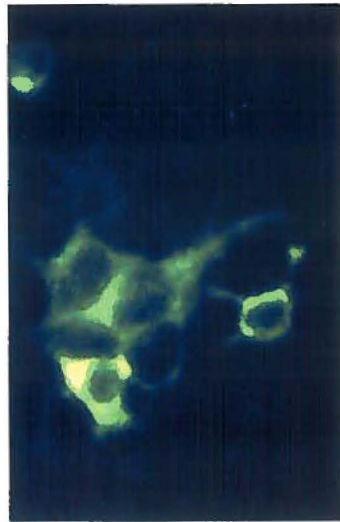
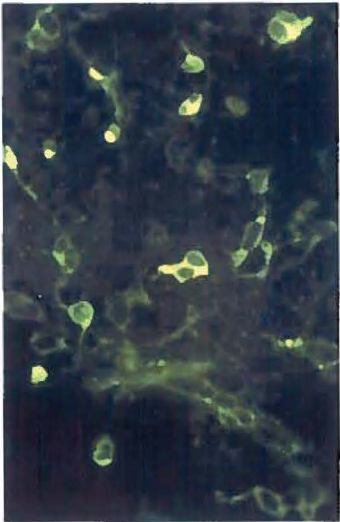
**A**



**B**



**C**



#### **4.4.4 Révélation de la sous-unité S1 de la glycoprotéine S du plasmide recombinant par SDS-PAGE**

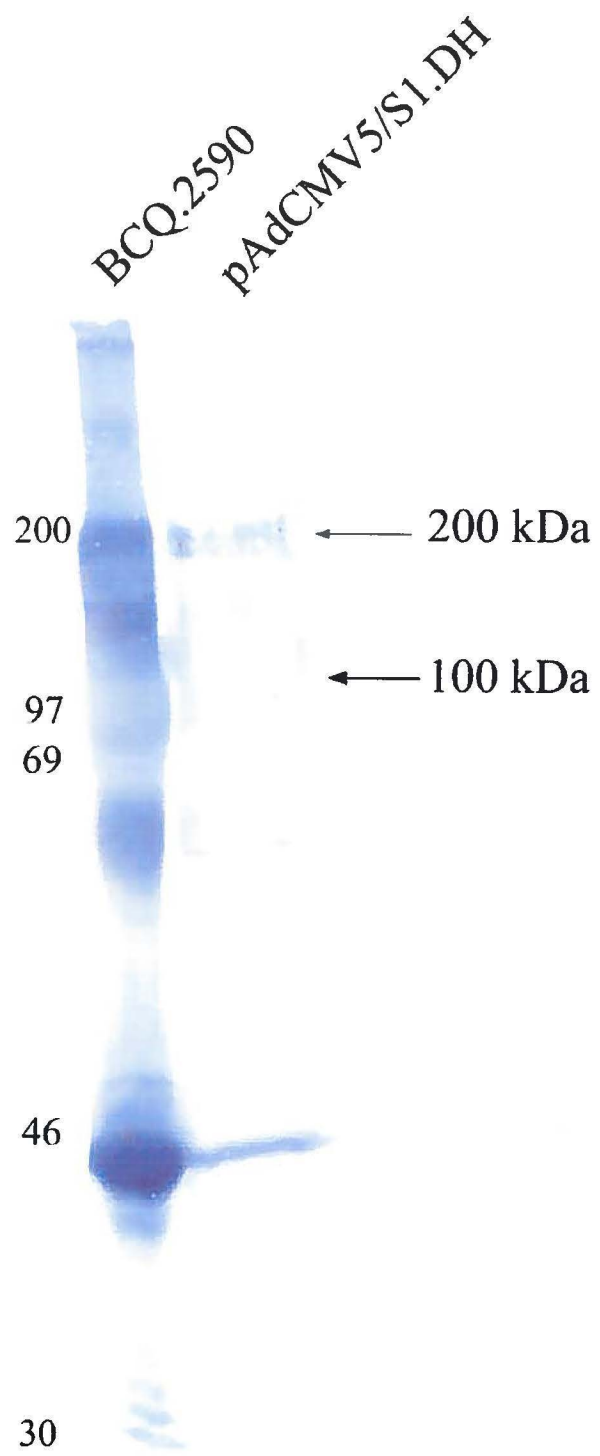
La présence de la sous-unité S1 de la glycoprotéine S dans les lysats de cellules 293 transfectées par le plasmide recombinant pAdCMV5/S1.DH a été confirmée par SDS-PAGE, suivi d'un immunobuvardage de type Western utilisant le sérum de lapin hyperimmun anti-2590 (Figure 11). En conditions non-réductrices, des fragments de 200 kDa et de 100 kDa correspondant à la glycoprotéine S et la sous-unité S1, ont été révélés, respectivement. Le fragment de 200 kDa correspondant probablement à un dimère de la S1, présent même en conditions réductrices d'où n'impliquant pas de ponts disulfures. Un échantillon de virus purifié BCQ.2590 a également été transféré sur membrane de nitrocellulose pour s'assurer que le poids moléculaire du fragment S1 du plasmide recombinant correspondait vraiment à celui du virus BCQ.2590.

**FIGURE 11 : Confirmation de la présence de la sous-unité S1 de la glycoprotéine S dans les cellules transfectées avec le pAdCMV5/S1.DH par immunobuvardage de type Western**

Des lysats de cellules 293 transfectées avec le pAdCMV5/S1.DH et le virion sauvage BCQ.2590 ont été analysées sur gels de polyacrylamide (12%) en absence de 2-mercaptoéthanol. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose et incubées en présence d'un antisérum hyperimmun anti-2590 produit chez le lapin.

pAdCMV5/S1.DH: Lysats de cellules 293 transfectées par le plasmide recombinant exprimant la sous-unité S1 du gène S de la souche BCQ.2590

BCQ.2590 : Lysats de cellules HRT-18G infectées par le virus BCQ.2590 purifié



## **4.5 Expression de la glycoprotéine HE par un vecteur adénovirus recombinant**

### **4.5.1 Production de l'AdCMV5/HE.DH**

Le clone 3.2 obtenu suite à la ligation du gène HE de la souche de BCQ.2590 dans le vecteur de transfert pAdCMV5/HE.DH s'est avéré celui qui a induit la meilleure expression de la glycoprotéine HE dans les cellules infectées tel que démontré par IFI utilisant les sérums hyperimmuns de lapin 5801 (anti-Mebus) et anti-2590. . Cet adénovirus recombinant a alors été purifié par dilution limite puis le titre viral obtenu fut évalué à  $10^7$ /ml. La figure 12 montre l'intensité de l'expression de la protéine HE dans les cellules infectées par l'AdCMV5/HE.DH, tel que révélé par les tests d'IFI à l'aide du sérum polyclonal hyperimmun dirigé contre la souche BCQ.2590. La fluorescence observée était aussi intracytoplasmique. Ceci a permis de confirmer la présence du gène de la glycoprotéine d'enveloppe HE dans l'adénovirus AdCMV5 recombinant.

### **4.5.2 Révélation de la glycoprotéine HE dans les cellules 293 infectées par l'adénovirus recombinant AdCMV5/HE.DH par SDS-PAGE**

La présence de la glycoprotéine HE dans les lysats de cellules 293 infectées par le clone 7D de l'AdCMV5/HE.DH a été confirmée par SDS-PAGE, suivi d'un immunobuvardage de type Western utilisant le sérum de lapin hyperimmun anti-2590 (Figure 13). En conditions non-réductrices, un fragment de 140 kDa correspondant à la glycoprotéine HE a été obtenu à partir des lysats de cellules ayant été infectées avec l'AdCMV5/HE.DH. Un échantillon de virus purifié BCQ.2590 a également été transféré sur membrane de nitrocellulose pour s'assurer que le poids moléculaire du fragment HE de l'AdCMV5/HE.DH correspondait vraiment à celui du virus BCQ.2590.

De plus, un adénovirus recombinant AdCMV5/ORF3 témoin, contenant un gène d'un virus autre que le coronavirus, soit le gène ORF3 du virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin, et un témoin de cellules 293A non-infectées ont aussi été utilisés pour s'assurer que la bande de 140 kDa obtenue n'était pas seulement une bande non-spécifique de l'adénovirus ou des cellules 293A révélée par le sérum anti-2590. En conditions réductrices, aucune bande n'a pu être observée à une hauteur de 65 kDa.



**FIGURE 12 : Profil d'immunofluorescence indirecte des cellules 293A infectées par l'adénovirus recombinant AdCMV5/HE.DH.**

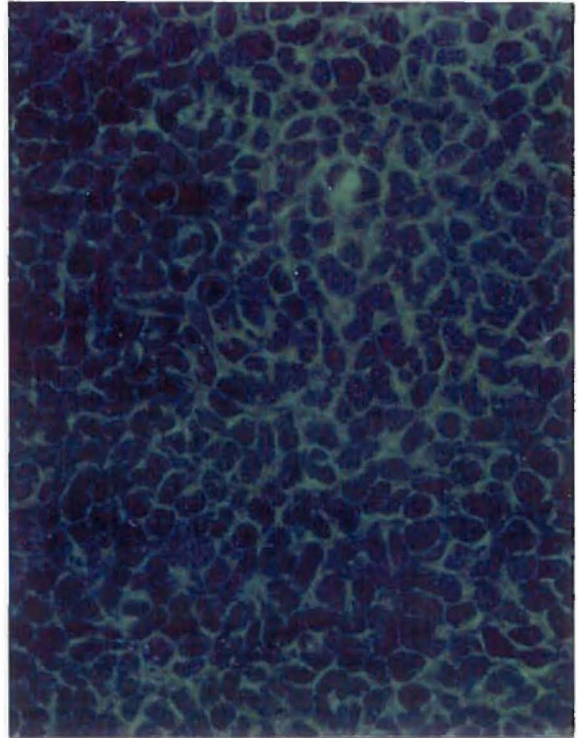
L'expression de la glycoprotéine HE fut révélée suite à une première incubation avec le sérum hyperimmun de lapin dirigé contre la souche BCQ.2590, et une seconde incubation avec un anticorps anti-IgG de lapin marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine.

- A : cellules 293A non-infectées
- B : cellules 293A infectées avec l'AdCMV5 seul
- C : cellules 293A infectées avec le virus recombinant AdCMV5/HE.DH.

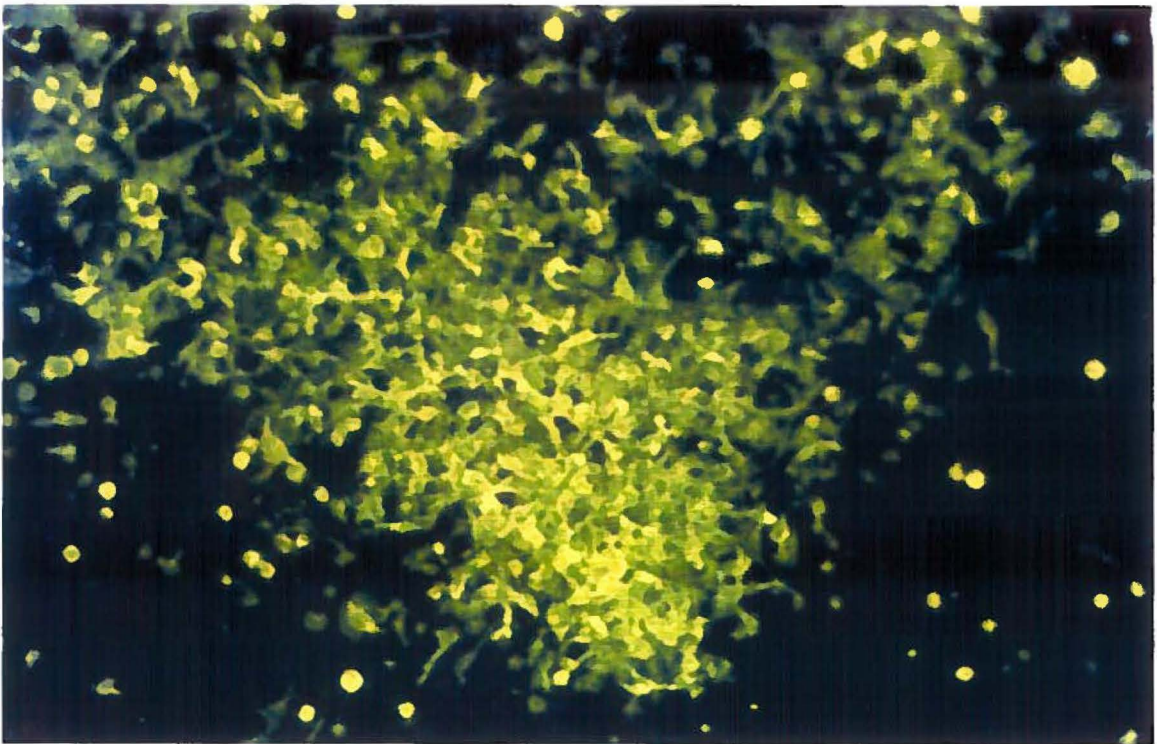
**A**



**B**



**C**

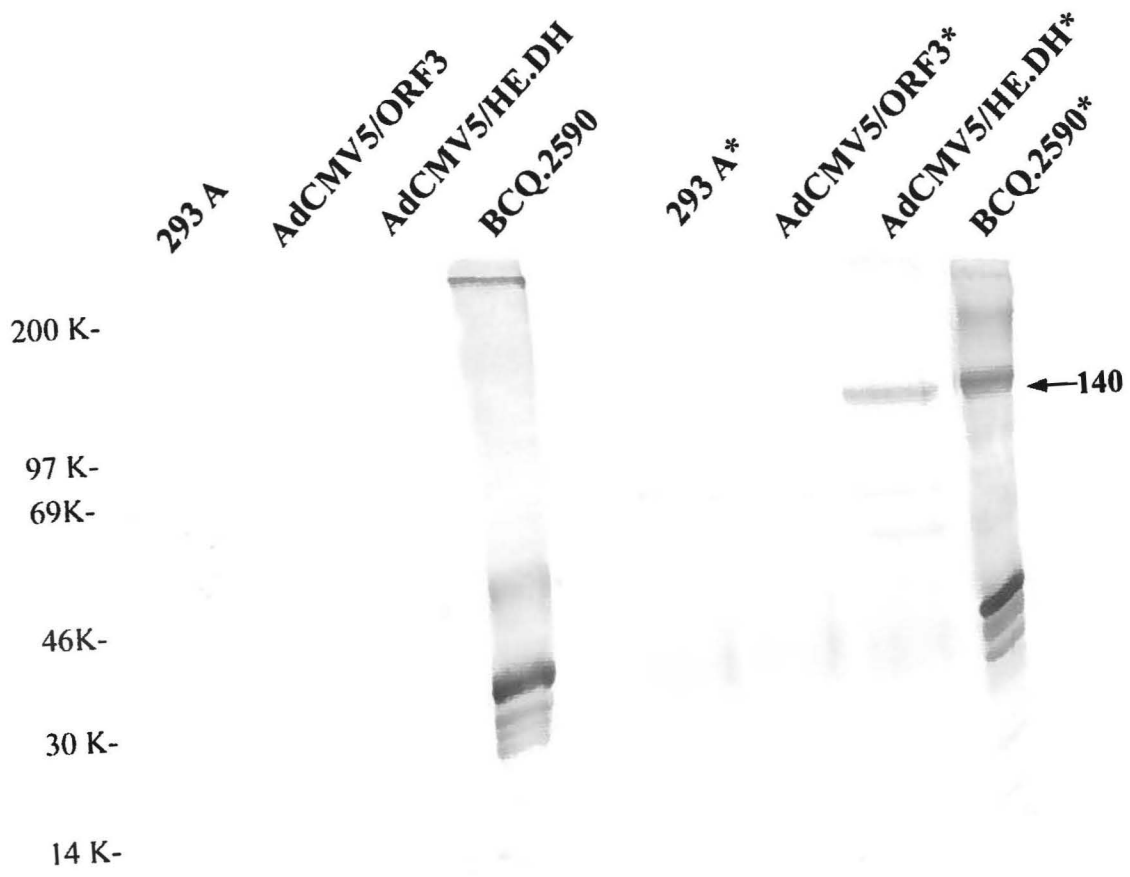


**FIGURE 13 : Confirmation de la présence de la glycoprotéine HE dans les cellules infectées par l'AdCMV5/HE.DH par immunobuvardage de type Western**

Des lysats de cellules 293 infectées avec l'AdCMV5/ORF3 témoin, l'AdCMV5/HE.DH et le virion sauvage BCQ.2590 ont été analysées sur gels de polyacrylamide (12%) en présence et en absence de 5% de 2-mercaptoéthanol. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose et incubées en présence d'un antisérum hyperimmun anti-2590 produit chez le lapin.

293A : Cellules témoins 293A non-infectées  
AdCMV5/ORF3 : Lysats de cellules 293 infectées par l'adénovirus recombinant exprimant le gène ORF3 du virus SRRP  
AdCMV5/HE.DH: Lysats de cellules 293 infectées par l'adénovirus recombinant exprimant le gène HE de la souche BCQ.2590  
BCQ.2590 : Lysats de cellules HRT-18G infectées par le virus BCQ.2590 purifié

Les astérisques (\*) indiquent que les résultats obtenus l'ont été en conditions non-réductrices



#### **4.6 Immunogénicité des glycoprotéines S (sous-unité S1) et HE recombinantes**

Afin de vérifier l'immunogénicité des glycoprotéines S (sous-unité S1) et HE recombinantes obtenues, deux groupes de 2 souris Balb/C et 2 souris C3H ont été immunisées génétiquement avec les plasmides pAdCMV5/HE.DH et pAdCMV5/S1.DH. Un autre groupe a été inoculé en parallèle avec l'adénovirus recombinant AdCMV5/HE.DH.

##### **4.6.1 Détection des anticorps suite à l'inoculation d'adénovirus recombinant**

Les anticorps produits par les souris femelles Balb/C et C3H suite à l'immunisation avec l'adénovirus recombinant AdCMV5/HE.DH ont été détectés par des tests d'ELISA indirecte utilisant comme antigène le virus pur BCQ.2590, et par des tests d'IFI sur des plateaux de cellules infectées avec la souche BCQ.2590. De plus, ces sérums ont aussi été caractérisés selon leur capacité à neutraliser l'effet cytopathique et à inhiber l'activité hémagglutinante de la souche prototype de BCV. Le tableau 10 présente l'ensemble des propriétés des sérums hyperimmuns des souris. Les titres ELISA obtenus pour les différents sérums de souris exprimés en valeur log<sub>10</sub> variaient de 2 à 3,8 alors que les titres d'IFI passaient de 40 (sérums récoltés 15 jours p.i.) à 80 ou 160 (28 jours p.i.).

Les épreuves d'inhibition de l'hémagglutination ont révélé que les sérums de souris hyperimmunisées n'inhibaient pas l'activité HA de la souche de référence Mebus alors que des titres d'IHA de 40 à 160 ont été observés dans le cas de la souche homologue BCQ.2590, tel que démontré initialement avec les sérums des bovins convalescents (Rekik et Dea, 1994). Cependant, aucun des antisérums obtenus suite à l'immunisation avec l'AdCMV5/HE.DH n'a démontré une activité neutralisante.

TABLEAU 10: Réactivité des sérums de souris contre la souche homologue (BCQ.2590) et la souche Mebus du BCV suite à l'immunisation avec l'adénovirus recombinant AdCMV5/HE.DH

Souris	Titre ELISA <sup>a</sup>	Titre IIF <sup>b</sup>	Titre IHA <sup>c</sup>		Titre SN <sup>d</sup>
			Mebus	BCQ.2590	
Balb/C J:15	2	40	20	20	<20
Balb/C J:28	3,8	160	<20	40	<20
Balb/C J:56	ND	ND	40	320	<20
C3H J:15	3,8	40	20	40	<20
C3H J:28	3,8	80	40	160	<20
C3H J:56	ND	ND	40	320	<20

a: Les titres ELISA ont été déterminés selon le Log 10 de la plus haute dilution de sérum de souris donnant une valeur d'absorbance 2,5 fois supérieure à celle obtenue avec un témoin contrôle AdCMV5-GFP à 450 nm

b: Les titres d'IFI ont été déterminés selon la réciproque de la plus haute dilution de sérum de souris permettant la détection de cellules 293 fluorescentes lors d'infection avec BCQ.2590

c: Les titres IHA ont été déterminés selon la réciproque de la plus haute dilution sérique de sérum de souris capable d'inhiber l'hémagglutination de 8 unités HA du virus Mebus ou BCQ.2590 après une incubation de 2 heures à 4<sup>0</sup>C

d: Les titres de SN ont été déterminés selon la réciproque de la plus haute dilution de sérum de souris neutralisant l'effet cytopathique causé par 400 DICT50 de virus BCQ.2590

ND: non-déterminé

De plus, des tests d'immunobuvardage de type Western ont permis de confirmer que les antisérums produits par les souris immunisées avec l'AdCMV5/HE.DH reconnaissent la glycoprotéine HE de BCQ.2590 (Figure 14). En conditions non-réductrices, un fragment de 140 kDa correspondant à la glycoprotéine HE a été obtenu à partir du virus pur BCQ.2590 en utilisant les sérums de souris immunisées avec l'adénovirus recombinant AdCMV5/HE.DH 28 jours p.i.. Le profil polypeptidique d'un échantillon de virus BCQ.2590 transféré sur membrane de nitrocellulose a également été révélé à l'aide de l'ascite 1D6-3 (anti-HE) et du sérum polyclonal anti-2590 afin de s'assurer du poids moléculaire du fragment de la HE. Les sérums des souris immunisées avec les adénovirus recombinants porteurs du gène de la GFP ont été utilisés comme témoins négatifs.

#### **4.6.2 Détection des anticorps suite à l'immunisation génétique**

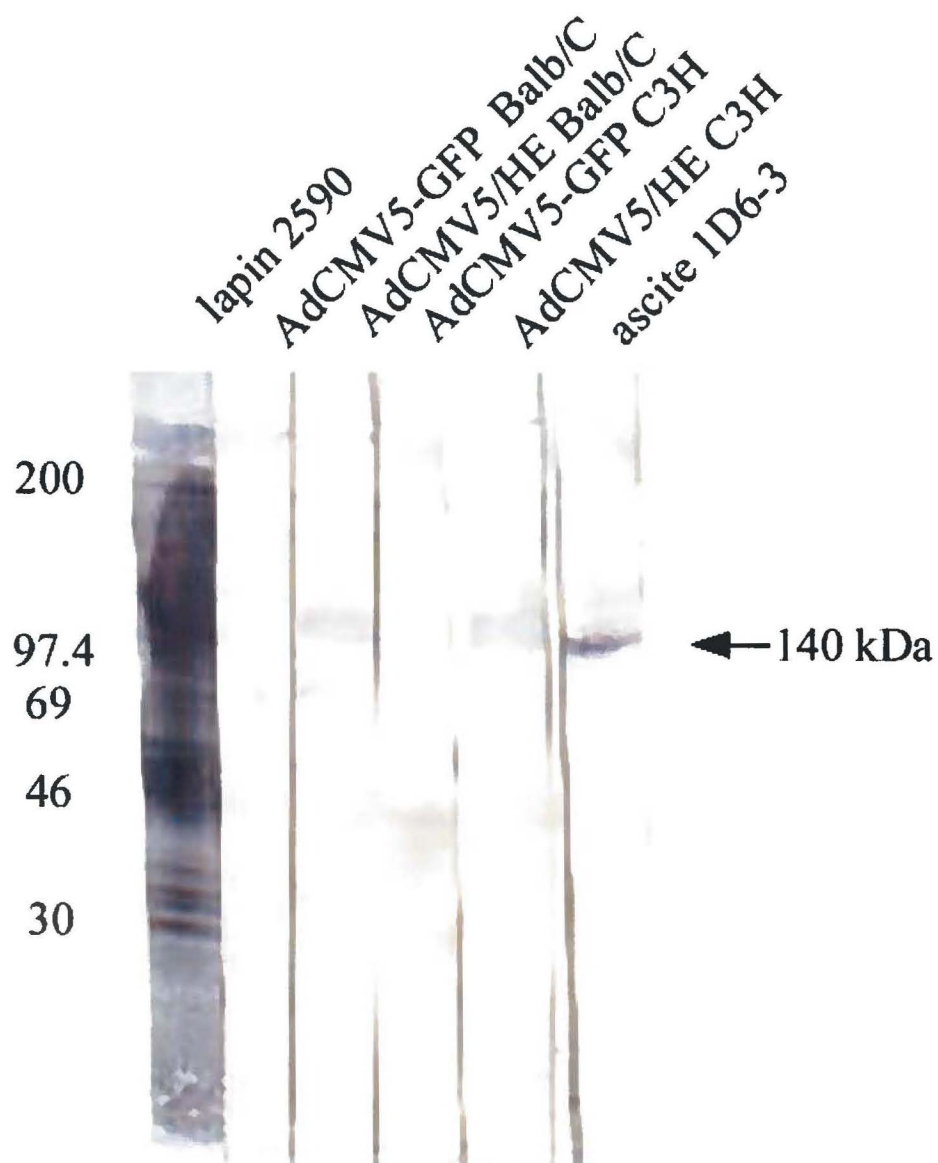
Les sérums obtenus des souris immunisées génétiquement, soit avec le pAdCMV5/HE ou le pAdCMV5/S1, ont aussi été testés par ELISA indirecte utilisant comme antigène le virus pur BCQ.2590 et par IFI sur des plateaux de cellules infectées avec la souche BCQ.2590 afin de détecter des anticorps spécifiques. Les propriétés neutralisantes et inhibitrices de l'hémagglutination de ces sérums ont également été étudiées. Malheureusement, après une période de 28 jours p.i., aucun de ces sérums hyperimmuns n'a démontré de réactivité au virus par les différents tests utilisés, et ce, dans le cas des souris inoculées avec le pAdCMV5/HE.DH ou le pAdCMV5/S1.DH. De plus, aucun de ces sérums n'a été capable de reconnaître les glycoprotéines HE ou S suite à des tests d'immunobuvardage de type Western.

**FIGURE 14 : Confirmation par immunobuvardage de type Western que les antisérums produits par les souris immunisées avec l'AdCMV5/HE.DH reconnaissent la glycoprotéine HE de BCQ.2590**

Le virus purifié BCQ.2590 a été analysé sur gel de polyacrylamide (12%) en absence de 2-mercaptoéthanol. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose et incubées en présence de différents sérums.

Lapin 2590 :	Sérum de lapin hyperimmun anti-2590
AdCMV5-GFP Balb/C :	Sérums de souris Balb/C immunisées avec l'AdCMV5-GFP
AdCMV5/HE.DH Balb/C:	Sérums de souris Balb/C immunisées avec l'AdCMV5/HE.DH
AdCMV5-GFP C3H :	Sérums de souris C3H immunisées avec l'AdCMV5-GFP
AdCMV5/HE.DH C3H:	Sérums de souris C3H immunisées avec l'AdCMV5/HE.DH
Ascite 1D6-3 :	Ascite 1D6-3 reconnaissant la glycoprotéine HE de BCQ.2590





## **DISCUSSION**

Jusqu'à présent, un seul sérotype de BCV a été identifié. Toutefois, le virus est responsable de plusieurs pathologies dues à l'infection du système gastro-intestinal telles la diarrhée néonatale du veau (DNV) et la dysenterie d'hiver des adultes (DH). De plus, le BCV peut également présenter un tropisme respiratoire (BRCV) et infecter les voies respiratoires supérieures des veaux en engraissement. Considérant que des variations génomiques pourraient être associées aux variations antigéniques et aux tropismes tissulaires distincts de diverses souches de BCV ou encore à des pathologies cliniques différentes, nous avons tenté de comparer les propriétés biologiques, sérologiques et génomiques de différents isolats de BCV responsables d'épidémies de DNV, DH ou BRCV dans des fermes de bovins laitiers du Québec.

La capacité qu'ont les isolats de BCV à s'attacher aux résidus d'acide sialique 9-O-acétylés présents à la surface des érythrocytes à différentes températures d'incubation est une propriété biologique permettant de différencier entre les isolats. Certaines différences dans les profils d'héماغglutination avaient d'ailleurs été rapportées antérieurement pour des isolats de BCV virulents et non-virulents (Storz *et al.*, 1992; Rekik et Dea, 1994). Dans notre étude, les titres de l'activité héماغglutinante des isolats associés à des épidémies de DH diminuaient de façon significative lorsqu'on augmentait la température d'incubation de 4<sup>0</sup>C à 37<sup>0</sup>C, attribuable à l'activation de l'activité RDE des isolats. La capacité à détruire les récepteurs de la cellule-hôte variait selon les isolats, étant supérieure dans le cas des souches associées à la DH comparativement à celles associées aux autres conditions cliniques. En effet, l'activité héماغglutinante des isolats de BRCV et de DNV ne fut pas influencée par les variations de températures à l'exception de la souche de DNV BCQ.1523 d'où une activité RDE minimale fut associée à ces derniers.

D'autre part, l'activité acétyl-estérase des isolats étudiés était semblable pour les isolats de DH et de BRCV alors que les souches de DNV possédaient une activité légèrement plus faible. Toutefois, plusieurs études ont démontré que l'activité AE du BCV n'est probablement pas directement impliquée dans le processus infectieux (Vlasak *et al.*, 1988; Parker *et al.*, 1988; Storz *et al.*, 1991).

Les différences observées au niveau des profils hémagglutinants pourraient être expliquées soit par les différentes propriétés d'affinité ou polarité des acides aminés des différents isolats associés aux sites de liaison de la protéine avec le récepteur des érythrocytes, par des différences au niveau de la conformation des épitopes de la glycoprotéine S (Hussain *et al.*, 1991; Michaud et Dea, 1994), ou encore par des substitutions d'acides aminés situées autant dans les régions de la glycoprotéine S que de la glycoprotéine HE (Zhang *et al.*, 1991a, b; Rekik et Dea, 1994). Les glycoprotéines S et HE se lient au même récepteur pour initier l'hémagglutination, mais la glycoprotéine S semble posséder un habilité de liaison plus forte (Schultze *et al.*, 1991a, b; Brian *et al.*, 1995). En effet, la glycoprotéine S est la seule capable d'induire l'hémagglutination des globules de poulet possédant un faible nombre de résidus d'acide sialique à leur surface. Aussi la glycoprotéine S est responsable de l'attachement du virus aux cellules-cibles chez tous les coronavirus (hémagglutinants ou non). Même si les BCV et HCV-OC43 reconnaissent tous deux les résidus d'acides 9-O acétylés à la surface des globules rouges, les récepteurs à la surface des cellules-cibles semblent différents. Par exemple, l'aminopeptidase N a été identifié comme le récepteur pour les virus de la GET des porcs et HCV-229E humain (Delmas *et al.*, 1992; Yeager *et al.*, 1992). Williams et collaborateurs (1991) ont aussi démontré que l'antigène carcinoembryonnaire pouvait agir comme récepteur du virus MHV. Toutefois, l'activité RDE de la glycoprotéine HE semble faciliter le relâchement des virus des cellules infectées et cette activité pourrait contribuer à une dispersion plus efficace du virus. Une activité RDE plus importante expliquerait pourquoi dans le cas des isolats de DH, le virus est propagé très rapidement au troupeau entier et en une période de temps plus courte que dans le cas des isolats associés à la DNV.

Au niveau génomique, les séquences des gènes HE et S1, et des régions ORF4 et ORF5 de divers BCV associés soit à la DH, la DNV ou à des problèmes respiratoires ont été comparées. Les séquences obtenues pour le gène HE de trois souches de BRCV vient compléter l'étude des séquences déjà amorcée antérieurement dans notre laboratoire pour des souches de DH, de DNV ou de diarrhée chronique chez les bovins adultes. La

plupart des changements nucléotidiques se traduisaient par des mutations silencieuses. Au niveau de la HE, les mutations d'une leucine par une proline à la position 5 de la séquence d'acides aminés et d'une sérine pour une proline en position 367 pour tous les isolats de BCV et de BRCV comparativement à la souche non-virulente Mebus avaient déjà été rapportées antérieurement (Zhang *et al.*, 1991; Dea *et al.*, 1994). Un changement de conformation, associé à l'inclusion d'un résidu proline dans une séquence d'acides aminés peut être responsable d'une modification d'une activité biologique ou enzymatique. Le changement d'une leucine pour une isoleucine en position 392 décrit pour la plupart des souches de DNV et de DH, sauf l'isolat BCQ.2590 a également été rencontré pour tous les BRCV étudiés. La plupart des autres variations observées étaient spécifiques de souches. Cependant, la mutation d'un résidu d'acide aspartique par une glycine en position 66 semble spécifique aux souches ayant un tropisme respiratoire. Il est intéressant de noter que ce changement avait aussi été observé dans le cas de souches associées à de la diarrhée chronique chez les bovins adultes (Kourtesis, 1998). Toutefois, la comparaison des séquences d'acides aminés de la glycoprotéine HE des différents isolats de BRCV ne nous a pas permis d'identifier pourquoi l'anticorps monoclonal 9F2-1R dirigé contre la HE de la souche BCQ.2590 réagit très faiblement contre les souches respiratoires ontariennes BCO.43277 et BCO.44175, alors qu'un titre IHA de 5120 est observé envers la souche de référence OK-0514-3.

Comme la protéine S est responsable de l'attachement du virus à la cellule-cible, les séquences de la portion S1 du gène S1 de souches de BCV associées à la DH, la DNV ou à des problèmes respiratoires ont également été comparées. Un total de sept changements d'acides aminés ont été rencontrés seulement dans les séquences de la portion S1 du gène S des souches ayant un tropisme entérique. Une seule de ces variations (aa 509) se trouvait dans la région hypervariable située entre les aa 452 et 593. L'inclusion d'un résidu d'asparagine en position 196, observé uniquement pour les deux isolats de DH, ne s'est pas traduit par l'apparition d'un site de glycosylation supplémentaire. Une seule substitution localisée en position 759 s'avéra spécifique aux deux isolats de DNV. De plus, cinq autres variations n'ont été retrouvées que dans la

séquence de la portion S1 du gène S des souches ayant un tropisme respiratoire. Les changements d'aa observés dans les séquences des trois cas de BRCV étudiés aux positions 510 et 578 avaient déjà été rapportés antérieurement (Chouljenko *et al.*, 1998). Ces variations situées dans la région hypervariable sont localisées à proximité ou dans le domaine immunoréactif S1B. Des AcMo spécifiques à cette région permettraient probablement de distinguer les souches de BCV entériques des respiratoires. Une substitution d'aa distincte fut aussi notée pour les deux isolats BRCV ontariens en position 362, située dans la région du domaine immunoréactif S1A. Les domaines antigéniques S1A et S1B localisés sur la sous-unité S1 ont été décrits par Vautherot et collaborateurs (1992a) et induisent la formation d'Ac hautement neutralisants (Deregt et Babiuk, 1987; Michaud et Dea, 1993). Chouljenko et collaborateurs (1998) avaient identifié cinq autres changements spécifiques aux souches respiratoires situés à l'extrémité N-terminale de la portion S1, soient aux positions 11, 115, 118, 173 et 179 pouvant affecter la capacité de la portion S1 à s'attacher à la cellule-cible. Toutefois, l'analyse des séquences du gène S des isolats de DH et de DNV a démontré que ces différentes variations étaient aussi présentes dans les séquences des souches associées à ces deux entités cliniques. La même conclusion est aussi valable pour les changements rapportés aux positions 531 et 543 également rencontrés chez les isolats entériques de BCV.

L'alignement des nucléotides codant pour les régions ORF4 et ORF5 a également été effectuée pour vérifier l'hypothèse émise par certains auteurs postulant que ces régions pourraient avoir un rôle à jouer dans le tropisme des coronavirus (Abraham *et al.*, 1990; Mounir et Talbot, 1993a).

Peu de changements de nucléotides ont été observés dans la région ORF5 codant pour des protéines de 12,7 kDa et 9,5 kDa (E). Bien que la protéine E joue un rôle important dans l'assemblage des virions (Vennema *et al.*, 1996; Fischer *et al.*, 1998), les fonctions de la protéine de 12,7 kDa restent toujours à déterminer. Cependant, le fait que cette dernière soit assez bien conservée parmi les virus BCV, BRCV, HCV-OC43 et

HEV 67N suggère qu'elle est responsable d'une fonction importante commune à tous ces coronavirus.

La séquence nucléotidique de la protéine de 4,9 kDa est celle qui a démontré un nombre plus important de variations permettant entre autre de différencier les isolats respiratoires des isolats entériques. Une substitution d'un nucléotide à la position 88 a engendré une mutation non-sens de type *Amber* provoquant l'arrêt de la traduction de la protéine de 4,9 kDa pour tous les BRCV étudiés. Les BCV entériques possèdent 43 acides aminés dans cette région, ce qui correspond à 14 acides aminés de plus que les BCV respiratoires. De plus, l'alignement des premiers acides aminés des virus HCV-OC43 et HEV 67N démontre une grande homologie de séquences entre tous ces coronavirus. Toutefois, HCV-OC43 et HEV 67N ne possèdent respectivement que 20 et 24 acides aminés (Mounir et Talbot, 1993a; Vieler *et al.*, 1995). De plus, trois autres variations situées dans cette courte région ont été observées affectant 3 des 4 isolats de BRCV étudiés.

Les virus HCV-OC43 et HEV 67N ne possèdent pas de région codant pour une protéine de 4,8 kDa contrairement aux isolats de BCV et BRCV étudiés, cette protéine ne semble donc pas essentielle à la réplication de ces coronavirus (Abraham *et al.*, 1990; Mounir et Talbot, 1993a). Les rôles de ces deux petites protéines non-structurales de 4,9 et 4,8 kDa ne sont pas encore connus, cependant, comme elles possèdent autant de domaines chargés que de domaines hydrophobes, certains auteurs ont proposé qu'elles serviraient de régions d'ancrage pour les protéines structurales durant l'assemblage du virus (Bournsnel *et al.*, 1984; Skinner *et al.*, 1985).

Comme toutes les réactions d'amplification des gènes HE, S1 et des régions ORF4 et ORF5 des différentes souches de BCV ont été réalisées avec la Taq DNA polymérase, plusieurs clones d'une même souche ont été analysés dans les deux sens afin de s'assurer que les mutations rapportées ici soient bien réelles. De plus, chacun des clones utilisés provenait d'une extraction d'ARN différente.

Notre deuxième objectif était de sous-cloner la portion S1 du gène S de la souche BCQ.2590 dans le vecteur de transfert pAdCMV5 afin de construire éventuellement un adénovirus recombinant exprimant la portion S1 de la glycoprotéine S dans sa conformation native. L'expression transitoire de la protéine S, vérifiée par des tests d'IFI utilisant le sérum de lapin hyperimmun anti-2590, a démontré une fluorescence cytoplasmique importante dans les cellules transfectées par le plasmide recombinant. L'effet fusogène, caractéristique de la sous-unité S1 de la glycoprotéine S, fut même observée dans les cellules 293A transfectées avec le plasmide pAdCMV5/S1.DH. La présence de la sous-unité S1 de la glycoprotéine S dans les lysats de cellules 293 transfectées avec le pAdCMV5/S1.DH a également été confirmée par immunobuvardage de type Western. En conditions non-réductrices, une protéine supplémentaire de 200 kDa a pu être révélée dans les cellules transfectées, de même que la faible présence de la sous-unité S1 de 100 kDa. Ceci est dû à la tendance des sous-unités S1 de s'assembler en dimère et trimère en l'absence de ponts disulfures. Dans la figure 11, on peut également apercevoir trois autres bandes correspondant à des protéines d'environ 46, 60 et 68 kDa. Ces deux dernières semblent être des protéines cellulaires reconnues par le sérum de lapin anti-2590 puisque ces deux mêmes bandes sont aussi présentes dans les lysats de cellules témoins 293A non-infectées de l'épreuve d'immunobuvardage de type Western de la figure 13. Cependant, la protéine de 46 kDa n'est pas reconnue par le sérum de lapin et elle n'est pas non plus une protéine appartenant à l'adénovirus puisqu'elle est absente lors du test d'immunobuvardage de type Western confirmant la présence de la glycoprotéine HE dans les cellules infectées par l'AdCMV5/HE.DH (Figure 13). Comme l'expérience avec la sous-unité S1 de la glycoprotéine S a été répétée à plusieurs reprises, et que la protéine de 46 kDa est toujours présente, une explication plausible est que cette protéine co-précipite avec la glycoprotéine S.

Le travail avait déjà été amorcé dans notre laboratoire pour construire un adénovirus recombinant exprimant la glycoprotéine HE, le gène HE cloné dans l'AdCMV5 avait une longueur de 1 304 pb. La poursuite de ce projet consistait à trouver, par des tests d'IFI utilisant un sérum de lapin dirigé contre la souche BCQ.2590, le clone



AdCMV5/HE.DH qui induisait la meilleure expression de la HE. Suite à la purification de ce clone, l'expression de la protéine HE dans les cellules infectées par l'AdCMV5/HE.DH a été vérifiée de nouveau afin de s'assurer que cette activité n'avait pas été perdue lors de la purification du clone. La présence de la glycoprotéine HE dans les lysats de cellules 293A infectées par l'AdCMV5/HE.DH a été confirmée par SDS-PAGE. Un fragment de 140 kDa a été observé autant dans le lysat de cellules infectées avec l'adénovirus recombinant que dans le cas d'un échantillon de virus BCQ.2590 purifié. En conditions réductrices, aucune bande n'a pu être observée à un poids moléculaire correspondant à 65 kDa. Le tampon de dénaturation utilisé ne contenait probablement pas suffisamment de mercaptoéthanol pour permettre la réduction des liens disulfures qui retiennent les dimères HE (Deregt *et al.*, 1987; Dea *et al.*, 1989b; Hogue *et al.*, 1989; Kienzle *et al.*, 1990).

Finalement, notre dernier objectif consistait à démontrer si l'immunogénicité initiale des glycoprotéines S1 et HE exprimées dans des cellules eucaryotes avait été conservée. Pour ce faire, différents groupes de souris femelles Balb/C et C3H ont été immunisées. Un premier groupe de 4 souris, inoculées à deux reprises avec l'AdCMV5/HE.DH, ont produit des anticorps reconnaissant la glycoprotéine HE de BCQ.2590. De plus, les épreuves d'IHA ont indiqué que ces anticorps étaient spécifiques à la souche BCQ.2590 puisqu'ils n'inhibaient pas la souche de référence Mebus, mais réagissaient avec le virus BCQ.2590 avec des titres IHA variant de 40 à 320. Ces résultats confirment les résultats publiés initialement sur les différences sérologiques affectant l'hémagglutination des souches de DH et DNV telles qu'observées avec les antisérums polyclonaux et monoclonaux anti-HE (Rekik et Dea, 1994; Millane *et al.*, 1996). Toutefois, tous les anticorps produits par les souris immunisées avec l'adénovirus recombinant HE étaient dépourvus d'activité neutralisante. Malgré le fait que la sous-unité S1 de la glycoprotéine S est reconnue comme étant la porteuse du principal déterminant antigénique inducteur d'anticorps neutralisants (Dea et Tijssen, 1989; Vautherot *et al.*, 1992a), il a été démontré que la glycoprotéine HE possèdent également

des épitopes neutralisants (Vautherot *et al.*, 1992a), ce qui ne fut pas confirmé dans notre étude.

Parallèlement à l'immunisation avec l'adénovirus recombinant exprimant la glycoprotéine HE, deux autres groupes de souris Balb/C et C3H ont été immunisées génétiquement avec les plasmides recombinants pAdCMV5/HE.DH et pAdCMV5/S1.DH. Chez ces deux groupes, après deux injections des plasmides recombinants, les souris n'ont pas produit d'anticorps reconnaissant les glycoprotéines HE ou S1. Le vecteur de transfert pAdCMV5 n'est habituellement pas utilisé en immunisation génétique, mais comme nous avons ajouté des séquences CpG afin de favoriser la production d'IgG et un plasmide recombinant contenant l'IL-2, nous pensions avoir amélioré les chances d'obtenir une réponse immune. L'expérience pourrait être reprise avec des plasmides conçus pour ce type d'immunisation comme le pcDNA3.1, le pRcCMV/2 ou le pVax.

## **CONCLUSION**

Au cours de ce projet, nous avons tenté d'identifier des variations génomiques nous permettant de différencier les souches de coronavirus bovins associées soit à la dysenterie d'hiver, à la diarrhée néonatale du veau ou à des problèmes respiratoires. Dans un deuxième temps, nous avons inséré les glycoprotéines HE et S (sous-unité S1) dans des vecteurs de transfert eucaryotes nous permettant de confirmer l'expression de chacune de ces protéines dans des cellules de mammifères. Puis, nous avons vérifié si l'immunogénicité initiale des glycoprotéines d'enveloppe HE et S était conservée après avoir recueilli des anticorps produits par des souris injectées avec des adénovirus ou des plasmides recombinants exprimant la glycoprotéine HE ou la sous-unité S1 de la glycoprotéine S.

Au niveau des propriétés biologiques, tous les isolats de BCV et BRCV ont démontré leur capacité à agglutiner les érythrocytes de rats. Toutefois, seuls les BCV associés à la DH ont démontré une activité destructrice des récepteurs présents à la surface des globules à une température d'incubation de 37<sup>0</sup>C, leur capacité à agglutiner les érythrocytes n'étant évidente qu'à 4<sup>0</sup>C. D'où l'incubation à 37<sup>0</sup>C dans le cas des isolats associés à la DH conduirait plutôt à l'élution des particules virales attachées aux érythrocytes de rats. L'activité acétyl-estérase de tous les isolats étaient toutefois comparables.

Trois régions génomiques possiblement impliquées dans le tropisme tissulaire des coronavirus du groupe 2 ont ensuite été séquencées : la portion S1 du gène S1 puisque la glycoprotéine S est responsable de l'attachement du virus aux cellules-cibles; le gène HE car la glycoprotéine HE possède aussi la capacité, quoique plus faible que la protéine S, de se lier aux récepteurs à la surface des érythrocytes; et les régions ORF4 et ORF5 que certains auteurs ont soupçonné être impliquées dans le changement de tropisme de certains coronavirus. La comparaison des séquences nucléotidiques et en acides aminés a révélé que la plupart des changements étaient spécifiques à chacune des souches. Toutefois, il fut possible d'identifier une substitution d'un nucléotide dans la région

ORF4 codant pour une petite protéine non-structurale de 4,9 kDa engendrant une mutation non-sens qui provoque l'arrêt de la traduction de cette protéine dans le cas des isolats de BRCV étudiés. Ce changement situé dans la région ORF4, de même que cinq substitutions identifiées dans le gène S1 nous ont permis de distinguer les souches entériques des souches respiratoires au niveau génomique. Des anticorps monoclonaux spécifiques à ces régions pourraient probablement permettre de différencier entre ces deux types d'isolats de BCV associées à deux pathologies distinctes chez les bovins laitiers.

Notre deuxième objectif était de sous-cloner la portion S1 du gène S de la souche de DH BCQ.2590 dans le vecteur de transfert pAdCMV5 dans le but éventuel de construire un adénovirus recombinant. L'expression transitoire des cellules 293A transfectées avec le plasmide recombinant pAdCMV5/S1.DH a démontré que la portion S1 de la glycoprotéine S avait même conservé ses propriétés fusogènes caractéristiques à cette glycoprotéine d'enveloppe des coronavirus. De plus, la poursuite du travail de construction d'un adénovirus recombinant AdCMV5/HE.DH, déjà amorcé dans notre laboratoire, nous a permis de sélectionner le clone induisant la meilleure expression de la glycoprotéine HE.

Finalement, il a été possible de vérifier si l'immunisation en parallèle de souris avec l'adénovirus recombinant AdCMV5/HE.DH et avec les plasmides recombinants pAdCMV5/HE.DH et pAdCMV5/S1.DH permettait d'obtenir des anticorps dirigés spécifiquement contre la souche BCQ.2590. Seuls les souris ayant été inoculées avec l'AdCMV5/HE.DH ont produit des anticorps reconnaissant la glycoprotéine HE. De plus, les épreuves d'inhibition de l'hémagglutination ont démontré que les anticorps obtenus ne réagissaient pas contre la souche prototype Mebus alors qu'ils inhibaient la souche BCQ.2590, confirmant ainsi les études sérologiques préliminaires réalisées sur différents isolats de BCV associés à ces deux types d'infection entérique. Malheureusement, l'immunisation des souris avec ce même adénovirus recombinant n'a

pas permis d'obtenir d'anticorps neutralisants associés à la glycoprotéine HE comme d'autres auteurs l'ont rapporté (Yoo *et al.*, 1992; Baca-Estrada *et al.*, 1995).

La production d'un adénovirus AdCMV5/S1.DH à partir du plasmide recombinant S1, suivi de l'immunisation de souris avec ce dernier permettra peut-être d'obtenir des anticorps neutralisants puisque la portion S1 de la glycoprotéine S est reconnue comme possédant la majorité des déterminants antigéniques associés à l'induction d'anticorps neutralisants.

L'obtention de réactifs immunologiques contre les déterminants antigéniques des glycoprotéines HE et S est nécessaire pour la poursuite des travaux en regard de la possibilité de recombinaison entre les coronavirus hémagglutinants de différentes espèces incluant l'homme. Des recombinaisons entre ces virus pourraient permettre l'émergence de variants pathogènes complètement imprévisibles pour l'homme et les animaux de la ferme.

## **REMERCIEMENTS**

J'aimerais remercier le Dr Serge Dea, mon directeur de maîtrise, pour m'avoir donné ma première opportunité en recherche avec ce projet sur les coronavirus. La solide formation scientifique acquise dans son laboratoire est inestimable. Sa disponibilité et sa compétence ont été très appréciées et ont permis l'accomplissement de ce travail.

Je tiens aussi à remercier tous mes collègues de laboratoire pour leur participation de près ou de loin à ce projet de recherche. Plus particulièrement, je désire exprimer ma gratitude au groupe travaillant sur les coronavirus : Ann, Marie-Josée et Martine; à Patrick et Dominic pour toute les périodes passées en leur compagnie pendant les temps d'incubation interminables et à Mourad pour son aide continu et les discussions partagées en sa compagnie.

J'aimerais aussi remercier les techniciennes du laboratoire Louise et Nicole pour leurs multiples conseils et Lise Forget du service de séquençage de l'INRS-Institut Armand Frappier pour sa collaboration.

Je me dois également de remercier mes parents ainsi qu'Isabel pour leur soutien et leur affection. Enfin, j'aimerais dire un gros merci à Denis pour avoir été toujours là pour moi et pour avoir écouté le résumé journalier de toutes mes expériences.

Finalement, je désire remercier les organismes subventionnaires CRSNG et le MAPAQ, de même que la Fondation de l'Institut Armand-Frappier pour leur soutien financier.



## **BIBLIOGRAPHIE**

- Abraham, S., Kienzle, T. E., Lapps, W., Brian, D. A. 1990. Sequence and expression analysis of potential nonstructural proteins of 4.9, 4.8, 12.7 and 9.5 kDa encoded between the spike and membrane protein genes of the bovine coronavirus. *Virology* **177** : 488-495.
- Abraham, S., Kienzle, T. E., Lapps, W., Brian, D. A. 1991. Deduced sequence of the bovine coronavirus spike protein and identification of the internal proteolytic cleavage site. *Virology* **176** : 296-301.
- Almeida, J. D. et Tyrrell, D. A. J. 1967. The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture. *J Gen Virol* **1** :175-178.
- An, S., Chen, C.-J., Yu, X., Leibowitz, J. L., Makino, S. 1999. Induction of apoptosis in murine coronavirus-infected cultured cells and demonstration of E protein as an apoptosis inducer. *J Virol* **73** : 7853-7859.
- Armstrong, J., Niemann, H., Smeekins, S., Rottier, P., Warren, G. 1984. Sequence and topology of a model intracellular membrane protein, E1 glycoprotein, form a coronavirus. *Nature* **308** : 751-752.
- Athanassious, R., Marsolais, G., Assaf, R., Dea, S., Descoteaux, J. P., Dulude, S., Montpetit, C. 1994. Detection of bovine coronavirus and type A rotavirus in neonatal calf diarrhea and winter dysentery of cattle in Québec : evaluation of three diagnostic methods. *Can Vet J* **35** : 163-169.
- Baca-Estrada, M. E., Liang, X., Babiuk, L. A., Yoo, D. 1995. Induction of mucosal immunity in cotton rats to haemagglutinin-esterase glycoprotein of bovine coronavirus by recombinant adenovirus. *Immunology* **86** : 134-140.
- Ballesteros, M. L., Sanchez, C. M., Martin-Caballero, J., Enjuanes, L. 1995. Molecular bases of tropism in the PUR46 cluster of transmissible gastroenteritis coronaviruses. *Adv Expt Med Biol* **380** : 557-562.
- Ballesteros, M. L., Sanchez, C. M., Enjuanes, L. 1997. Two amino acid changes at the N-terminus of transmissible gastroenteritis coronavirus spike protein result in the loss of enteric tropism. *Virology* **227** : 378-388.
- Barik, R. S., Stohlman, S. A., Lai, M. M. C. 1983. Characterization of replicative intermediate RNA of mouse hepatitis virus : presence of leader RNA sequences on nascent chains. *J Virol* **48** : 663-640.
- Barik, R. S., Stohlman, S. A., Razavi, M. K., Lai, M. M. C. 1985. Characterization of leader-related small RNAs in coronavirus-infected cells : further evidence for leader-primed mechanism of transcription. *Virus Res* **3** : 19-33.

- Beaudette, F. R. et Hudson, C. B. 1937. Cultivation of the virus of infectious bronchitis. *J Am Vet Med Assoc* **90** :51-60.
- Benfield, D. A., Saif, L. J. 1990. Cell culture propagation of a coronavirus isolated from cows with winter dysentery. *J Clin Microbiol* **28** : 1454-1457.
- Boursnell, M. E., Brown, T. D., Binns, M. M. 1984. Sequence of the membrane protein gene from avian coronavirus IBV. *Virus Res* **1** : 303-313.
- Boursnell, M. E., Brown, T. D., Foulds, I. J., Green, P. F., Tomley, F. M., Binns, M. M. 1987. Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. *J Gen Virol* **68** : 57-77.
- Brian, D. A., Hogue, B. G., Kienzle, T. E. 1995. The Coronavirus Hemagglutinin Esterase Glycoprotein. Dans : *The Coronaviridae*. (Siddell, S. G., éd.). Plenum Press, N. Y. pp. 165-179.
- Bridge, E., Hemstrom, C., Pettersson, U. 1991. Differential regulation of adenovirus late transcriptional units by the products of early region. *Virology* **183** : 260-266.
- Bridger, J. C., Caul, E., Eggleston, S. I. 1978. Replication of an enteric bovine coronavirus in intestinal organ cultures. *Arch Virol* **57** : 43-51.
- Brierley, I., Boursnell, M. E. G., Binns, M. M., Bilimoria, B., Blok, V. C., Brown, T. D. K., Inglis, S.C. 1987. An efficient ribosomal frame-shifting signal in the polymerase-encoding region of the coronavirus IBV. *EMBO* **6** : 3779-3785.
- Callebaut, P. E., Pensaert, M. B. 1980. Characterization and isolation of structural polypeptides in hemagglutinating encephalomyelitis. *J Gen Virol* **48** : 193-204.
- Campbell, S. G., Cookingham, C. A. 1978. The enigma of winter dysentery. *Cornell Veterinarian* **68** : 423-441.
- Cavanagh, D., Davis, P. J., Pappin, D. J. C., Binns, M. M., Boursnell, M. E. G., Brown, T. D. K. 1986a. Coronavirus IBV : partial amino terminal sequencing of spike polypeptide S2 identifies the sequence Arg-Arg-Phe-Arg-Arg at the cleavage site of the spike precursor propolypeptide of IBV strains Beaudette and M41. *Virus Res* **4** : 133-143.
- Cavanagh, D., Davis, P. J., Darbyshire, J. H., Peters, R.W. 1986b. Coronavirus IBV : Virus retaining spike glycopeptide S2 but not S1 is unable to induce virus-neutralizing or haemagglutination-inhibiting antibody or induce chicken tracheal protection. *J Gen Virol* **67** : 1435-1442.
- Cavanagh, D., Davis, P. J. 1987. Properties of coronavirus IBV after removal of the S1 subunit of the spike glycoprotein. *Adv Exp Med Biol* **218** : 501-507.

- Cavanagh, D., Brian, D. A., Brinton, M. A., Enjuanes, L., Holmes, K. V., Horzinek, M. C., Lai, M. M. C., Laude, H., Plagemann, P. G. W., Siddell, S. G., Spaan, W. J. M., Taguchi, F., Talbot, P. J. 1994. Revision of the taxonomy of the coronavirus, torovirus and arterivirus genera. *Arch Virol* **135** : 227-237.
- Cavanagh, D. 1995. Coronavirus surface glycoproteins. Dans : *The Coronaviridae*. (Siddell, S. G., éd.). Plenum Press, N. Y. pp. 73-113.
- Cavanagh, D. 1997. *Nidovirales* : a new order comprising *Coronaviridae* *Arteriviridae*. *Arch Virol* **142** : 629-633.
- Cheever, F. S., Daniels, J. B., Pappenheimer, A. M., Bailey, O. T. 1949. A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myeline. I. Isolation and biologic properties of the virus. *J Exp Med* **90** : 181-194.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *An Biochem* **162** : 156-159.
- Chouljenko, V. N., Kousoulas, K. G., Lin, X., Storz, J. 1998. Nucleotide and predicted amino acid sequences of all genes encoded by the 3' genomic portion (9.5 kb) of respiratory bovine coronaviruses and comparisons among respiratory and enteric coronaviruses. *Virus Genes* **17** : 33-42.
- Collins, A. R., Knobler, R. L., Powell, H., Buchmeier, M. J. 1982. Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible to attachment and cell-fusion. *Virology* **119** : 358-371.
- Collins, J. K., Riegel, C. A., Olson, J. D., Fountain, A. 1987. Shedding of enteric coronavirus in adult cattle. *Am J Vet Res* **48** : 361-365.
- Cox, G. J., Parker, M. D., Babiuk, L. A. 1989. The sequence of cDNA of bovine coronavirus 32K nonstructural gene. *Nucleic Acids Res* **17** : 5847-5851.
- Cox, G. J., Parker, M. D., Babiuk, L. A. 1991. Bovine coronavirus nonstructural protein ns2 is a phosphoprotein. *Virology* **185** : 509-512.
- Crouch, C. F., Bielefeldt, O. H., Watts, T. C., Babiuk, L. A. 1985. Chronic shedding of bovine enteric coronavirus antigen-antibody complexes by clinically normal cows. *J Gen Virol* **66** : 1489-1500.
- Dalziel, R. G., Lampert, P. W., Talbot, P. J., Buchmeier, M. J. 1986. Site-specific alteration of murine hepatitis virus type 4 peplomer glycoprotein E2 results in reduced neurovirulence. *J Virol* **59** : 463.

- Dar, A. M., Kapil, S., Goyal, S. M. 1998. Comparison of immunohistochemistry, electron microscopy, and direct fluorescent antibody test for the detection of bovine coronavirus. *J Vet Diagn Invest* **10** : 152-157.
- Dea, S., Roy, R. S., Begin, M. E. 1979. Counterimmuno-electroosmophoresis for detection of neonatal calf diarrhea coronavirus : Methodology and comparison with electron microscopy. *J Clin Microbiol* **10** : 240-244.
- Dea, S., Roy, R. S., Begin, M. E. 1980a. Physicochemical and biological properties of neonatal calf diarrhea coronaviruses isolated in Quebec and comparison with the Nebraska calf coronavirus. *Am J Vet Res* **41** : 23-29.
- Dea, S., Roy, R. S., Begin, M. E. 1980b. Bovine coronavirus isolation and cultivation in continuous cell lines. *Am J Vet Res* **41** : 30-38.
- Dea, S., Roy, R. S., Elazhary, M.A.S.Y. 1982. Antigenic variations among calf diarrhoea coronaviruses by immunodiffusion and counterimmuno-electrophoresis. *Ann Rech Vet* **13** : 352-356.
- Dea, S. et Tijssen, P. 1988. Identification of the structural proteins of turkey enteric coronavirus. *Arch Virol* **99** : 173-186.
- Dea, S. et Tijssen, P. 1989a. Detection of turkey enteric coronavirus by enzyme-linked immunosorbent assay and differentiation from other coronaviruses. *Am J Vet Res* **50** : 226-231.
- Dea, S. et Tijssen, P. 1989b. Antigenic and polypeptide structure of turkey enteric coronaviruses as defined by monoclonal antibodies. *J Gen Virol* **70** : 1725-1741.
- Dea, S., Garzon, S., Tijssen, P. 1989a. Identification and location of the structural glycoproteins of a tissue culture-adapted turkey enteric coronavirus. *Arch Virol* **106** : 221-237.
- Dea, S., Garzon, S., Tijssen, P. 1989b. Intracellular synthesis and processing of the structural glycoproteins of turkey enteric coronavirus. *Arch Virol* **106** : 239-259.
- Dea, S., Garzon, S., Strykowski, H., Tijssen, P. 1989c. Ultrastructure of turkey enteric coronaviruses as defined by monoclonal antibodies. *J Gen Virol* **70** : 1725-1741.
- Dea, S., Garzon, S., Tijssen, P. 1989d. Isolation and trypsin-enhanced propagation of turkey enteric (bluecomb) coronaviruses in a continuous human rectal adenocarcinoma cell line. *Am J Vet Res* **50** : 1310-1318.
- Dea, S., Verbeek, A. J., Tijssen, P. 1990. Antigenic and genomic relationships among turkey and bovine enteric coronaviruses. *J Virol* **64** : 3112-3118.

- Dea, S., Garzon, S. 1991. Identification of coronaviruses by the use of indirect protein A-gold immunoelectron microscopy. *J Vet Diagn Invest* **3** : 297-305.
- Dea, S., Michaud, L., Milane, G. 1995. Comparison of bovine coronavirus isolates associated with neonatal calf diarrhoea and winter dysentery in adult dairy cattle in Québec. *J Gen Virol* **76** : 1263-1270.
- De Groot, R. J., Luijtes, W., Horzinek, M. C., Van der Zeijst, B.A. M., Spaan, W. J., Lenstra, J. A. 1987a. Evidence for a coiled-coil structure in the spike proteins of coronaviruses. *J Mol Biol* **24** : 57-78.
- De Groot, R. J., Maduro, J., Lenstra, J. A., Horzinek, M. C., Van der Zeijst, B. A. M., Spaan, W. J. m. 1987b. cDNA cloning and sequence analysis of the gene encoding the peplomer protein of feline infectious peritonitis virus. *J Gen Virol* **68** : 2639-2646.
- De Groot, R. J., Hardy, W. R., Shirako, Y., Strauss, J. H. 1990. Cleavage-site preferences of Sindbis virus polyproteins containing the non-structural proteinase. Evidence for temporal regulation of polyprotein processing in vivo. *EMBO* **9** : 2631-2638.
- De Haan, C. A. M., Smeets, M., Vernooij, F., Vennema, H., Rottier, P. J. M. 1999. Mapping of the coronavirus membrane protein domains involved in interaction with the spike protein. *J Virol* **73** : 7441-7452.
- Delmas, B., Gelfi, J., Laude, H. 1986. Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus. II. Domains in the peplomer glycoprotein. *J Gen Virol* **67** : 1405-1418.
- Delmas, B., Laude, H. 1990. Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression *J Virol* **64** : 5367-5375.
- Delmas, B., Gelfi, J., L'Haridon, R., Vogel, L. K., Sjöström, H., Norén, O., Laude, H. 1992. Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. *Nature* **357** : 417-419.
- Deregt, D., Babiuk, L. A. 1987. Monoclonal antibodies to bovine coronavirus : characteristics and topographical mapping of neutralizing epitopes on the E2 and E3 glycoproteins. *Virology* **161** : 410-420.
- Deregt, D., Sabara, M., Babiuk, L. A. 1987. Structural proteins of bovine coronavirus and their intracellular processing. *J Gen Virol* **68** : 2863-2877.
- de Vries, A. A. F., Horzinek, M. C., Rottier, P. J. M., De groot, R. J. 1997. The genome organization of the *Nidovirales* : Similarities and differences between Arteri-, Toro-, and Coronaviruses. *Sem Virol* **8** : 33-47.

- Dubois-Dalcq, M., Doleer, D.W., Haspel, M. V., Holmes, K. V. 1982. Cell tropism and expression of mouse hepatitis viruses (MHV) in mouse spinal cord cultures. *Virology* **119** : 317-331.
- Durham, P. J. K., Hasard, L. E., Armstrong, K. R., Naylor, J. M. 1989. Coronavirus-associated diarrhea (winter dysentery) in adult cattle. *Can Vet J* **30** : 825-827.
- Dveksler, G. S., Dieffenbach, C. W., Cardellichio, C. B., McCuaig, K., Pensiero, M. N., Jiang, G.-S., Beauchemin, N., Holmes, K. V. 1993. Several members of the mouse carcinoembryonic antigen-related glycoprotein family are functional receptors for the coronavirus mouse hepatitis virus-A59. *J Virol* **67** : 1-8.
- Enjuanes, L., Anchez, C., Gebauer, F., Mendez, A., Dopazo, J., Ballesteros, M. L. 1993. Evolution and tropism of transmissible gastroenteritis coronavirus. *Adv Exp Med Biol* **342** : 35-42.
- Fischer, F., Stegen, C. F., Masters, P. S., Samsonoff, W. A. 1998. Analysis of constructed E gene mutants of mouse hepatitis virus confirms a pivotal role for E protein in coronavirus assembly. *J Virol* **72** : 7885-7894.
- Fleming, J. O., Trousdale, M. D., El-Zaarari, F. A. K., Stohlman, S. A., Weiner, J. O. 1986. Pathogenicity of antigenic variants of murine coronavirus JHM selected with monoclonal antibodies. *J Virol* **58** : 869-875.
- Fleming, J. O., Trousdale, M. D., Bradbury, J., Stohlman, S. A., Weiner, L. P. 1987. Experimental demyelination induced by coronavirus JHM (MHV-4) : Molecular identification of a virus determinant of paralytic disease. *Microbial Pathogen* **3** : 9.
- Fleming, J. O., Schubin, R. A., Sussman, M. A., Casteel, N., Stohlman, S. A. 1989. Monoclonal antibodies to the matrix (E1) glycoprotein of mouse hepatitis virus protect mice from encephalitis. *Virology* **168** : 162-167.
- Flewett, T. H. 1978. Electron microscopy in the diagnosis of infectious diarrhea. *J Am Vet Med Assoc* **173** : 538-543.
- Fosmire, J. A., Hwang, K., Makino, S. 1992. Identification and characterization of a coronavirus packaging signal. *J Virol* **66** : 3522-3530.
- Fukutomo, T., Tsunemitsu, H., Akashi, H. 1999. Detection of bovine coronaviruses from adult cows with epizootic diarrhea and their antigenic and biological diversities. *Arch Virol* **144** : 997-1006.
- Gallagher, T. M., Escarmis, C., Buchmeier, M. J. 1991. Alteration of the pH dependence of coronavirus-induced cell fusion : Effect of mutations in the spike glycoprotein. *J Virol* **65** : 1916-1928.

- Gebhart, A. M., Ruddon, R. W. 1986. What regulates secretion of non-stored proteins by eukaryotic cells? *Bio assays* **4** : 213-218.
- Gibbs, E. P. J., Smale, C. J., Voyle, C. A. 1980. Electron microscopy as an aid to the rapid diagnosis of virus diseases of veterinary importance. *Vet Rec* **106** : 451-458.
- Gilmore, W., Fleming, J. O., Stohlman, S. O., Weiner, L. P. 1987. Characterization of the structural proteins of the murine coronavirus strain A59 using monoclonal antibodies. *Proc Soc Exptl Biol Med* **185** : 177-186.
- Ginsberg, H. S., Lundholm, U., Beauchamp, U., Horswood, R. L., Pernis, B., Wold, W. S.M., Chanock, R. M., Prince, G. A. 1989. Role of early region 3 (E3) in pathogenesis of adenovirus disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **86** : 3823-3827.
- Gledhill, A. W., Andrewes, C. H. 1951. A hepatitis virus of mice. *Br J Exp Pathol* **32** : 559-568.
- Godet, M., L'Haridon, R., Vautherot, J. F., Laude, H. 1992. TGEV corona virus ORF4 encodes a membrane protein that is incorporated into virions. *Virology* **188** : 666-675.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., Nairn, R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36** : 59-72.
- Griffiths, G., Rottier, P. 1992. Cell biology of viruses that assemble along the biosynthetic pathway. *Semin Cell Biol* **3** : 367-381.
- Gursel, M., Tunca, S., Ozkan, M., Ozcenzig, G., Alaeddinoglu, G. 1999. Immunoadjuvant action of plasmid DNA in liposomes. *Vaccine* **17** : 1376-1383.
- Hardy, W. R., Hahn, Y. S., DeGroot, R. J., Strauss, E. G., Strauss, J. H. 1990. Synthesis and processing of the nonstructural polyproteins of several temperature-sensitive mutants of Sindbis virus. *Virology* **77** : 199-208.
- Herrler, G., Durkop, I., Becht, H., Klenk, H. D. 1988. The glycoprotein of influenza C virus is the hemagglutinin, esterase, and fusion factor. *J Gen Virol* **69** : 839-846.
- Hofmann, M. A., Senanayake, S. D., Brian, D. A. 1993. An intraleader open reading frame is selected from a hypervariable 5' terminus during persistent infection by the bovine coronavirus. *Adv Exp Med Biol* **342** : 105-109.
- Hogue, B. G., King, G., Brian, D. A. 1984. Antigenic relationships among proteins of bovine coronavirus, human respiratory coronavirus OC43, and mouse hepatitis coronavirus A59. *J Virol* **51** : 384-388.



- Hogue, B. G., Brian, D. A. 1986. Structural proteins of human respiratory coronavirus OC43. *Virus Res* **5** : 384-388.
- Hogue, B. G., Kienzle, T. E., Brian, D. A. 1989. Synthesis and processing of the bovine enteric coronavirus haemagglutinin protein. *J Gen Virol* **70** : 345-352.
- Holmes, K. V., Doller, E. W., Sturman, L. S. 1981. Tunicamycin resistant glycosylation of coronavirus glycoprotein : demonstration of a novel type of viral glycoprotein. *Virology* **115** : 334-344.
- Holmes, K. V., Lai, M. M .C. 1996. Coronaviridae : The viruses and their replication. Dans : *Fields Virology*. (édité par Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M., *et al.*), Liipincott-Raven Publishers, Philadelphie. pp. 1075-1093.
- Horne, R. W., Brenner, S., Waterson, A. P., Wildy, P. 1959. The icosahedral form of an adenovirus. *J Mol Biol* **1** : 84-86.
- Horzinek, M. C., Lutz, H., Pedersen, N. C. 1982. Antigenic relationships among homologous structural polypeptides of porcine, feline, and canine coronaviruses. *Infect Immun* **37** : 1148-1155.
- Hsue, B., Masters, P. S. 1997. A bulged stem-loop structure in the 3' untranslated region of the genome of the coronavirus mouse hepatitis virus is essential for replication. *J Virol* **71** : 7567-7578.
- Hussain, K. A., Storz, J., Kousoulos, K.G. 1991. Comparison of bovine coronavirus (BCV) antigens : monoclonal antibodies to the spike protein distinguish between vaccine and wild-type strains. *Virology* **183** : 442-445.
- Jensen, M. T., Kemeny, L. J., Stone, S. S. 1980. Direct immunoelectron microscopy of transmissible gastroenteritis virus with immunoglobulins G and A and guinea pig complement. *Am J Vet Res* **41** : 136-139.
- Kamahora, T., Soe, L. S., Lai, M, M, C. 1989. Sequence analysis of nucleocapsid gene and leader RNA of human coronavirus OC43. *Virus Res* **12** : 1-9.
- Kapil, S., Pomeroy, K. A., Goyal, S. M., Trent, A. M. 1991. Experimental infection with an avirulent pneumoenteric isolate of bovine coronavirus. *J Vet Diagn Invest* **3** : 88-89.
- Kienzle, T. E., Abraham, S., Hogue, B. G., Brian, D. A. 1990. Structure and orientation of expressed bovine coronavirus hemagglutinin esterase protein. *J Virol* **64** : 1834.
- King, B., Brian, D. A. 1982. Bovine coronavirus structural proteins. *J Virol* **42** :700-707.

- King, B., Poots, B. J., Brian, D. A. 1985. Bovine coronavirus hemagglutinin protein. *Virus Res* **2** : 53-59.
- Klinman, D. M., Barnhart, K. M., Conover, J. 1999. CpG motifs as immune adjuvants. *Vaccine* **17** : 19-25.
- Koch, G., Hartog, L., Kant, A., Van Roozelaar, D. J. 1990. Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus : Correlation with biological functions. *J Gen Virol* **71** : 1929-1935.
- Kooi, C., Cervin, M., Anderson, R. 1991. Differentiation of acid-pH-dependent and – nondependent entry pathways for mouse hepatitis virus. *Virology* **180** : 108-119.
- Kosak, M. 1987. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *Mol Biol* **196** : 947-950.
- Kourtesis, A.B. 1998. Biological antigenic and genomic differences between bovine coronavirus strains associated with outbreaks of winter dysentery and neonatal calf diarrhea . Mémoire de maîtrise 199, Institut Armand-Frappier.
- Kunkel, F., Herrler, G. 1993. Structural and functional analysis of the surface protein of human coronavirus OC43. *Virology* **195** : 195-202.
- Labonté, P., Mounir, S., Talbot, P. J. 1995. Sequence and expression of the ns2 protein gene of human coronavirus OC43. *J Gen Virol* **76** : 431-435.
- Lai, M. M., Patton, C. D., Baric, R. S., Stohlman, S. A. 1983. Presence of leader-sequences in the mRNA of mouse hepatitis virus. *J Virol* **46** : 1027-1033.
- Lai, M. M. 1986. Coronavirus leader-RNA-primed transcription : an alternative mechanism to RNA splicing. *Bioessays* **5** : 257-260.
- Lai, M. M. 1990. Coronavirus : organization, replication and expression of genome. *Ann Rev Microbiol* **44** : 303-333.
- Laporte, J., Bobulesco, P., Rossi, F.. 1980. Une lignée particulièrement sensible à la réplication du coronavirus entérique bovin : les cellules HRT-18. *C.R. Acad Sc Paris* **290 D** : 623-626.
- Lapps, W., Hogue, B. G., Brian, D. A. 1987a. Deduced amino acid sequence and potentiel O-glycosylation sites for the bovine coronavirus matrix protein. *Adv Exp Med Biol* **218** : 123-129.
- Lapps, W., Hogue, B. G., Brian, D. A. 1987b. Sequence analysis of the bovine coronavirus nucleocapsid and matrix protein genes. *Virology* **157** : 47-57.

- Laude, H., Chapsal, J. M., Gelfi, J., Labiau, S., Grosclaude, J. 1986. Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus. I. Properties of monoclonal antibodies directed against virion proteins. *J Gen Virol* **67** : 119-130.
- Laude, H., Gelfi, J., Lavenant, L., Charley, B. 1992. Single amino changes in the viral glycoprotein M affect the induction of alpha interferon by the coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *J Virol* **66** : 743.
- Laude, H., Masters, P. S. 1995. The coronavirus surface glycoprotein in : *The Coronaviridae*. (Siddell, S. G., ed.). Plenum Press, N. Y. pp 73-113.
- Lavery, D. J., Chen-Kiang, S. 1990. Adenovirus E1A and E1B genes are regulated posttranscriptionally in human lymphoid cells. *J Virol* **64** : 5349-5359.
- Lecomte, J., Cainelli-Gebera, V., Mercier, G., Mansour, S., Talbot, P. J., Lussier, G., Oth, D. 1987. Protection from mouse hepatitis virus type 3-induced acute disease by an anti-nucleoprotein monoclonal antibody. *Arch Virol* **67** : 123-130.
- Lee, H. J., Shieh, C. K., Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., La Monica, N., Tuler, J., Bagdzhadzhyan, A., Lai, M. M. 1991. The complete sequence (22 kilobases) of murine coronavirus gene 1 encoding the putative proteases and RNA polymerase, *Virology* **180** : 567-582.
- Leibowitz, J. L., Weiss, S. R., Paavola, E., Bond, C. W. 1982. Cell-free translation of murine coronavirus RNA. *J Virol* **43** : 905-913.
- Lewis, P. J., van Drunen, S., van der Hurk, L., Babiuk, L. A. 1999. Altering the cellular location of an antigen expressed by a DNA-based vaccine modulates the immune response. *J Virol* **73** : 10214-10223.
- Lippe, R., Graham, F. L. 1989. Adenoviruses with nonidentical terminal sequences are viable. *J Virol* **63** : 5133-5141.
- Liu, D. X., Inglis, S. C. 1991. Association of the infectious bronchitis virus 3c protein with the virion envelope. *Virology* **185** : 911-917.
- Luytjes, W., Sturman, L. S., Charite, J., van der Zeijst, B. A. M., Horzinek, M. C., Spaan, W. J. M. 1987. Primary structure of the glycoprotein E2 of coronavirus MHV-A59 and identification of the trypsin cleavage site. *Virology* **161** : 479-487.
- Luytjes, W., Bredenbeek, P., Noten, A. F., Horzinek, M. C., Spaan, W. J. M. 1988. Sequence of mouse hepatitis virus A59 mRNA 2 : Indication for RNA recombination between coronaviruses and influenza C virus. *Virology* **166** : 415-422.

- Maat, J., van Beveren, C. P., van Ormondt, H. 1980. The nucleotide sequence of adenovirus type 5 early region E1 : the region between map positions 8.0 (*Hind*III site) and 11.8 (*Sma*I site). *Gene* **10** : 27-38.
- Makino, S., Keck, J. G., Stohlman, S. A., Lai, M. M. C. 1986a. High-frequency RNA recombination of murine coronaviruses. *J Virol* **57** : 729-737.
- Makino, S., Stohlman, S. A., Lai, M. M. C. 1986b. Leader sequences of murine mRNAs can freely reassorted : evidence for the role of free RNA in transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* **83** : 4204-4208.
- Massie, B., Couture, F., Lamoureux, L., Mosser, D. D., Guilbault, C., Jolicoeur, P., Bélanger, F., Langelier, Y. 1998. Inducible overexpression of a toxic protein by an adenovirus vector with tetracycline-regulable expression cassette. *J Virol* **72**: 2289 –2296.
- McIntosh, K., Dees, J. H., Kapikian, A. Z., Chanock, R. M. 1967. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. **57** :933-940.
- Mebus, C. A., Stair, E. L., Rhodes, M. B., Twiehaus, M. J. 1973. Neonatal calf diarrhea :Propagation, attenuation, and characteristics of a coronavirus-like agent. *Am J Vet Res* **34** : 145-150.
- Mebus, C. A., Newman, L. E., Stair, E. L. 1975. Scanning electron, light, and immunofluorescent microscopy of intestine of gnotobiotic calf infected with calf diarrheal coronavirus. *Am J Vet Res* **36** : 1719-1725.
- Michaud, L., Dea, S. 1993. Characterization of monoclonal antibodies to bovine enteric coronavirus and antigenic variability among Quebec isolates. *Arch Virol* **131** : 455-465.
- Milane, G., Kourtesis, A. B., Dea, S. 1997. Characterization of monoclonal antibodies to the hemagglutinin-esterase glycoprotein of a bovine coronavirus associated with winter dysentery and cross-reactivity to field isolates. *J Clin Microbiol* **35** : 33-40.
- Mounir, S., Talbot, P. J. 1992. Sequence analysis of the membrane protein gene of the human coronavirus OC43. *J Gen Virol* **73** : 2731-2736.
- Mounir, S., Talbot, P. J. 1993a. Human coronavirus OC43 RNA 4 lacks two open reading frames located downstream of the S gene of bovine coronavirus. *Virology* **192** : 355-360.
- Mounir, S., Talbot, P. J. 1993b. Molecular characterization of the S protein gene of human coronavirus OC43. *J Gen Virol* **74** : 1981-1987.

- Mounir, S., Labonté, P., Talbot, P. J. 1994. Characterization of the nonstructural and spike proteins of the human respiratory coronavirus OC43 : comparison with bovine enteric coronavirus. *Adv Exp Med Biol* **342** : 61-67.
- Nakada, S., Creager, R. S., Krystal, M., Aaronson, R. P., Palese, P. 1984. Influenza C virus hemagglutinin : Comparisons with influenza A and B virus hemagglutinins. *J Virol* **50** : 118.
- Niemann, H., Boscheck, B., Evans, D., Rosing, M., Tamura, T., Klenk, H. D. 1982. Post-translational glycosylation of coronavirus glycoprotein E1 : inhibition by monensin. *EMBO J* **1** : 1499-1504.
- Noda, M., Koide, F., Asagi, M., Inaba, Y. 1988. Physicochemical properties of transmissible gastroenteritis virus hemagglutinin. *Arch Virol* **99** : 163-172.
- Ollis, D. L., White, S. W. 1987. Structural basis of protein-nucleic interactions. *Chem Rev* **87** : 981.
- Pachuk, C. J., Bredenbeek, P. J., Zoltick, P. W., Spaan, W. J., Weiss, S. R. 1989. Molecular cloning of the gene encoding the putative polymerase of the mouse hepatitis coronavirus, strain A59. *J Virol* **171** :141-148.
- Payment, P., Trudel, M. 1989. Isolement et identification des virus. Dans : *Manuel de techniques virologiques*. (éd. par Payment, P., Trudel, M.) Presses de l'Université du Québec, Sillery, Québec. pp.21-24.
- Parker, M. D., Cox, G. J., Deregt, D., Fitzpatrick, D. R., Babiuk, L. A. 1989a. Cloning and in vitro expression of the gene for the E3 hemagglutinin glycoprotein of bovine coronavirus. *J Gen Virol* **70** : 155-164.
- Parker, S. E., Gallagher, T. M., Buchmeier, M. J. 1989b. Sequence analysis reveals extensive polymorphism and evidence of deletions within the E2 glycoprotein gene of several strains of murine hepatitis virus. *Virology* **173** : 664-673.
- Parker, M. D., Yoo, D., Babiuk, L. A. 1990. Expression and secretion of the bovine coronavirus hemagglutinin-esterase glycoprotein by insect cells infected with recombinant baculoviruses. *J Virol* **64** : 1625-1629.
- Pedersen, N. C., Ward, J., Mengeling, W. L. 1978. Antigenic relationship of the feline infectious peritonitis virus to coronaviruses of other species. *Arch Virol* **58** : 45-53.
- Pensaert, M. B., Callebaut, P., Vergote, J. 1986. Isolation of a porcine respiratory, non-enteric coronavirus related to transmissible gastroenteritis. *Vet Q* **8** : 257-261.

- Pomeroy, K. A., Patel, B. L., Larsen, C. T. 1978. Combined immunofluorescence and transmission electron microscopic studies of sequential intestinal samples from turkey embryos and poultts infected with turkey enteritis coronavirus. *Am J Vet Res* **39** : 1348-1354.
- Rasschaert, D., Laude, H. 1987. The predicted primary structure of the peplomer protein E2 of the porcine coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *J Gen Virol* **68** : 1883-1890.
- Rasschaert, D., Duarte, M., Laude, H. 1990. Porcine respiratory coronavirus differs from transmissible gastroenteritis virus by a few genomic deletions. *J Gen Virol* **71** : 2599-2607.
- Rekik, M. R., Dea, S. 1994. Comparative sequence analysis of a polymorphic region of the spike glycoprotein S1 subunit of enteric bovine coronavirus isolates. *Arch Virol* **135** : 319-331.
- Reynolds, D. J., Debney, T. J., Hall, G. A., Thomas, L. H., Parsons, K. R. 1985. Studies on the relationship between coronaviruses from the intestinal and respiratory tracts of calves. *Arch Virol* **85**: 71-83.
- Rottier, P. J. M., Spaan, W. J. M., Horzinek, M. C., Van der Zeijst, B. A. M. 1981. Translation of three mouse hepatitis virus strain A59 subgenomic RNAs in *Xenopus laevis* oocytes. *J Virol* **38** : 20-26.
- Rottier, P. J. M., Welling, G. W., Welling-Wester, S., Niesters, H. G. M., Lenstra, J. A., van der Zeijst, B. A. M. 1986. Predicted membrane topology of the coronavirus protein E1. *Biochemistry* **25** : 1335-1339.
- Rottier, P. J. M. 1995. Coronavirus membrane protein. In : *The Coronaviridae*. (Siddell, S. G., ed.). Plenum Press, N. Y. pp 115-139.
- Saif, L., J. Redman, D. R., Moorhead, P. D., Theil, K. W. 1986. Experimentally-induced coronavirus infection in calves : Viral replication in the respiratory and intestinal tracts. *Am J Vet Res* **47** : 1426-1432.
- Saif, L., J. Redman, D. R., Brock, K. V., Kohler, E. M., Heckerr, R. A. 1988. Winter dysentery in adult dairy cattle : detection of coronaviruses in the feces. *Vet Rec* **123** : 300-301.
- Saif, L., J. 1990. A review of evidence implicating bovine coronavirus in the etiology of winter dysentery in cows: an enigma resolved?[editorial]. *Cornell Vet* **80** : 303-311.

- Saif, L. J., Heckert, R. A. 1990. Enteric coronaviruses. Dans : *Viral Diarrheas of man and animals*. (édité par Saif, L. J., Theil, K. W.) CRC Press, Boca Raton, FL. Pp 185-252.
- Saif, L. J., Brock, K. V., Redman, D. R., Kohler, E. M. 1991. Winter dysentery in dairy herds : electron microscopic and serological evidence for an association with coronavirus infection. *Vet Res* **128** : 447-449.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning : a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Springs Harbor, N.Y.
- Sanger, N. S., Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74** : 5463-5467.
- Sawicki, S. G., Sawicki, D. L. 1986. Coronavirus minus-strand RNA synthesis and effect of cycloheximide on coronavirus RNA synthesis. *J Virol* **57** : 328-334.
- Sawicki, S. G., Sawicki, D. L. 1990. Coronavirus transcription : Subgenomic mouse hepatitis virus replicative intermediates function in RNA synthesis. *J Virol* **64** : 1050-1056.
- Schmidt, I., Skinner, M., Siddell, S. 1987. S nucleotide sequence of the gene encoding the surface projection glycoprotein of coronavirus MHV-JHM. *J Gen Virol* **68** : 47-56.
- Schockley, L. J., Kapke, P. A., Lapps, W., Brian, D. A., Potgieter, L. N. D., Woods, R. 1987. Diagnosis of porcine and bovine enteric coronavirus infections using cloned cDNA probes. *J Clin Microbiol* **25** : 1591-1596.
- Schultze, B., Gross, H. J., Brossmer, R., Herrler, G. 1991a. The S protein of bovine coronavirus is a hemagglutinating recognizing 9-O-acetylated sialic acid as a receptor determinant. *J Virol* **65** : 6232-6237.
- Schultze, B., Wahn, K., Klenk, H. D., Herrler, G. 1991b. Isolated HE-protein from hemagglutinating encephalomyelitis virus and bovine coronavirus has receptor-destroying and receptor-binding activity. *Virology* **180** : 221-228.
- Schultze, B., Herrler, G. 1992. Bovine coronavirus uses N-acetylneuraminic acid as a receptor determinant to initiate the infection of culture cells. *J Gen Virol* **73** : 901-906.
- Senanayake, S. D., Hofmann, M. A., Maki, J. L., Brian, D. A. 1992. The nucleocapsid protein gene of bovine coronavirus is bicistronic. *J Virol* : 5277-5283.

- Sestak, K., Zhongfang, Z., Shoup, D. I., Saif, L. J. 1999. Evaluation of the baculovirus-expressed S glycoprotein of transmissible gastroenteritis virus (TGEV) as antigen in a competition ELISA to differentiate porcine respiratory coronavirus from TGEV antibodies in pigs. *J Vet Diagn Invest* **11** : 205-214.
- Sethna, P. B., Brian, D. A. 1997. Coronavirus genomic and subgenomic minus-strand RNAs copartition in membrane-protected replication complexes. *J Virol* **71** : 7744-7749.
- Sharpee, R. L., Mebus, C. A., Bass, E. P. 1976. Characterization of a calf diarrheal coronavirus. *Am J Vet Res* **37** : 1031-1041.
- Siddell, S.G., Wege, H., Ter Meulen, V. 1982. The structure and replication of coronaviruses. [Reviews] *Curr Top Microbiol Immunol* **99** : 131-136.
- Siddell, S.G. 1983. Coronavirus JHM : coding assignments of subgenomic mRNAs. *J Gen Virol* **64** : 113-125.
- Skinner, M. A., Ebner, D., Siddell, S. G. 1985. Coronavirus MHV-JHM mRNA 5 has a sequence arrangement which potentially allows translation of a second, downstream open reading frame. *J Gen Virol* **66** : 581-592.
- Smith, D. R. Tsunemitsu, H., Heckert, R. A., Saif, L. J. 1996. Evaluation of two antigen-capture ELISAs using polyclonal or monoclonal antibodies for the detection of bovine coronavirus. *J Vet Diagn Invest* **8** : 99-105.
- Spaan, W. J. M., Delius, H., Skinner, M., Armstrong, J., Rottier, P., Smeekens, S., Van der Zeijst, B. A. M., Siddell, S. G. 1983. Coronavirus mRNA synthesis involves fusion of non-contiguous sequence. *EMBO J* **2** : 1839-1844.
- Spaan, W. J. M., Cavanagh, D., Horzinek, M. C. 1988. Coronaviruses : structure and genome expression. *J Gen Virol* **69** : 2939-2952.
- Spaan, W. J. M., Cavanagh, D., Horzinek, M. C. 1990. Coronaviruses in : *Immunochemistry of Viruses, Vol 2, The Basis for Serodiagnosis and Vaccines* (M. H. V. Regenmortel and A. R. Neurath, eds.), pp.359-379, Elsevier, Amsterdam.
- Stern, D. F., Sefton, B. M. 1982. Coronavirus proteins : Structure and function of the oligosaccharides of the avian infectious bronchitis virus glycoproteins. *J Virol* **44** : 804-812.
- Stohlman, S. A., Fleming, J. O., Patton, C. D., Lai, M. M. C. 1983. Synthesis and subcellular localization of the murine coronavirus nucleocapsid protein. *Virology* **130** : 527.



- Stohlman, S. A., Baric, R. S., Nelson, G. N., Soe, L. H., Welter, L. M., Deans, R. J. 1988. Specific interaction between coronavirus leader RNA and nucleocapsid protein. *J Virol* **62** : 4288-4295.
- Storz, J., Rott, R., Kaluza, G. 1981. Enhancement of plaque formation and cell fusion of an enteropathogenic coronavirus by trypsin treatment. *Infect Immun* **31**: 1214-1222.
- Storz, J., Herrler, G., Snodgrass, D. R., Hussain, K. A., Zhang, X. M., Clark, M. A., Rott, R. 1991. Monoclonal antibodies differentiate between the haemagglutinating and the receptor-destroying activities of bovine coronavirus. *J Gen Virol* **72** : 2817-2820.
- Storz, J., Zhang, X. M., Rott, R. 1992. Comparison of hemagglutinating, receptor-destroying, and acetylsterase activities of avirulent and virulent bovine coronavirus strains. *Arch Virol* **125** : 193-204.
- Storz, J., Stine, L., Liem, A., Anderson, G. A. 1996. Coronavirus isolation from nasal swabs samples in cattle with signs of respiratory tract disease after shipping. *J Am Vet Med Assoc* **208** : 1452-1454.
- Sturman, L. S., Holmes, K. V. 1977. Characterization of a coronavirus . II. Glycoproteins of the viral envelope : tryptic peptide analysis. *Virology* **77** : 650-660.
- Sturman, L. S., Holmes, K. V. 1983. The molecular biology of coronavirus. *Adv Vir Res* **28** : 35-112.
- Sturman, L. S., Ricard, C. S., Holmes, K. V. 1985. Proteolytic clivage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus : activation of cell-fusing activity of virions by trypsin and separation of two different 90 K cleavage fragments. *J Virol* **56** : 904-911.
- Sugiyama, K., Amano, Y. 1981. Morphological and biological properties of a new coronavirus associated with diarrhea in infant mice. *Arch Virol* **67** : 241-251.
- Talbot, P.J., Salmi, A. A., Knobler, R. L., Buchmeier, M. J. 1984. Topographical mapping of epitopes on the glycoproteins of murine hepatitis virus-4 (strain JHM) : correlation with biological activities. *Virology* **132** : 250-260.
- Talbot, JP., Buchmeier, M. J. 1985. Antigenic variation among murine coronaviruses : evidence for polymorphism on the peplomer glycoprotein E2. *Virus Res* **2** : 317-328.

- Thompkins, A. F., Watrach, A. M., Schmale, J. D., Schultz, R. M., Harris, J. A. 1974. Cultural and antigenic properties of newly established cell strains derived from adenocarcinomas of the human colon and rectum. *J Natl Cancer Inst* **52** :101-106.
- Tooze, J., Tooze, S., Warren, G. 1984. Replication of coronavirus MHV-A59 in sac-cells : determination of the first site of budding of progeny virions. *Eur J Cell Biol* **33** : 281-293.
- Tooze, J., Tooze, S.A. 1985. Infection of AtT20 murine pituitary tumour cells by mouse hepatitis virus strain A59 : virus budding is restricted to the Golgi region. *Eur J Cell Biol* **37** : 203-212.
- Tsunemitsu, H., Saif, L. J. 1995. Antigenic and biological comparisons of bovine coronaviruses derived from neonatal calf diarrhea and winter dysentery of adult cattle. *Arch Virol* **140** : 1303-1311.
- Tsunemitsu, H., Smith, D. R., Saif, L. J. 1999. Experimental inoculation of adult dairy cows with bovine coronavirus and detection of coronavirus in feces by RT-PCR. *Arch Virol* **144** : 167-175.
- Tyrrell, D. A. J. et Bynoe, M. L. 1965. Cultivation of a novel type of common-cold virus in organ cultures. *Br Med* **1** : 1467-1470.
- van der Most, R. G., Bredenbeek, P. J., Spaan, W. J. 1991 A domain at the 3' end of the polymerase gene is essential for encapsidation of coronavirus defective interfering RNAs. *J Virol* **65** : 3219-3226.
- van Marle, G., Luytjes, W., van der Most, R. G., van der Straaten, T., Spaan, W. J. M. 1995. Regulation of coronavirus mRNA transcription. *J Virol* **69**:7851-7856.
- Vautherot, J. F., Laporte, J., Madelaine, M. F., Bobulesco, P., Roseto, A. 1984. Antigenic and polypeptide structure of bovine enteric coronavirus as defined by monoclonal antibodies. *Adv Exp Med Biol* **173** : 117-132.
- Vautherot, J. F., Madelaine, M. F., Laporte, J. 1990. Topological and functional analysis of epitopes on the S (E2) and E (E3) glycoproteins of bovine enteric coronavirus. *Adv Expt Med Biol* **276** : 173-179.
- Vautherot, J. F., Laporte, J., Boireau, P. 1992a. Bovine coronavirus peplomer glycoproteins : detailed antigenic analysis of S1, S2 and HE. *J GenVirol* **73** : 1725-1737.
- Vautherot, J. F., Laporte, J., Boireau, P. 1992b. Bovine coronavirus spike glycoprotein : localization of an immunodominant region at the amino-terminal end of S2. *J Gen Virol* **73** : 3289-3294.

- Vennema, H., Godeke, G. J., Rossen, J. W., Voorhout, W. F., Horzinek, M. C., Opstelten, D. J., Rottier, P. J. 1996. Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particules by co-expression of viral envelope protein genes. *EMBO J* **15** : 2020-2028.
- Verbeek, A., Tijssen, P. 1988. Biotinylated and radioactive cDNA probes in the detection by hybridization of bovine enteric coronavirus. *Mol Cell Probes* **2** : 209-223.
- Verbeek, A., Tijssen, P. 1991. Sequence analysis of the turkey enteric coronavirus nucleocapsid and membrane protein genes : a close relationship with bovine coronavirus. *J Gen Virol* **72** : 1659-1766.
- Verbeek, A., Dea, S., Tijssen, P. 1990. Detection of bovine coronavirus by hybridization with cDNA probes. *Mol Cell Probes* **4** : 107-120.
- Verbeek, A., Dea, S., Tijssen, P. 1991. Genomic relationship between turkey and bovine enteric coronaviruses identified by hybridization with BCV or TCV specific cDNA probes. *Arch Virol* **121** : 199-211.
- Vlasak, R., Krystal, M., Nacht, M., Palese, P. 1987. The influenza C virus glycoprotein (HE) exhibits receptor-binding (hemagglutinin) and receptor-destroying (esterase) activities. *Virology*. **160** : 419-425.
- Vlasak, R., Luytjes, W., Leider, J., Spaan, W., Palese, P. 1988a. The E3 protein of bovine coronavirus is a receptor-destroying enzyme with acetylerase activity. *J Virol* **62** : 4686-4690.
- Vlasak, R., Luytjes, W., Spaan, W., Palese, P. 1988b. Human and bovine coronaviruses recognize sialic acid-containing receptors similar to those of influenza C viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* **85** : 4526-4529.
- Wege, H., Dorries, R., Wege, H. 1984. Hybridoma antibodies to the murine coronavirus JHM : characterization of epitopes on the peplomer protein (E2). *J Gen Virol* **65** : 1931-1942.
- Wesseling, J. G., Godeke, G. J., Schijns, V. E., Prevec, L., Graham, F. L., Horzinek, M. C., Rottier, P. J. 1993. Mouse hepatitis virus spike and nucleocapsid proteins expressed by adenovirus vectors protect mice against a lethal infection. *J Gen Virol* **74** : 2061-2069.
- Williams, R. K., Jiang, G. S., Snyder, S. W., Frana, M. F., Holmes, K. V. 1990. Purification of the 110-kilodalton glycoprotein receptor for mouse hepatitis virus (MHV) -A59 from mouse liver and identification of a nonfunctional, homologous protein in MHV-resistant SJL/J mice. *J Virol* **64** : 3817-3823.

- Williams, R. K., Jiang, G. S., Holmes, K. V. 1991. Receptor for mouse hepatitis virus is a member of the carcinoembryonic antigen family of glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **88** : 5533-5536.
- Wold, W. S. M. Gooding, L. R. 1991. Region E3 of adenovirus : a cassette of genes involved in host immunosurveillance and virus-cell interaction. *Virology* **184** : 1-8.
- Yeager, C. L., Ashmun, R. A., Williams, R. K., Cardellichio, C. B., Shapiro, L. H., Look, A. T., Holmes, K. V. 1992. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature*. **357** : 420-422.
- Yokomori, K., Asanaka, M., Stohlman, S.A., Makino, S., Shubin, R. A., Gilmore, W., Weiner, L. P., Wang, F.-I., Lai, M. M. C. 1995. Neuropathogenicity of mouse hepatitis virus JHM isolates differing in hemagglutinin-esterase protein expression. *J Neurovirol* **1** : 330-339.
- Yokota, T., Arai, N., Lee, F., Rennick, D., Mosmann, T., Arai, K. 1984. Use of a cDNA expression vector for isolation of mouse interleukin 2 cDNA clones : Expression of T-cell growth-factor activity after transfection of monkey cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **82** : 68-72.
- Yoo, D., Parker, M. D., Babiuk, L. A. 1990. Analysis of the S spike (peplomer) Glycoprotein of bovine coronavirus synthesized in insect cells. *Virology* **179** : 121-128.
- Yoo, D., Parker, M. D., Song, J., Cox, G. J., Deregt, D., Babiuk, L. A. 1991. Structural analysis of the conformational domains involved in neutralization of bovine coronavirus using deletion mutants of the spike glycoprotein S1 subunit expressed by recombinant baculoviruses. *Virology* **183** : 91-98.
- Yoo, D., Graham, F. L., Prevec, L., Parker, M. D., Benko, M., Zamb, T., Babiuk, L. A. 1992. Synthesis and processing of the haemagglutinin-esterase glycoprotein of bovine coronavirus encoded in the E3 region of adenovirus. *J Gen Virol* **73** : 2591-2600.
- Yu, X., Weiss, S. R., Leibowitz, J. L. 1994. Mouse hepatitis virus gene 5b is a new virion envelope protein. *Virology* **202** : 1018-1023.
- Zhang, X., Kousoulas, K. G., Storz, J. 1991a. Comparison of the nucleotide and deduced amino acid sequences of the S genes specified by virulent and avirulent strains of bovine coronaviruses. *Virology* **183** : 397-404.
- Zhang, X., Kousoulas, K. G., Storz, J. 1991b. The hemagglutinin/esterase glycoprotein of bovine coronaviruses : Sequence and functional comparisons between virulent and avirulent strains. *Virology* **185** : 847-852.

- Zhang, X., Kousoulos, K. G., Storz, J. 1992. The hemagglutinin/esterase glycoprotein of human coronavirus strain OC43 : Phylogenetic relationships to bovine and murine coronaviruses and influenza C virus. *Virology* **186** : 318.
- Zhang, X., Herbst, W., Kousoulos, K.G., Storz, J. 1994a. Comparison of the S genes and biological properties of respiratory and enteropathogenic bovine coronaviruses. *Arch Virol* **134** : 421-426.
- Zhang, J., Markovic-Plese, S., Lacet, B., Raus, J., Weiner, H. L., Hafler, D. A. 1994b. Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* **179** : 973-984.

## **ANNEXES**

## ANNEXE 1

### Liste des communications

- 1- **Gélinas, A.-M.**, B. Massie et S. Dea. « Variations génomiques parmi les coronavirus associés aux problèmes entériques et respiratoires chez les bovins ». Congrès des Producteurs Agricoles du Québec (CPAQ), Québec Présentation orale 31 mai 2000.
- 2- A.M.-J. Sasseville, C. Faubert, **A.-M. Gélinas**, N, Sawyer, M. Boutin et S. Dea. « Caractéristiques biologiques et moléculaires d'un isolat du coronavirus HEV responsable d'épidémies d'encéphalomyélite dans les fermes porcines du Québec ». Congrès des Producteurs Agricoles du Québec (CPAQ), Québec. Présentation affiche (31 mai et 1 juin 2000).
- 3- **Gélinas, A.-M.**, A.M.-J. Sasseville et S. Dea. « The 3'end of the genome of bovine coronaviruses associated with enteric and respiratory diseases in dairy cattle revealed specific variations within the HE, S1 and ORF4 genes ». VIIIth International Symposium on Nidoviruses, Philadelphie Poster presentation (20-25 mai 2000)
- 4- A.M.-J. Sasseville, **A.-M. Gélinas**, N, Sawyer, M. Boutin et S. Dea. « Biological and molecular characteristics of an HEV isolate cultivate from a recent outbreak of encephalomyelitis in a Quebec pig farm ». VIIIth International Symposium on Nidoviruses, Philadelphie Poster presentation (20-25 mai 2000)
- 5- **Gélinas, A.-M.** et S. Dea. « Variations spécifiques observées dans trois régions génomiques des coronavirus bovins associés à la diarrhée néonatale du veau, la dysenterie d'hiver ou la pneumonie ». 1<sup>er</sup> Congrès Interne INRS-Institut Armand-Frappier (Sherbrooke, Québec). Présentation orale (Vendredi, le 5 novembre 1999).
- 6- A.B. Kourtesis, **Gélinas, A.-M.**, A.M.-J. Sasseville, B. Massie et S. Dea. « Genomic and antigenic variations of the HE glycoprotein of bovine coronaviruses associated with neonatal calf diarrhea and winter dysentery ». The 18<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society for Virology, ASV (Amherst, Massachusetts) Coronaviruses and Arteriviruses- Poster presentation (Lundi, le 12 juillet 1999).
- 7- **Gélinas, A.-M.**, A.M.-J. Sasseville et S. Dea. « Specific variations of three genomic regions of bovine coronaviruses associated with winter dysentery, neonatal calf diarrhea and pneumonia ». The 49<sup>th</sup> Annual Meeting of the Canadian Society of Microbiology, CSM (Montreal, Québec), Veterinary microbiology session- Oral presentation (Mardi, le 15 juin 1999)

## ANNEXE 2

### Liste des publications

- 1- A.B. Kourtesis, **Gélinas, A.-M.** et S. Dea. 2000. «Genomic and Antigenic comparison of the HE glycoprotein of bovine coronavirus isolates associated with neonatal calf diarrhea and winter dysentery ». *Archives of Virology* (soumis).
- 2- **Gélinas, A.-M.**, A.M.-J. Sasseville et S. Dea. 2000. « Identification of specific variations within the HE, S1 and ORF4 genes of bovine coronaviruses associated with enteric and respiratory diseases in dairy cattle». *Adv Exp Biol* (soumis)
- 3- A.M.-J. Sasseville, **A.-M. Gélinas**, N, Sawyer, M. Boutin et S. Dea. 2000.« Biological and molecular characteristics of an HEV isolate associated with recent acute outbreaks of encephalomyelitis in Quebec pig farms ». *Adv Exp Biol* (soumis)

#### En préparation

- 4- **Gélinas, A.-M.** and S.Dea. 2000. « Antigenic and genomic variations amongst coronaviruses associated with enteric and respiratory diseases in dairy cattle». *J Gen Virol*
- 5- **Gélinas, A.-M.**, A.B. Kourtesis, M. Boutin, B. Massie and S.Dea. 2000. « Bovine coronaviruses associated with winter dysentery and neonatal calf diarrhea differ in their hemagglutinating and acetyl esterase activities : confirmation using recombinant adenoviruses». *J Gen Virol*



## ANNEXE 3

### Génotypes des souches de bactéries utilisées

HB101 : F<sup>-</sup> *mcrB mrr hsdS20* (*r<sub>B</sub>*<sup>-</sup>, *m<sup>B</sup>*<sup>-</sup>)*recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1pro A2*  
*rpsL20*(Sm<sup>r</sup>)*xyl-5 λ<sup>-</sup> leu mtl-1*

INVαF' : F' *endA1 recA1 hsdR17* (*r<sub>k</sub>*, *m<sub>k</sub>*<sup>+</sup>) *supE44 thi-1 gyrA96 relA1 φ80lacZΔM15*  
(*lacZYA-argF*)U169

## ANNEXE 4

### Liste des acides aminés et leurs abréviations

A	Alanine
C	Cystéine
D	Acide Aspartique
E	Acide Glutamique
F	Phénylalanine
G	Glycine
H	Histidine
I	Isoleucine
L	Leucine
K	Lysine
M	Méthionine
N	Asparagine
P	Proline
Q	Glutamine
R	Arginine
S	Sérine
T	Thréonine
V	Valine
W	Tryptophane
Y	Tyrosine