Aux trois femmes de mon existence: ma mère, ma femme et ma petite fille Joëlle.

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA MAITRISE EN VIROLOGIE ET IMMUNOLOGIE

PAR

PATRICK LABONTÉ

IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DE LA PROTÉINE CODÉE PAR LE GÈNE NS2 DU CORONAVIRUS HUMAIN DE SOUCHE OC43.

MARS 1995

KEVUE BIBLIOGRAPHIQUE
1- CORONAVIRUS4
1.1- Historique4
1.2- Caractéristiques chimiques et physico-chimiques4
1.3- Groupes antigéniques5
1.4- Caractéristiques génomiques8
1.5- Transcription
1.5.1- Modèle du "Leader-Primer"
les séquences de tête(s) agissent comme amorces9
1.5.2- Modèle d'amplification directe13
1.5.3- Modèle de production d'antisens à partir de l'ARN
génomique
1.5.4- Modèle de la boucle d'excision
1.6- Structure du virion14
1.7- Protéines structurales15
1.7.1- La protéine de la nucléocapside (N)
1.7.2- La protéine de membrane (M)
1.7.3- La protéine de surface (S)
1.7.4- La protéine hémagglutinine estérase (HE)
1.7.5- La petite protéine de surface (sM)
1.8- Les protéines non-structurales
1.8.1- HCV-229E
1.8.2- IBV
1.8.3- TGEV. 26
1.84- MHV 26
1.8.5- BCV 29
186-HCV-OC43 29
19-Pénétration et production des virions 34
2- CORONAVIRUS HI IMAIN
2 1- Historique
2.1- Pathologies 36
3. I IEN ENTRE HCV Ω CA3 of BCV 37
$3 l_{\rm a} L \text{ ion antigénique}$
3.2. Lion conomiculo entre RCV et $HCV_{1}CV_{1}$
3.2. Tropismo
3.4 Problématique
3.4- FTODIEIRalique
J.J- OUJECUIS
MATERIEL ET METHODES

1- CULTURE CELLULAIRE	44
1.1- Virus	44
1.2- Cellules	44
2- PRÉPARATION DE L'ARN	45
2.1- Préparation des cellules.	45
2.2- Isolement de l'ARN.	46
3- RT-PCR	46
3.1- Production de l'ADN complémentaire	
3.2- Amplification de l'ADN	47
3.3- Analyse des produits de PCR	
4- CLONAGE DES PRODUITS DE PCR	
4.1- Gel préparatif et extraction de l'agarose.	
4.2- Ligation dans un vecteur "T".	
4.3- Transformation des bactéries <i>E. coli</i> (InvαF').	
4.4- Culture des colonies recombinantes.	50
4.5- Extration de l'ADN plasmidique	50
4.6- Digestion enzymatique et analyse sur gel	51
5- SÉQUENÇAGE PAR SYNTHÈSE DE DIDESOXYNUCLÉOTIDES	552
5.1- Préparation de l'ADN.	52
5.2- Dénaturation.	52
5.3- Appariement des amorces	53
5.4- Réaction de synthèse.	53
5.5- Électrophorèse	54
5.5.1- Préparation du gel de polyacrylamide	54
5.5.2- Montage de l'appareil.	54
5.5.3- Autoradiographie.	55
5.6- Analyse des séquences	56
6- CLONAGE DANS LE VECTEUR D'EXPRESSION pMAL™-c2	56
6.1- Réaction de PCR avec de nouvelles amorces.	56
6.2- Linéarisation du vecteur et préparation de l'insert.	57
6.3- Ligation dans le vecteur d'expression pMAL [™] -c2	58
6.4- Préparation de cellules compétentes TB1.	58
6.5- Transformation des bactéries E. coli (TB1).	59
6.6- Criblage par hybridation avec une sonde marquée au ³² F	·59
6.6.1- Préparation des membranes de nitrocellulose	59
6.6.2- Préparation de la sonde radioactive.	60
6.6.3- Hybridation et exposition	61
6.7- Carte de restriction des colonies recombinantes	62
8- PRODUCTION D'UN ANTISÉRUM	62
8.1- Purification de la protéine de fusion.	62
8.1.1- Induction des colonies positives	62
8.1.2- Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en	
présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE)	64
8.1.3- Conditions optimale d'induction	64

.

8.1.4- Libération des protéines de fusion des corps	
d'inclusions.	65
8.1.5- Chromatographie d'affinité	66
8.1.6- Dialyse et dosage	66
8.2- Protocole d'immunisation.	67
9- IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE	67
9.1- Préparation des lames d'immunofluorescence.	67
9.2- Répartition des anticorps	68
10- IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN	69
10.1- Préparation des échantillons.	69
10.2 Migration et transfert des protéines sur une membrane de	
nitrocellulose	71
10.3- Détection des protéines par la technique	
d'immunobuvardage	71
RÉSULTATS	73
1- Amplification du gène ns2.	74
2- Séquence du gène ns2.	81
3- Analyse et comparaison de la séquence en acides aminés	86
4- Expression de la protéine ns2 et production d'un antisérum	86
5- Immunofluorescence	106
6- Immunobuvardage	106
DISCUSSION	111
CONCLUSION	121
BIBLIOGRAPHIE	123
REMERCIEMENTS	144
COMMUNICATIONS	145
PUBLICATION	146

LISTE DES ABRÉVIATIONS

acide aminé
antigène carcinoembryonaire
acide désoxyribonucléique
acide désoxyribonucléique complémentaire
acide ribonucléique
acide ribonucléique messager
"The American Type Culture Collection"
adénosine triphosphate
coronavirus entérique bovin
coronavirus respiratoire bovin
albumine sérique bovine
coronavirus canin
coups par minute
particules coronaviriformes
désoxyadénosine triphosphate
désoxycytosine triphosphate
didésoxyadénosine triphosphate
didésoxycytosine triphosphate
didésoxyguanosine triphosphate
didésoxythyrosine triphosphate
désoxyguanosine triphosphate
dimétylsulfoxide
désoxythyrosine triphosphate
acide éthylènediaminetétraacétique

ELISA	"Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay"
FECV	coronavirus entérique félin
FIPV	virus infectieux du péritoine félin
FITC	isothiocyanate de fluorescéine
FR	formes réplicatives
GIT	isothiocyanate de guanidium
GTP	guanosine triphosphate
HCV	coronavirus respiratoire humain
HE	hémagglutinine estérase
HECV	coronavirus entérique humain
HEPES	acide N-[2-hydroxyéthyl]piperazine-N'-[2-éthanesulfonique]
HEV	virus porcin de l'encéphalomyélite hémagglutinante
HLA	antigènes leucocytaires humain
HIP	la protéine hydrophobe
HRT-18	cellules humaines provenant d'une tumeur rectale
IBV	virus de la bronchite infectieuse aviaire
Ig	immunoglobuline
IPTG	isopropyle β -D-thiogalactopyranoside
LB	millieu de culture bactérien
MBP	protéine liant le maltose (Maltose binding protein)
MHV	virus hépatique de la souris
MHVR	récepteur du virus MHV
min	minute
MOI	multiplicité d'infections
NTPase	enzyme "nucléotide triphosphatase"
ORF	cadre de lecture ouvert ("Open Reading Frame")

ORF i	cadre de lecture ouvert interne
PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide
pb	paire de bases
PBS	tampon phosphate
PBST	PBS et tween 20
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PEG	polyétylène glycol
PTA	acide phosphotungstique
RbCV	coronavirus du lapin
RD	rhabdomyosarcome
RIPA	essai de radioimmunoprécipitation
RT	transcription inverse
RT-PCR	réaction de transcription inverse suivie d'une réaction de
	polymérisation en chaîne
SBF	sérum bovin fétal
SDS	dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
sM	la petite protéine de membrane
SOB	milieu de culture bactérien
SSC	citrate de sodium et chlorure de sodium
STETL	saccharose, triton X-100, EDTA, tris, lysosyme
TAE	tris-acétate, EDTA
TBE	tris, acide borique, EDTA
TCV	coronavirus de la dinde
TE	tris, EDTA
TEMED	N, N, N', N'-tetraméthyléthylenediamine

TGEV	virus porcin de la gastroentérite transmissible
TMEN	tris-acétate, EDTA et chlorure de sodium
TPCK	chlorométhyle de N-tosyl-L-phénylalanine
tris	tris(hydroxyméthyle)aminométhane
U.V.	rayon ultra-violet
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-galactoside

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I	Groupes antigéniques des coronavirus, leur hôte et les	
	maladies causées par ces virus.	6
TABLEAU II	Identité entre la protéine ns2 de HCV-OC43, BCV, MHV-JF	ΞM
	et MHV-A59.	91

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. Modèles de transcription de l'ARN des coronavirus.	10
FIGURE 2. Coronavirus humain de souche OC43 vu par microscopie	
électronique.	16
FIGURE 3. Schématisation du virion d'un coronavirus.	18
FIGURE 4. Organisation moléculaire du génome de HCV-229E,	
TGEV, IBV, MHV-JHM, MHV-A59, BCV et HCV-OC43.	31
FIGURE 5. Organisation du génome du HCV-OC43.	39
FIGURE 6. Hybridation d'ARN de type "Northern" indiquant les ARNm	
du HCV-OC43.	75
FIGURE 7. Amplification d'ADN à l'aide des amorces 32KI et 32KH.	77
FIGURE 8. Amplification d'ADN à l'aide des amorces 32KI et Leader.	79
FIGURE 9. Profil de restriction.	82
FIGURE 10. Séquence complète du gène ns2 de HCV-OC43 ainsi que	
la séquence en acides aminés correspondante.	84
FIGURE 11. Profil d'hydrophilicité de la protéine ns2.	87
FIGURE 12. Comparaison de la séquence en acides aminés de la	
protéine ns2 de HCV-OC43, BCV, MHV-JHM et MHV-A59.	89
FIGURE 13. Amplification d'ADN à l'aide des amorces Bam HI 32KI	
et Bam HI 32KH.	93
FIGURE 14. Détection des bactéries recombinantes par hybridation	
avec le gène ns2 marqué au $[\alpha - 32P]$ dCTP.	96
FIGURE 15. Induction de l'expression de la protéine de fusion MBP-ns2.	98
FIGURE 16. Localisation cellulaire de la protéine de fusion MBP-ns2.	100
FIGURE 17. Paramètres optimaux pour l'induction de l'expression de	

la protéine de fusion MBP-ns2.	102
FIGURE 18. Purification de la protéine de fusion MBP-ns2 par	
chromatographie d'affinité.	104
FIGURE 19. Immunofluorescence indirecte des cellules HRT-18	
infectées par HCV-OC43.	107
FIGURE 20. Immunobuvardage des cellules HRT-18 infectées par	
HCV-OC43.	109

SOMMAIRE

L'analyse et la comparaison des génomes du coronavirus respiratoire humain HCV-OC43 et du coronavirus entérique bovin BCV démontrent clairement que ces deux virus sont très proches du point de vue phylogénétique. En effet toutes les séquences connues codant pour les protéines structurales de ces deux virus ont plus de 91% d'identité entre elles. Pourtant, HCV-OC43 et BCV infectent des hôtes et des organes différents mais se cultivent *in vitro* sur la même lignée cellulaire. Afin de compléter la caractérisation du génome du HCV-OC43 (à l'exception de l'ARNm 1 codant pour la polymérase d'ARN) et de comparer celle-ci avec celle de BCV, nous avons analysé le gène et le produit de ce gène se trouvant en 5' de l'ARNm 2.

À l'aide d'amorces spécifiques, nous avons amplifié par RT-PCR la région en 5' du gène de la HE de l'ARNm 2. Nous avons démontré que cette région contient un ORF codant pour une protéine putative de 278 acides aminés avec une masse moléculaire de 32.2 kDa. L'analyse informatisée de la séquence en acides aminés de cette protéine putavive ns2 a permis d'identifier six sites potentiels de phosphorylation et aucun site de *N*-glycosylation. La comparaison de la protéine putative ns2 de HCV-OC43 avec la séquence de la protéine ns2 des autres coronavirus a permis de constater que la séquence de cette protéine est hautement conservée. En effet, on observe 92% d'identité entre la protéine ns2 de BCV et de HCV-OC43, et environ 50% entre les protéines ns2 de ces deux virus (BCV et HCV-OC43) et celles d'autres coronavirus (MHV-JHM et MHV-A59).

Suite à l'expression de la protéine ns2 du HCV-OC43 dans le vecteur d'expression procaryotique pMAL[™]-c2, nous avons produit chez le lapin un

antisérum spécifique à cette protéine. Par immunofluorescence, nous avons montré l'expression de la protéine ns2 du HCV-OC43 dans les cellules HRT-18 infectées par HCV-OC43. Finalement, par immunobuvardage, nous avons montré que la protéine ns2 est probablement une protéine non-structurale car nous avons montré qu'elle est absente de préparations de virus HCV-OC43 purifiés.

INTRODUCTION

Les coronavirus sont des virus enveloppés à ARN simple brin de polarité positive d'environ 30 kb. L'ARN génomique code pour six à neuf ARNm sousgénomiques coiffés et polyadénylés. Chacune des extrémités 5' de ces ARNm possède une séquence de tête qui provient de l'extrémité 5' de l'ARN génomique et tous les ARNm possèdent une séquence commune à leur extrémité 3'.

Les coronavirus humains (HCV) sont d'importants pathogènes respiratoires, car ils sont impliqués dans 15 à 35% des rhumes. De plus, certaines observations semblent indiquer qu'ils pourraient être impliqués dans des maladies plus graves telles que des pneumonies, des périmyocardites, des entérites et la sclérose en plaques.

La souche OC43 du HCV, contient cinq protéines structurales: la glycoprotéine de surface (S), la glycoprotéine hémagglutinine estérase (HE), la phosphoprotéine de la nucléocapside (N), la glycoprotéine de membrane (M), et la petite protéine de membrane (sM). En plus de ces protéines structurales, HCV-OC43 possède plusieurs cadres de lectures ouverts codant pour des protéines putatives non-structurales.

Par ce projet, nous voulons dans un premier temps, caractériser la région situé en 5' de l'ARNm 2 du coronavirus respiratoire humain de souche OC43 et comparer cette région du génome avec la région correspondante du coronavirus entérique bovin. Dans un deuxième temps, nous voulons vérifier l'expression de la protéine putative se rapportant à cette région du génome du HCV-OC43 en culture cellulaire et déterminer la nature de la protéine produite à partir de cette région du génome du HCV-OC43.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1- CORONAVIRUS

1.1- Historique.

Premier membre de la famille des *Coronaviridae* à avoir été isolé (Beaudette et Hudson, 1937), le virus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV) fût également le premier coronavirus à avoir été observé avec un microscope électronique (Berry *et al.*, 1964). À cette époque, on ne parlait pas encore d'une nouvelle famille virale. En 1968, on proposa pour la première fois le nom coronavirus pour relier entre eux des virus qui, en microscopie électronique, avaient des ressemblances marquées (Almeida *et al.*, 1968). Facilement identifiable par leur taille, leur forme et surtout par la présence autour de leur enveloppe d'une couronne très caractéristique, la famille des *Coronaviridae* été officiellement reconnue en 1975 (Tyrell *et al.*, 1975) et compte aujourd'hui une douzaine de virus différents réunis sous le genre Coronavirus.

1.2- Caractéristiques chimiques et physico-chimiques.

Les coronavirus sont sensibles à l'éther et au chloroforme, ce qui indique la présence d'une enveloppe virale. En se basant sur la morphologie et la morphogenèse des virions, tout indique que l'enveloppe virale dérive de la membrane cellulaire (Kaye *et al.*, 1970). L'utilisation de molécules inhibitrices du métabolisme de l'acide désoxyribonucléique (ADN) tels que: 5'-iododésoxyuridine, 5'-bromodésoxyuridine, la cytosine arabinoside et l'aminoptérine (Parker *et al.*, 1970; Akers et Cunningham, 1968) a démontré que le génome des coronavirus est constitué d'acides ribonucléiques (ARN). En effet, la croissance du virus était

insensible à de tels inhibiteurs. Les coronavirus possèdent une densité variant de 1,16 à 1,23 g/cm³ sur gradient de saccharose, avec un coefficient de sédimentation de 330 à 416 S (Tyrrell *et al.*, 1975). Le pH optimum des coronavirus semble varier selon les souches mais un pH de 6-6.5 semble conserver la stabilité de la majorité de ceux-ci. Les coronavirus sont rapidement inactivés à 56 °C mais ils demeurent stables plusieurs jours à 37 °C (Hofstad, 1956; Cowen *et al.*, 1971; Bucknall, 1972; Daniel et Talbot, 1987; Lamarre et Talbot, 1989).

1.3- Groupes antigéniques.

Les coronavirus sont répartis en quatre groupes antigéniques distincts (Tableau I). La répartition des divers virus dans ces groupes a été obtenue suite à des études sérologiques tels que: test de neutralisation, inhibition d'hémagglutination, fixation du complément et gel de diffusion (Bradburne, 1970; Horzinek *et al.*, 1982; Gerna *et al.*, 1981), immunofluorescence (Pedersen *et al.*, 1978; Pensaert *et al.*, 1981; Zhou *et al.*, 1988), immunoperoxydase indirecte (Gerna *et al.*, 1981), immunobuvardage (Horzinek *et al.*, 1982; Hogue *et al.*, 1984; Zhou *et al.*, 1988), immunoélectrophorèse à deux dimensions (Schmidt et Kenny, 1981), "Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay" (ELISA) (Macnaughton *et al.*, 1981; Horzinek *et al.*, 1982; Zhou *et al.*, 1988), essai de radioimmunoprécipitation (RIPA) (Horzinek *et al.*, 1982; Zhou *et al.*, 1988). TABLEAU I. Groupes antigéniques des coronavirus, leur hôte et les maladies causées par ces virus.

Abréviations: CCV, coronavirus canin; TGEV, virus porcin de la gastroentérite transmissible; FECV, coronavirus entérique félin; FIPV, virus infectieux du péritoine félin; HCV-229E, coronavirus respiratoire humain; HEV, virus porcin de l'encéphalomyélite hémagglutinante; RbCV, coronavirus du lapin; MHV, virus hépatique de la souris; BCV, coronavirus entérique bovin; HCV-OC43, souche OC43 du coronavirus respiratoire humain; IBV, virus de la bronchite infectieuse aviaire; TCV, coronavirus de la dinde. Les points d'interrogations (?) indiquent la possibilité d'un tropisme secondaire pour ces virus.

modifié de: Holmes, 1990.

Groupe	Virus	Hôte	Infection Respiratoire	Infection Entérique	Infection Neurologique	Hépatite
I	CCV	Chien		x		
•	TGEV	Porc	X	X		
	FECV	Chat		X		
	FIPV	Chat	X	X	Х	Х
	HCV-229E	Homme	X	?	?	
11	HEV RbCV MHV	Porc Lapin Souris	X X	X X X	x x	x
11	HEV RbCV MHV BCV HCV-OC43	Porc Lapin Souris Boeuf Homme	X X X	X X X X ?	× × ?	x
11	HEV RbCV MHV BCV HCV-OC43	Porc Lapin Souris Boeuf Homme Poulet	x x x x	X X X X ?	X X ?	X

1.4- Caractéristiques génomiques.

Les coronavirus sont des virus à ARN de polarité positive possédant le plus long génome parmi les virus à ARN (27-31 kb). Les cellules infectées produisent six à neuf acides ribonucléiques messagers (ARNm) sous-génomiques de différentes longueurs. Les coronavirus diffèrent des autres virus à ARN positif par le fait qu'ils utilisent une multitude de transcrits pour la synthèse de leurs protéines. L'ARN génomique ainsi que les ARNm sont coiffés, polyadénylés et possèdent tous la même extrémité 3'-coterminale. Ainsi, chaque ARNm contient la séquence complète de l'ARNm qui lui est inférieur en taille. Bien que chaque ARNm contient la séquence nucléotidique pouvant coder pour une ou plusieurs protéines, généralement seul le cadre de lecture ouvert (ORF) situé à l'extrémité 5' de chaque ARNm est traduit (Rottier et al., 1981; Siddel et al., 1980). Cette caractéristique rend chacun des ARNm responsable de la synthèse d'une protéine virale. De plus, l'ARN génomique et les différents ARNm ont en commun à leurs extrémités 5', la présence d'une séquence de tête de 65 à 90 nucléotides. À l'intérieur de cette séquence de tête, on retrouve des séquences répétées de pentanucléotides. La séquence de ces pentanucléotides est homologue à une séquence heptamérique retrouvée entre chacun des gènes (séquence intergénique consensus). Plusieurs mécanismes de transcription ont été suggérés afin de tenir compte de ces caractéristiques spécifiques du génome des Coronaviridaes.

1.5- Transcription.

En 1981, Liesbeth Jacobs et coll. furent l'un des premiers groupes de chercheurs à s'interroger sur l'origine des ARNm de ces virus (Jacobs *et al.*, 1981).

Grâce à des expériences montrant l'effet de l'irradiation aux ultra-violets (U.V.) de cellules infectées sur le taux de transcription des ARN, ils ont démontré que les précurseurs de chacun des ARNm sont indépendants les uns des autres. Donc que les ARNm ne proviennent pas d'un épissage conventionnel (effectué dans le noyau) de l'ARN génomique.

1.5.1- Modèle du "Leader-Primer": les séquences de tête(s) agissent comme amorces .

Ce modèle original élaboré par Lai en 1982, fait suite à l'observation que l'ARN génomique produit un ARN pleine longueur de polarité négative (Lai *et al.*, 1982; Baric *et al.*, 1983). À partir de l'extrémité 3' de cet ARN antisens, sont synthétisés des oligonucléotides de 65 à 90 nucléotides correspondant à la séquence de tête. Ceux-ci vont par la suite s'apparier sur les régions intergéniques consensus de l'ARN de polarité négative. Une fois en place, ces séquences de têtes servent alors d'amorces pour la synthèse des différents ARNm de polarité positive. Par contre, il a été démontré récemment que chacun des ARNm possède un brin complémentaire (Sethna *et al.*, 1989; Sawicki et Sawicki, 1990). Afin de tenir compte de cette nouvelle donnée, Sethna proposa que la transcription se passe en deux étapes. Premièrement la production des différents ARNm par le mécanisme de "Leader-Primer" et deuxièmement, une amplification des différents ARNm par la production de formes réplicatives (FR) de l'ARN (double brin) (Figure 1A). FIGURE 1. Modèles de transcription de l'ARN des coronavirus. A, mécanisme du "Leader Primer"; B, mécanisme d'amplification directe; C, mécanisme impliquant la production d'ARN antisens provenant de l'ARN génomique; D, mécanisme de la boucle d'excision; (=), séquence tête; (=), séquence tête de polarité négative; (-/), queue d'acides adényliques; (+), ARN de polarité positive; (-), ARN de polarité négative.

.





D)



1.5.2- Modèle d'amplification directe.

Le groupe de Sethna puis celui de Zhao ont démontré que les différents ARNm viraux sous-génomiques peuvent être encapsidés dans le virion (Sethna *et al.*, 1991; Zhao *et al.*, 1993). Ils évoquent la possibilité que les coronavirus transportent dans leurs virions tous les ARNm nécessaires à la réplication. Suite à la décapsidation du virion dans le cytoplasme, les différents ARNm produisent directement les ARN antisens nécessaires à la formation des formes réplicatives (FR). (Figure 1B).

1.5.3- Modèle de production d'antisens à partir de l'ARN génomique.

Ce modèle proposé par Sawicki et coll. en 1990 (Sawicki et Sawicki., 1990) suggère que l'ARN génomique sert directement de matrice pour la synthèse des différents ARN antisens. Ce modèle implique donc que la transcription de chaque ARN antisens est arrêtée de façon alternative au niveau des séquences intergéniques. Par la suite, les ARN antisens produisent les FR nécessaires à l'amplification des ARNm. Les ARNm produits par ce mécanisme ne possèdent pas de séquence de tête à leur extrémité 5'. Pour être plausible, ce modèle doit faire intervenir une étape de jonction entre la séquence tête et les ARNm (sens ou antisens) (Figure 1C).

1.5.4- Modèle de la boucle d'excision.

Ce modèle proposé par le groupe de Lai (Baric *et al.*, 1983) est un modèle alternatif de l'épissage conventionnel. Mécanisme fort simple qui implique la

formation de boucles sur l'ARN génomique entre la séquence de tête et les différents emplacements de la séquence intergenique consensus. Les ARN antisens sont de différentes longueurs selon la grosseur de la boucle formée. Encore une fois, les antisens forment par la suite des FR (Figure 1D).

La plupart de ces modèles tiennent compte de la présence de séquences de tête(s) à l'extrémité 5' des ARNm et de l'extrémité 3' coterminal de ceux-ci. Depuis quelques années déjà, les coronavirologistes privilégient le modèle de "Leader-Primer" décrit par Lai. L'observation de séquences de tête(s) libres dans le cytoplasme des cellules infectées supporte ce modèle (Baric *et al.*, 1985). En 1992, une étude similaire à celle réalisée par Jacobs et coll. en 1981 démontre que la transcription des ARNm s'effectue en deux étapes. Dans un premier temps, la transcription nécessite la présence d'un ARN pleine longueur. Dans un deuxième temps, la production des différents ARNm se fait de façon indépendante, comme l'a démontré Jacobs et coll. (Jacobs *et al.*, 1981; Yokomori *et al.*, 1992). Ces données sont en accord avec le modèle de "Leader-Primer" mais également avec ceux impliquant la formation d'une boucle d'excision ou la production d'ARN antisens à partir de l'ARN génomique. Jusqu'à présent, aucune donnée scientifique ne permet de déterminer avec certitude le mécanisme moléculaire par lequel les coronavirus répliquent leurs ARNm.

1.6- Structure du virion.

Le virion pléomorphe des coronavirus (60 à 220 nm), possède une ou deux franges de spicules de 12 à 24 nm (Tyrrell *et al.*, 1975). Trois protéines structurales majeures composent le virion des coronavirus: la phosphoprotéine de la

nucléocapside (N), la glycoprotéine de membrane (M) et la glycoprotéine de surface (S). Certains coronavirus contiennent une ou deux autres protéines structurales soient l'hémagglutinine estérase (HE) et/ou la petite protéine de membrane (sM) récemment identifiée comme étant structurale (Smith *et al.*, 1990; Liu et Inglis, 1991; Godet *et al.*, 1992). Un schéma du virion est illustré sur les figures 2 et 3.

1.7- Protéines structurales

1.7.1- La protéine de la nucléocapside (N).

La protéine phosphorylée N (50-60 kDa) s'associe avec l'ARN génomique pour former une nucléocapside de symétrie hélicoïdale de 10 à 20 nm de diamètre (Macnaughton *et al.*, 1978; Stohlman et Lai, 1979). La protéine N joue un rôle important dans l'initiation de l'encapsidation du génome. Ainsi, le bourgeonnement du virion est amorcé suite à l'association de l'extrémité C-terminale de la protéine N avec la protéine M à la surface du réticulum endoplasmique (Sturman *et al.*, 1980). Cependant, il a été démontré que la protéine N a une forte affinité pour les phospholipides et par conséquent la présence de la protéine M n'est pas indispensable pour l'association de la nucléocapside à la membrane virale (Anderson et Wong, 1993). De plus, la protéine N pourrait être impliquée dans la réplication de l'ARN puisque des antisérums anti-N inhibent la synthèse de l'ARN génomique *in vitro* (Compton *et al.*, 1987). Il a également été démontré que la protéine N peut se lier de façon spécifique aux séquences de tête(s) libres dans le cytoplasme (Stohlman *et al.*, 1988). FIGURE 2. Coronavirus humain de souche OC43 vue par microscopie électronique. La barre représente 50 nm.



FIGURE 3. Schématisation du virion d'un coronavirus. N, la protéine de la nucléocapside. M, la protéine de membrane. S, la protéine de surface et HE, la protéine hémagglutinine estérase (dimère).



1.7.2- La protéine de membrane (M).

La protéine M (20-30 kDa) est une protéine fortement imbriquée dans l'enveloppe virale par trois hélices- α hydrophobes qui traversent la membrane trois fois (Armstrong *et al.*, 1984; Boursnell *et al.*, 1984). Seulement 10% de la protéine (Nterminale) est exposé à la surface (Rottier *et al.*, 1986; Cavanagh *et al.*, 1986a; Sturman et Holmes, 1977; Jouvenne *et al.*, 1990). La moitié C-terminale de la protéine se retrouve sous la bicouche lipidique (Laude *et al.*, 1987). La glycosylation de la protéine M peut-être de type "N" ou "O" liée selon la souche virale. Le nombre de résidus glycosylés et l'extension de ceux-ci varient beaucoup (Laude *et al.*, 1987; Stern et Sefton, 1982). En plus d'initier le bourgeonnement du virion suite à son association avec la protéine N, la protéine M détermine le site du bourgeonnement (Rotier et Rose, 1987). En effet, il a été observé que le bourgeonnement est initié en des sites où il y a une accumulation de la protéine M (Tooz*e et al.*, 1984). La protéine M serait donc nécessaire à la maturation et à la détermination du site d'assemblage du virion.

1.7.3- La protéine de surface (S).

Les spicules qui forment la couronne des coronavirus sont formés par la protéine S et/ou HE. La protéine S (180-200 kDa) est ancrée dans la membrane virale à l'aide d'une courte séquence hydrophobe transmembranaire provenant de l'extrémité C-terminale de la protéine. La majeure partie de la protéine est exposée à l'extérieur du virion. Bien que le nombre d'acides aminés (aa) pour cette protéine diffère beaucoup selon les divers coronavirus, il semble que cette protéine soit

fortement N-glycosylée sur les résidus asparagine (Cavanagh, 1983a; Stern et Sefton, 1982). Il a été montré que les spicules des coronavirus sont des oligomères formés de deux (Cavanagh, 1983b) à trois protéines S (Laude et al., 1987). Le maintien de la structure quaternaire de ces oligomères ne serait pas dû à des ponts disulfures intermoléculaires. Sous l'action de protéases, la protéine S peut-être scindée, selon la souche virale et le type cellulaire, en deux fragments d'environ 90 kDa appelés S1 et S2 (Sturman et al., 1985; Deregt et al., 1987; Hogue et Brian, 1986). Le site de clivage de la protéine S est constitué d'une suite d'aa basiques (Binns et al., 1985; Cavanagh et al., 1986b; Luytjes et al., 1987). Le traitement du virion à l'urée a permis de démontrer que la partie S2 correspond à la région C-terminale imbriquée dans la bicouche lipidique et que S1 forme la partie bulbeuse externe de la protéine S (Cavanagh, 1983b). Il est généralement admis que l'attachement du virion au récepteur cellulaire se fait par l'intermédiaire de la protéine S et/ou de la protéine HE. Plus précisément, la partie S1 de la protéine S serait responsable de l'attachement du virus puisque le retrait de la partie S1 suite au traitement du virion à l'urée, abolit le potentiel infectieux et hémagglutinant du virus (Cavanagh et Davis, 1986). La protéine S peut induire la fusion membranaire et la formation de syncytia (Collins et al., 1982; Frana et al., 1985; Holmes et al., 1981; Sturman et al., 1985). Dans certains cas, le clivage de la protéine S active la fusion cellulaire mais parfois celle-ci peut se produire sans ce clivage protéolytique (Sturman et al., 1985; De Groot et al., 1987; Sawicki, 1987). Plusieurs anticorps monoclonaux dirigés contre la partie S1 ou S2 de la protéine S se sont avérés neutralisants et protecteurs in vivo (Daniel et al., 1993) ce qui démontre l'importance de cette protéine lors de l'infection virale.

1.7.4- La protéine hémagglutinine estérase (HE).

La protéine HE est présente chez les coronavirus suivants: BCV, MHV-JHM, HEV, HCV-OC43 et TCV. Cette protéine de 65 kDa se retrouve dans le virion sous la forme d'un dimère de 130-140 kDa. Ce dimère est maintenu par des ponts disulfures intermoléculaires (Hogue et Brian, 1986). Le domaine transmembranaire d'ancrage de la protéine à l'enveloppe virale semble être situé à l'extrémité Cterminale de la protéine (Parker et al., 1989). La protéine HE possède plusieurs régions d'homologie avec la sous-unité HA₁ du virus influenza de type C. Ceci est probablement le résultat d'une recombinaison entre les génomes viraux du coronavirus et de l'influenza type C (Luytjes et al., 1988). Le rôle de la protéine HE est encore inconnu bien que l'on soupçonne son implication dans l'attachement du virion à la cellule. En effet, HE se lie spécifiquement à l'acide sialique O-acétylé présent sur les érythrocytes et certaines cellules (Vlasak et al., 1988b; Herrler et al., 1991). De plus, chez certains de ces coronavirus possédant la HE, une destruction de l'acide sialique a été observée, ce qui permet l'élution du virus (Vlasak et al., 1988a). Cette destruction serait causée par une activité estérase provenant de la protéine HE. L'inhibition de cette activité estérase réduit considérablement l'infectivité du virus (Vlasak *et al.*, 1988b).

1.7.5- La petite protéine de surface (sM).

Le gène codant pour la protéine sM (9-12 kDa) est présent chez la plupart des coronavirus étudiés jusqu'à présent. On a d'abord cru que ce gène codait pour une protéine non-structurale. Grâce à des antisérums spécifiques dirigés contre le
produit de ce gène chez IBV et TGEV, il a été montré que la protéine est incorporée dans le virion (Smith *et al.*, 1990; Liu et Inglis, 1991; Godet *et al.*, 1992). À partir de la séquence en aa de cette protéine sM ("Small Membrane") nouvellement définie comme étant structurale, un site potentiel d'ancrage de la protéine à l'enveloppe virale a été suggéré. Ce site serait situé au deuxième quart de la protéine à partir de l'extrémité *N*-terminale (Godet *et al.*, 1992). Bien que le rôle de cette protéine soit inconnu, plusieurs similitudes morphologiques entre cette protéine et la protéine M2 du virus de l'influenza A ont été observées (Smith *et al.*, 1990). La protéine M2 sert de canal ionique à la fois pour la décapsidation du virion dans la cellule et pour l'encapsidation des nouvelles particules virales (Sugrue et Hay, 1991). Il est donc permis de supposer que la protéine sM jouerait un rôle similaire pour les coronavirus.

1.8- Les protéines non-structurales.

Une protéine virale non-structurale (ns) est une protéine codée par un virus qui lors d'une infection est produite dans la cellule mais qui n'est pas intégrée dans la particule virale. Ces protéines non-structurales sont donc codées par le génome viral et se trouvent soit emmagasinées dans la cellule soit sécrétées hors de celle-ci. Puisque les protéines non-structurales ne sont pas incorporées dans le virion, l'identification de leur appartenance à un virus est plus difficile. En effet, pour différencier les protéines virales non-structurales des protéines cellulaires on doit avoir recours à des anticorps spécifiques. Ce processus de détection fastidieux est probablement la principale raison expliquant le peu de travaux sur la caractérisation des protéines non-structurales. Pourtant, les protéines non-structurales sont probablement très importantes pour la réplication des virus puisque leurs gènes sont conservés au cours des nombreux passages. De plus, il arrive souvent qu'une protéine non-structurale est présente chez plusieurs virus de la même famille virale. Il arrive également que des régions comportant des séquences d'homologie pour une protéine non-structurale soit observées entre des virus de différentes familles. Tout ceci témoigne de l'importance fonctionnelle des protéines non-structurales. Il arrive parfois que l'on attribue à un virus des protéines non-structurales avant même que ces dites protéines ne soient pas identifiées. Cette classification peut se produire après l'observation d'un cadre de lecture ouvert situé dans un contexte favorable à son expression ou si le produit de ce cadre de lecture a déjà été démontré chez un autre membre de la famille virale. Dans la section qui suit, une énumération des gènes codant pour les protéines non-structurales a été réalisée et ce de concert avec l'identification des protéines non-structurales déjà caractérisées pour les principaux membres de la famille des coronavirus (Fig. 4).

1.8.1- HCV-229E.

La séquence nucléotidique du génome du HCV-229E a été complétée récemment. Les deux premiers tiers du génome codent pour la polymérase virale. Cette enzyme est codée à partir de deux larges ORF (Herold *et al.*, 1993; Boursnell *et al.*, 1987; Bredenbeek *et al.*, 1990b; Lee *et al.*, 1991). Il semble que ces deux cadres de lectures ouverts (ORF) codent pour plusieurs protéines ayant des rôles fonctionnels relatifs: -à la réplication de l'ARN (Leibowitz *et al.*, 1982; Schaad *et al.*, 1990; Keck *et al.*, 1987; Baric *et al.*, 1990; Gorbalenya *et al.*, 1989), -à la protéolyse (Leibowitz *et al.*, 1982; Baker *et al.*, 1989; Gorbalenya *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1991), -à l'activité de transméthylation nécessaire à l'ajout de la coiffe en 5' des ARNm. La région du gène codant pour cette activité n'a pas encore identifiée. Dans le dernier tiers du génome, on retrouve deux gènes codant pour des protéines putatives ns. Raabe et Siddell (1989) ont en premier lieu démontré que ces gènes étaient situés en 5' de l'ARNm 4 et 5. Des études ultérieures ont démontré des résultats contradictoires indiquant que les deux gènes étaient situés à l'extrémité 5' de l'ARNm 4. Ces gènes coderaient pour deux protéines putatives ns de 4.6 et 9.6 kDa respectivement (Raabe *et al.*, 1990; Jouvenne *et al.*, 1992). Les produits de ces gènes n'ont pas encore été identifiés. La protéine ns4b semble être la contrepartie de la protéine HP ("Hydrophobic Protein") de IBV et TGEV (voir sections 1.8.2 et 1.8.3). Le contenu en leucine et isoleucine de cette protéine est de 20 %, ce qui en fait une protéine très hydrophobe.

1.8.2- IBV.

Le coronavirus de la bronchite infectieuse aviaire possède en plus du gène codant pour la polymérase (Boursnell *et al.*, 1987) quatre autres gènes codant possiblement pour des protéines ns. Deux de ces gènes sont situés en 5' de l'ARNm 5 (5a et 5b) (Boursnell et Brown, 1984) et le produit de ces gènes a été identifié (Liu et Inglis, 1992). La protéine ns5a de 7.5 kDa, nommé également HP, contient 17 résidus leucines sur ses 65 aa. Sa nature hydrophobe de même que sa localisation membranaire telle qu'observée en immunofluorescence indiquent qu'il s'agit d'une protéine associée à la membrane cellulaire (Boursnell et Brown, 1984). Par contre, la séquence en aa de la protéine ns5b ne montre aucun profil particulier. On sait seulement que la localisation de ns5b est périnucléaire (Liu et Inglis, 1992). Deux autres gènes codant pour des protéines non-structurales ont été identifiés en 5' de l'ARNm 3 (3a et 3b) (Boursnell *et al.*, 1985). Les protéines correspondantes ns3a et ns3b ont des masses moléculaires respectives de 6.7 et 7.4 kDa (Liu *et al.*, 1991). La fonction et la localisation sur le virus de ces protéines sont encore inconnues.

1.8.3- TGEV.

La séquence complète de la région correspondante aux deux premiers tiers du génome du virus porcin de la gastroentérite transmissible a été présentée au VI^{ième} Symposium International sur les coronavirus et virus apparentés (Québec, Québec, Canada, 1994) et sera publiée incessamment. Le dernier tiers du génome situé en 3' de la polymérase contient trois gènes codant possiblement pour des protéines nonstructurales. Ces gènes sont situés en 5' de l'ARNm 3 (3a et 3b) et en 3' du gène de la nucléocapside (Wesley *et al.*, 1989; Kapke et Brian, 1986). Les protéines ns3a et ns3b n'ont pas encore été identifiées dans des cellules infectées mais elles auraient des masses moléculaires respectives de 7.8 et 27.7 kDa. La protéine HP de 9.5 kDa produite par le gène en 3' de celui de la protéine N a été identifiée (Garwes *et al.*, 1989). Même si sa séquence en aa renferme 24 résidus leucines, la protéine HP de TGEV ne contient aucune homologie de séquence avec la protéine HP de IBV et HCV-229E. On ne sait pas encore si cette protéine est produite à partir d'un nouvel ARNm ou à partir de l'ARNm 7. Son association avec la membrane a été démontrée (Tung *et al.*, 1992) mais son rôle est encore inconnu.

1.8.4- MHV.

Parmi les différentes souches de coronavirus murins, deux ont été particulièrement étudiées. Il s'agit des souches JHM et A59. La séquence nucléotidique complète du génome de ces deux souches virales a été complétée. Comme chez IBV et HCV-229E, les deux premiers tiers du génome viral contiennent le gène codant pour la polymérase. Ce gène est formé par deux longs ORF (Pachuk *et al.*, 1989; Bredenbeek *et al.*, 1990b; Lee *et al.*, 1991; Bonilla *et al.*, 1994). Cette région coderait pour diverses activités enzymatiques (voir section 1.8.1). De plus, certains résultats expérimentaux indiquent que la polymérase serait en fait une polyprotéine contenant une activité autoprotéolytique (Baker, 1989; Denison *et al.*, 1991). Compte tenu de la taille du gène de la polymérase, il est fort probable que de plus petits ORF codant pour des protéines ns inconnues soient présents à l'intérieur du gène de la polymérase. Tout ceci indique que cette région du génome pourrait renfermer un nombre considérable de protéines ns.

Le dernier tiers du génome des souches JHM et A59 contient plusieurs ORF codant pour des protéines ns. Un de ces ORF est situé en 5' de l'ARNm 2 (Luytjes *et al.*, 1988; Shieh *et al.*, 1989). La protéine ns2 (30 kDa) correspondante à ce gène a été identifiée (Bredenbeek *et al.*, 1990a; Zoltick *et al.*, 1990) et elle est jusqu'à présent la plus grosse protéine ns identifiée chez un coronavirus. Cette protéine est localisée dans le cytoplasme des cellules infectées (Zoltick *et al.*, 1990) et ne semble pas pouvoir s'intégrer dans une membrane lipidique, comme l'indique son profil d'hydrophilicité. De plus, sa présence ne semble pas essentielle pour la réplication du virus en culture cellulaire (Schwarz *et al.*, 1990). L'analyse de la séquence nucléotidique de ce gène montre la présence de domaines caractéristiques des protéines liant l'adénosine triphosphate (ATP) et le guanosine triphosphate (GTP) mais aucune étude n'a encore démontré la liaison de la ns2 avec des acides nucléiques. L'extrémité 5' de l'ARNm 4 contient un ORF (ns4: 139 aa) chez JHM et deux ORF (ns4a et ns4b: 19 et 106 aa) chez A59 (Skinner et Siddell, 1985; Weiss *et al.*, 1993). Seule la protéine ns4 de JHM a été jusqu'à présent identifiée (Ebner *et al.*,

1988) mais il semble que sa présence ne soit pas essentielle pour la réplication de certaine souche de MHV en culture cellulaire (Yokomori et Lai., 1991). Une mutation ponctuelle serait responsable de la création d'un codon de terminaison ambre dans le gène ns4 du MHV-A59, ce qui aurait occasionné la création d'un deuxième ORF. La traduction in vitro d'un ARNm synthétique contenant l'ORF 4a et 4b du MHV-A59 a montré que seule la protéine ns4a est synthétisée. De plus, un antisérum dirigé contre la protéine ns4 du MHV-JHM ne permet pas de détecter la protéine ns4b du MHV-A59 par la technique d'immunobuvardage (Weiss et al., 1993), ce qui laisse supposer que la protéine ns4b n'est pas produite par le virus, du moins en culture cellulaire. Un ORF codant pour une protéine putative nonstructurale de 13 kDa a été identifié en 5' de l'ARNm 5 (Skinner et al., 1985; Budzilowicz et Weiss 1987). La protéine ns5 correspondante n'a pas encore été identifiée en culture cellulaire et aucune fonction particulière n'a pu être déduite de sa séquence en aa. La protéine ns5 ne serait pas nécessaire à la réplication virale (Yokomori et Lai, 1991). Un cadre de lecture interne (ORF i) a été observé à l'intérieur de la séquence nucléotidique du gène codant pour la protéine N. Cet ORF i est de 16 aa pour JHM et de 90 aa pour A59 (Skinner et Siddell, 1983; Armstrong et al., 1983). Encore une fois, les protéines correspondantes n'ont pas encore été identifiées. Récemment, une étude a montré l'existence d'un ARNm additionnel chez le coronavirus murin (Schaad et Baric, 1993). L'extrémité 5' de ce nouvel ARNm serait constituée des 154 aa en C-terminal de la protéine N. Ce cadre de lecture appelé arbitrairement ORF i2 est précédé d'une séquence intergénique consensus, ce qui rend l'expression de la protéine correspondante probable. La protéine putative nsi2 peut également être présente chez BCV et HCV-OC43 puisque ces deux virus possèdent également une séquence consensus à l'intérieur du gène de

la protéine N mais aucun ARNm additionnel n'a été identifié jusqu'à présent chez ces deux virus.

1.8.5- BCV.

Le coronavirus bovin possède plusieurs ORF dans le dernier tiers de son génome qui code pour des protéines possiblement non-structurales. Il contient un gène en 5' de la HE codant pour la protéine ns2 (Cox et al., 1989), tel qu'observé chez MHV. La protéine ns2 de BCV est phosphorylée et sa localisation est cytoplasmique (Cox et al., 1991). En 5' de l'ARNm 4, l'on retrouve deux petits ORF. Ces deux ORF (4.9 et 4.8 kDa) ne font qu'un ORF (15 kDa) chez MHV JHM avec lequel ils ont 32 % d'identité (Abraham et al., 1990b). Une protéine putative ns5 (12.7 kDa) serait codée à partir de l'extrémité 5' de l'ARNm 5. Cette protéine possède une région transmembranaire et présente 50% d'identité avec la protéine ns5a de MHV JHM et A59. Finalement, comme chez MHV-A59, un ORF interne (207 aa) a été observé à l'intérieur du gène de la protéine N (Lapps et al., 1987). La protéine correspondante à cette ORF i a été observée en culture cellulaire et, bien qu'elle ne possède pas de région possiblement transmembranaire, son association avec la membrane cellulaire a été clairement établie (Senayake et al., 1992). Il s'agit de la première démonstration chez un virus à ARN positif, de l'expression d'une protéine codée à partir d'un cadre de lecture interne.

1.8.6- HCV-OC43.

L'étude des protéines non-structurales du coronavirus humain de souche OC43 est très récente. La caractérisation des gènes codant pour les protéines nonstructurales du HCV-OC43 a été accomplie en grande partie dans notre laboratoire. La caractérisation de l'ARNm 4 du HCV-OC43 a permis d'observer la présence d'un ORF codant pour seulement 11 aa (Mounir et Talbot, 1993a). De ces 11 aa, 9 sont identiques à la portion N-terminale de la protéine putative ns4a (4.9 kDa) de BCV. Il est donc possible que cette région du génome ait subi une délétion chez HCV-OC43 puisque chez BCV, cette région possède deux ORF codant pour 43 et 45 aa respectivement. Comme chez MHV et BCV, un gène codant pour une protéine putative non-structurale de 12.9 kDa est présent en 5' de l'ARNm 5. La séquence en aa prédite présente 96% d'identité avec son homologue chez BCV (Mounir *et al.*, 1994). Contrairement à BCV, le gène interne de 207 aa situé à l'intérieur de l'ORF codant la protéine N est scindé en deux ORF de 60 et 108 aa chez HCV-OC43 (Kamahora *et al*, 1989). On ignore encore si les protéines correspondantes sont exprimées. FIGURE 4. Organisation moléculaire du génome de HCV-229E, TGEV, IBV, MHV-JHM, MHV-A59, BCV, HCV-OC43. , cadres de lectures ouverts; c:::, cadres de lectures ouverts de dimensions réduites; ORFi, cadres de lectures ouverts internes; Poly, ARN polymérase ARN dépendant.









.







1.9- Pénétration et production des virions.

Les coronavirus pénètrent dans la cellule par endocytose ou par fusion de l'enveloppe virale à la membrane cellulaire (Krzystyniak et Dupuy, 1984; Mizzen et al., 1985). La liaison des particules virales aux cellules cibles dépend de l'attachement des protéines virales de surface (S et/ou HE) aux récepteurs spécifiques sur la membrane cellulaire. Actuellement, deux récepteurs ont été identifiés chez MHV, il s'agit du MHVR-1 (mmCGM1 de 100 kDa) et du MHVR-2 (mmCGM2 de 58 kDa) (Williams et al., 1991; Dveksler et al., 1991; Yokomori et Lai, Ces deux récepteurs font partie de la famille des antigènes 1992). carcinoembryonnaires (ACE). Ils sont codées à partir d'un épissage alternatif d'un même gène. Les virus possédant la protéine HE peuvent également se fixer sur l'acide sialique 9-O acétylé présent à la surface des globules rouges et de certaines autres cellules (Vlasak et al., 1988b; Herrler et al., 1991). L'aminopeptidase N présente sur les cellules épithéliales du tractus respiratoire a récemment été identifiée comme étant un récepteur pour la souche 229E du coronavirus humain (Yeager et al., 1992) et du virus porcin TGEV (Delmas et al., 1992; Delmas et al., 1994). Des études sur des cellules humaines de rhabdomyosarcome (RD) ont montré que trois protéines membranaires de 90, 45 et 36 kDa respectivement, peuvent lier le virus OC43. L'une de ces protéines est l'antigène des leucocytes humains (HLA) de classe I (Collins, 1993a; Collins, 1993b) qui se retrouve à la surface de la plupart des cellules nuclés humaines.

Suite à la pénétration du virus, celui-ci est décapsidé et l'ARN génomique sert directement de matrice pour la synthèse de la polymérase virale (Sturman et Holmes, 1983). Cette enzyme donne naissance par la suite aux différents ARNm par l'un des mécanismes de transcription décrit plus tôt (section 1.5). La traduction des différents ARNm se fait à la surface du réticulum endoplasmique rugueux, à l'exception de la protéine N qui est produite sur les ribosomes libres dans le cytoplasme. Une fois produite, la protéine N s'associe à l'ARN génomique pour former la nucléocapside. L'assemblage des protéines virales commence au niveau du réticulum endoplasmique rugueux et l'association de la nucléocapside à la protéine de la membrane a pour effet d'amorcer le bourgeonnement. Les protéines S et HE sont glycosylées dans le réticulum endoplasmique rugueux et celle-ci se poursuit dans l'appareil de Golgi. La protéine M est glycosylée post-traductionnellement dans le Golgi (Niemann *et al.*, 1982). Les virions matures sont par la suite transportés vers la membrane cellulaire dans des vésicules post-golgiennes et sont sécrétés suite à la fusion de cette vésicule à la membrane cellulaire ou par lyse cellulaire (Holmes *et al.*, 1984).

2- CORONAVIRUS HUMAIN

2.1- Historique.

Au début des années 60, un groupe de chercheurs préleva des échantillons d'écoulement nasaux chez des étudiants du secondaire atteints de rhumes (Kendall *et al.*, 1962). De ces échantillons, ils ont différencié trois groupes d'agents responsables de ces rhumes. Les virus du premier groupe se multipliaient sur des cultures cellulaires de reins de singes, ceux du second groupe sur des cultures cellulaires de reins humains et ceux du troisième groupe ne se multipliaient sur aucun type cellulaire. En 1966, une autre étude (Hamre et Procknow, 1966) a permis d'isoler cinq agents viraux sur des cultures de reins humains. La caractérisation de l'un de ces agents, appelé 229E, a permit de l'identifier comme étant un nouveau virus ayant des caractéristiques similaires au virus IBV. Parallèlement à cette étude, un autre groupe de chercheurs réussissait à faire croître des virus du troisième groupe d'agents causant le rhume (isolé en 1962) sur des cultures primaires de cellules de la trachée humaine (Tyrell et Bynoe, 1965). Grâce à ces cultures de tissus humains, on a réussi par la suite à caractériser un virus (OC43) pouvant induire le rhume chez l'homme et la souris (McIntosh *et al.*, 1967a; McIntosh *et al.*, 1967b). Ces études ont permis l'identification de deux nouveaux virus causant le rhume. Ils se multiplient sur des cultures de cellules différentes mais possèdent tous les deux des ressemblances structurales marquées avec les virus IBV et MHV (McIntosh *et al.*, 1969). Aujourd'hui, les coronavirus humains sont encore représentés par ces deux prototypes, soit HCV-229E et HCV-OC43.

2.2- Pathologies.

Pendant plusieurs années, les coronavirus humains ont été associés uniquement à l'induction de rhumes communs de forme bénigne. En effet, des études ont démontré que les coronavirus humains sont le facteur étiologique de 15 à 35% des rhumes communs (McIntosh, 1974). L'implication du HCV-OC43 dans des maladies plus graves telles que des pneumonies et des périmyocardites a été suggérée (Riski et Hovi, 1980). Des particules virales morphologiquement semblables aux coronavirus (coronaviriformes) ont été identifiées dans les matières fécales de jeunes enfants (Resta *et al.*, 1985; Mortensen *et al.*, 1985). Ce virus (CVLP ou HECV) possède des similitudes antigèniques avec la souche OC43 (Battaglia *et al.*, 1987). Les difficultés à établir des lignées cellulaires efficaces pouvant supporter la réplication du HECV ont empêché jusqu'à présent de relier ce virus de façon définitive au coronavirus. Des particules coronaviriformes ont également été observées dans des coupes de cerveau d'individus atteints de sclérose en plaques (Tanaka *et al.*, 1976). Par la suite, d'autres études similaires ont permis d'identifier les souches OC43 et 229E du HCV dans des échantillons de cerveau de patients atteints de sclérose en plaques (Burks *et al.*, 1980; Murray *et al.*, 1992a; Stewart *et al.*, 1992). La capacité de réplication de la souche 229E du HCV dans des cellules normales a été démontrée sur des cultures continues de cellules astrocytaires et neurogliales (Talbot *et al.*, 1994) et l'implication des HCV comme étant l'un des agents étiologiques de la sclérose en plaques est sérieusement étudiée (Talbot, 1995; Murray *et al.*, 1994; Murray *et al.*, 1992b; Talbot et Jouvenne, 1992).

3- LIEN ENTRE HCV-OC43 et BCV

3.1- Lien antigénique.

En 1973, un agent coronaviriforme a été identifié chez de jeunes veaux atteints de diarrhée (Mebus *et al.*, 1973). Cet agent classifié dans le genre coronavirus fût nommé BCV. Certaines données biochimiques et morphologiques portaient à croire que ce virus était très étroitement relié au coronavirus humain de souche OC43. En effet, le profil protéique de ces deux virus semble être identique. De plus, aucun anticorps produit chez l'un ou l'autre de ces virus ne permettait de les différencier (Hogue *et al.*, 1984). Une étude démontra que les anticorps humains contre la souche OC43 permettaient même de neutraliser le coronavirus bovin (Storz et Rott, 1981). Ces données suggéraient que ces deux virus pouvaient être en fait deux appellations différentes pour un même virus. Par la suite, des analyses d'empreinte par carte de restriction ("fingerprints") ont montré que les génomes de ces virus étaient très homologues mais qu'il s'agissait de deux virus distincts (Lapps et Brian, 1985). Malgré tout, la discrimination de ces deux virus demeure difficile.

3.2- Lien génomique entre BCV et HCV-OC43.

La caractérisation des génomes de BCV et HCV-OC43 vint consolider les observations sur la relation étroite qui existe entre ces deux virus (Fig. 5). En effet, la séquence nucléotidique des protéines structurales de ces virus montre une identité supérieure à 91% pour tous les gènes séquencés jusqu'à présent (Lapps et al., 1987; Abraham et al., 1990a; Abraham et al., 1990b; Mounir et Talbot, 1993b; Kamahora et al., 1989; Zhang et al., 1992; Mounir et Talbot 1992). L'analyse moléculaire du génome viral a permis d'observer une différence au niveau des gènes codant possiblement pour des protéines non-structurales. En effet, deux ORF codant possiblement pour des protéines de 4.9 et 4.8 kDa chez BCV sont absents chez HCV-OC43 (Mounir et Talbot, 1993a). Puisqu'il ne s'agit que de protéines putatives, on ne peut affirmer qu'il y a divergence au niveau du profil protéique de ces virus. Par contre, une protéine non-structurale produite par BCV a été observée lors d'infection de cellules en feuillets (Cox et al., 1991). Cette protéine non-structurale produite à partir de l'extrémité 5' de l'ARNm 2 de BCV (Cox et al., 1989) est la plus grosse protéine non-structurale observée chez un coronavirus. Des résultats préliminaires effectués dans notre laboratoire ont montré l'existence d'un ARNm 2 chez HCV-OC43 mais aucune protéine ne lui est encore associée.

FIGURE 5. Organisation du génome de HCV-OC43. En haut, taille approximative du génome de HCV-OC43. Au centre, représentation des différents cadres de lectures ouverts (ORF). Boîte pointillée indique que cet ORF n'a pas encore été identifié chez HCV-OC43. L'emplacement des différents ORF sur les ARNm est indiqué (sous les ORF). En bas, comparaison de la séquence des ORF de HCV-OC43 et de BCV.

modifié de : Mounir et al., 1994.



3.3- Tropisme.

Le coronavirus bovin cause de graves gastroentérites entrainant des pertes économiques considérables chez les éleveurs de veau. La souche OC43 du coronavirus humain infecte les voies respiratoires supérieures de l'homme et cause des rhumes. Bien que le tropisme de ces virus semble différent in vivo, ces deux virus peuvent croître in vitro sur la même lignée cellulaire. Il est également possible que le tropisme de ces deux virus soit à la fois entérique et respiratoire. En effet, des études ont montré la présence de coronavirus dans les voies respiratoires de très jeunes veaux. Ce virus nommé arbitrairement BRCV, est peu caractérisé car son adaptation sur lignée cellulaire est difficile (Reynolds et al., 1985; Zhang et al., 1992). On ignore encore si le BRCV est un nouveau virus ou s'il s'agit d'un tropisme jusqu'àlors inconnu du virus BCV. Comme il a été mentionné précédemment, des particules coronaviriformes ont été observées dans les matières fécales de jeunes enfants souffrant de diarrhée. Ce virus, bien qu'il semble différent du HCV-OC43, possède des caractéristiques antigéniques similaires. Tout ceci indique que le tropisme majeur de BCV et HCV-OC43 est différent mais que ce tropisme peut varier.

3.4- Problématique.

La caractérisation partielle du génome du coronavirus entérique bovin et respiratoire humain a permis de confirmer la très haute similitude de ces deux virus. Jusqu'à présent, la seule différence génétique observée entre ces virus est l'absence de deux ORF chez OC43 codant pour des protéines possiblement non-structurales chez BCV. Bien que la protéine S se fixe aux récepteurs cellulaires et que, par conséquent, cette protéine puisse influencer le tropisme viral, la séquence en aa de la protéine S a un taux d'identité de 91% entre ces deux virus. Afin de pouvoir mieux comparer le génome de ces deux virus et ultérieurement pouvoir cerner les protéines impliquées dans le tropisme viral, nous nous sommes proposés de caractériser l'ARNm 2 du coronavirus humain OC43. Cet ARNm code chez BCV pour une phosphoprotéine de 32 kDa et pourrait être impliquée dans le tropisme viral.

3.5- Objectifs.

Puisque des résultats préliminaires ont démontré la présence d'un ARNm 2 sur le génome de HCV-OC43, il est possible que des gènes situés en 5' de cet ARNm codent pour une ou des protéines ns. Nos objectifs sont dans un premier temps, l'amplification de la séquence(s) nucléotidique(s) située(s) en 5' du gène de la HE sur l'ARNm. Dans un deuxième temps, séquencer cette région et identifier les ORF possiblement exprimés, et finalement démontrer la nature de cette ou de ce(s) putative(s) protéine(s) suite à l'infection de cellules en cultures.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1- CULTURE CELLULAIRE

1.1- Virus.

Le virus de référence utilisé, HCV-OC43, provient de "The American Type Culture Collection" (ATCC VR-759). La réplication de ce virus a été soutenue sur les cellules HRT-18.

1.2- Cellules.

Les cellules HRT-18 proviennent d'une tumeur rectale humaine (Tompkins et al., 1974). Ces cellules nous ont été fournies par l'ATCC (CCL-244). La culture des cellules HRT-18 a été effectuée à 37 °C en présence de 5 % (v/v) de CO2 dans un milieu contenant du "Earle's minimal essential medium" : "Hank's M199" (1:1, v/v) (Gibco Canada, Burlington, Ontario). À ce milieu a été ajouté 10% (v/v) de sérum bovin fétal (SBF), 0.13% (p/v) de bicarbonate de sodium et 2 mM de L-glutamine. Les différents passages viraux ont été effectués lorsque les cellules étaient confluentes. Pour ce faire, les cellules ont été lavées avec du tampon phosphate (PBS; 0.14 M NaCl, 2 mM KCl, 8 mM Na2HPO4, 1.5 mM KH2PO4) puis 2 ml de trypsine-EDTA [0.05 % (p/v) trypsine, 0.02 % (p/v) EDTA] a été ajoutés et après 5 à 10 min, les cellules se sont détachées du plastique. Les cellules ont ensuite été redistribuées à raison de 100 000 cellules/ml tel que calculé à partir d'un compte cellulaire obtenu avec un hématimètre. Lorsque les cellules avaient subi plus de 30 passages, de nouvelles cellules étaient décongelées. Pour ce faire, des cellules HRT-18 congelées dans du milieu contenant 10 % (v/v) de diméthylsulfoxide (DMSO) étaient rapidement décongelées et centrifugées pendant 5 min à 1000 rpm dans la

centrifugeuse GS-6R (Beckman, Mississauga, Ontario, Canada). Le surnageant était ensuite rapidement décanté et le culot resuspendu dans du milieu de culture contenant le double de la concentration en SBF (20 %, v/v).

2- PRÉPARATION DE L'ARN

2.1- Préparation des cellules.

Des flacons de 25 cm² (F25 de Corning, Richmond Hill, Ontario, Canada) dont les cellules en feuillets étaient à 70% de confluence ont été infectés par HCV-OC43 à une multiplicité d'infection (MOI) de 0.15 en présence de 10 U/ml de trypsine-TPCK (chlorométhyle de*N*-tosyl-*L*-phénylalanine). Afin de permettre l'adsorption du virus aux cellules, les F25 ont été incubés pendant 2 heures à 37 °C dans 0.5 ml de milieu de culture. Les flacons ont ensuite été légèrement agités chaque demi-heure. Par la suite, 2 ml de milieu de culture ont été ajouté. Un F25 contenant des cellules HRT-18 non-infectées a été produit parallèlement afin de servir de contrôle négatif. Après 48 heures d'incubation à 37 °C dans un air humidifié contenant 5 % (v/v) de CO₂, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS et recueillies à l'aide d'un grattoir dans 0.2 ml de tampon GIT (4 M guanidinium isothiocyanate, 25 μ M acétate de sodium, 0.12 M de *&*mercaptoéthanol, ce dernier composé étant ajouté après filtration de la solution de guanidinium isothiocyanate et acétate de sodium).

2.2- Isolement de l'ARN.

Afin de compléter la lyse des cellules et d'éclaircir les échantillons, ceux-ci ont été passés à dix reprises à travers une aiguille de dimensions 26G3/8 (taille 26G, longueur 3/8 pouce). Les débris membranaires et les protéines ont ensuite été extraits par trois traitements au phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1) suivis de deux traitements au chloroforme (Sambrook *et al.*, 1989). Par la suite, l'ARN a été précipité par l'ajout de 2.5 volume d'éthanol pur et 1/10 du volume de 3 M acétate de sodium pH 7,0. Les échantillons ont ensuite été placés pendant 30 min à -70 °C et centrifugés pendant 20 min à 14 000 x g (centrifugeuse Eppendorf, modèle 5415C). Les culots ont été lavés avec 1 ml d'éthanol 70% (v/v) et centrifugés comme précédemment. Finalement, l'ARN a été resuspendu dans 60 μ l d'H₂O (distillée, déionisée et stérilisée), puis entreposé à -70°C.

3- RT-PCR

3.1- Production de l'ADN complémentaire.

Avec la transcriptase inverse, des fragments d'ADNc sont produits à partir de l'ARN purifié. Dans un tube Eppendorf, environ 100 ng d'ARN (1 unité de densité optique (D.O.) à 260nm = 50 µg/ml d'ADN) ont été suspendus dans 12.5 µl d'eau (distillée, déionisée et stérilisée). L'ARN a été linéarisé en chauffant les échantillons 7 min à 65°C. Immédiatement après, les produits suivants ont été ajoutés: 1 µl de 50 mM MgCl₂, 2 µl de tampon 10X "Taq DNA polymerase buffer" [100 mM Tris-HCl pH 9,0, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl (Pharmacia, Baie d'Urfé, Québec, Canada)], 1 µl (30 U/µl) de RNAguard[™] (Pharmacia), 1 µl de 20 mM dNTP, 1 µl de l'amorce inverse 32KI (5'-TTAGTCTTCTTCAACTGGAG-3') à 50 pmoles/µl, dont la séquence a été déduite du génome de BCV à partir de la région 3' du gène de la ns2 et de la région 5' du gène de la HE et 1 µl de transcriptase inverse murine à 20 U/µl (Pharmacia). La synthèse de l'ADNc s'est effectuée en incubant les échantillons une heure à 37°C.

3.2- Amplification de l'ADN.

Aux 19.5 µl d'ADNc ont été ajoutés: 1.5 µl de 50 mM MgCl₂, 8 µl de tampon 10X "Tag DNA polymerase buffer" (Pharmacia), 1 µl de 20 mM dNTP, 1 µl d'amorce 32KI homologue inverse et 1 μl d'amorce Leader, 5'-GAATTCGAATTCTTGTGAGCGAAGTTGCGT-3' (50 pmoles/µl) qui a été déduite à partir de l'extrémité 5' de la séquence de tête du HCV-OC43 (Kamahora et al., 1989) et à laquelle deux sites Eco RI ont été ajoutés en 5' ou 1 ul de l'amorce homologue 32KH, 5'-CTTTAAGAATGGCAGTTGC-3' (50 pmoles/µl) qui a été déduite à partir de l'extrémité 5' du gène codant pour la ns2 chez BCV (Cox et al., 1989), 67 µl d'H₂O et 1 µl de l'enzyme "Taq DNA polymerase" à 5 U/µl (Pharmacia). Avant d'insérer les échantillons dans le thermocycleur d'ADN (Cetus, Perkin Elmer, Montréal, Québec, Canada), trois gouttes d'huile minérale "Nujol" (Perkin Elmer) ont été déposées sur le dessus des échantillons afin d'empêcher l'évaporation. Le programme d'amplification était le suivant: dénaturation pendant 1 min à 94°C, appariement des amorces pendant 2 min à 55°C et synthèse de l'ADN pendant 1 min à 72°C. Ce cycle a été répété 30 fois. Finalement, 7 min de polymérisation additionnelle à 72°C a été laissée afin de compléter la synthèse des extrémités d'ADN.

3.3- Analyse des produits de PCR.

La taille des produits de PCR a été analysée par électrophorèse sur gel d'agarose 1.2% (p/v)(SeakemTM FMC Bioproducts, Pine Brook, NJ, Étas-Unis) dissous dans le tampon TAE [40 mM Tris acétate, 1 mM EDTA pH 8,0, 0.114 % (v/v) acide acétique glacial] en présence de 1 µg/ml de bromure d'éthidium. Trois µl des échantillons à analyser ont été dilués dans 6 µl d'H₂O et 1 µl de tampon de chargement 10X [0.25% (p/v) de bleu de bromophénol, 0.25% (p/v) de cyanol de xylène FF et 30% (v/v) de glycérol] puis chargés sur le gel. La migration a été effectuée à voltage constant (80 volts avec la source d'alimentation électrique, modèle 250/2.5 de BIO-RAD, Mississauga, Ontario, Canada) durant environ une heure avec l'appareil "Mini SubTM DNA cell " (BIO-RAD). Le gel a par la suite été observé sous rayons ultraviolets et photographié à l'aide d'un film Polaroid 665.

4- CLONAGE DES PRODUITS DE PCR

4.1- Gel préparatif et extraction de l'agarose.

Afin de recueillir une quantité adéquate d'ADN, un gel d'agarose 1.2 % (p/v) préparatif a été réalisé. Suite à l'observation sous rayons U.V., les bandes d'ADN de la taille attendue ont été excisées de l'agarose puis l'ADN est récupéré à l'aide de la trousse "Sephaglass™ BandPrep kit " de Pharmacia. Cette technique exploite la propriété qu'a l'ADN de se fixer à la matrice de silice lorsque celui-ci est mis en présence d'une solution d'iodure de sodium. Une fois extrait de l'agarose, l'ADN a été élué grâce à une solution faiblement ionique dépourvue d'iodure de sodium. Chacune des bandes d'intérêt a été resuspendue dans 20 µl de tampon d'élution (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) et entreposée à -20 °C.

4.2- Ligation dans un vecteur "T".

La polymérase d'ADN Taq ajoute, suite à la synthèse d'un double brin d'ADN, une désoxyadénosine aux extrémités 3'. Utilisant cette caractéristique particulière, la compagnie Invitrogen a développé une méthode de clonage simple et rapide. Grâce à des vecteurs linéaires possédant une désoxythymidine protubérante à chaque extrémité 3', il est possible de liguer des produits de PCR préalablement sélectionnés par appariement des bases. Pour chaque ligation, 50 ng du vecteur pCR 1000TM (Invitrogen, BDH, Ville St-Laurent, Québec, Canada) ont été ajoutés à environ 150 ng d'ADN provenant du produit de PCR puis on a ajouté la ligase du bactériophageT4 selon le protocole du manufacturier ("TA Cloning[™] System", Invitrogen).

4.3- Transformation des bactéries E. coli (InvαF').

La transformation des bactéries Inv α F' a été effectuée par choc thermique tel que décrit dans le protocole du manufacturier ("TA CloningTM System", Invitrogen). Ainsi, 1 µl du produit de ligation a servi à transformer 50 µl de cellules compétentes. Suite à cette transformation, 25 µl de bactéries ont été ensemencées de façon stérile en pétris contenant de la kanamycine (50 µg/ml) et 25 µl de 5-bromo-4-chloro-3indolyl-&-D-galactoside (X-Gal) (40 mg/ml). Le X-gal est un substrat chromogénique de l'enzyme &-galactosidase permettant la sélection des colonies recombinantes, grâce à leur couleur blanche. L'ajout d'isopropyle β -D- thiogalactopyranoside (IPTG) s'avère inutile puisque la souche bactérienne InvαF' possède le gène LacIq⁻. Les pétris ont ensuite été placés pendant une nuit à 37 °C en position inversée.

4.4- Culture des colonies recombinantes.

Pour chaque transformation, 20 colonies blanches ont été ensemencées stérilement dans 3 ml de culture liquide SOB [2 % (p/v) Bacto tryptone, 0.5 % (p/v) extrait de levure ("Bacto yeast extract"), 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, pH 7,0] contenant 50 µg/ml de kanamycine. Les cultures bactériennes ont ensuite été incubées pendant une nuit à 37 °C dans un incubateur-agitateur ("Lab-Line™ incubatorshaker", Lab-Line, Melrose Park, ILL. États-Unis) à 225 rpm.

4.5- Extration de l'ADN plasmidique.

La technique utilisée afin d'extraire l'ADN plasmidique a été adaptée de la lyse par ébullition de Holmes et Quigley, 1981. Sous la flamme, 1.5 ml de culture bactérienne a été transféré dans un tube Eppendorf et centrifugé pendant 1 min à 12 000 x g (centrifugeuse Eppendorf modèle 5415C). Le surnageant a été extrait et le culot a été resuspendu dans 220 μ l de tampon de lyse STETL [8 % (p/v) saccharose, 5 % (v/v) Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA, 0.5 mg/ml lysozyme]. Les échantillons ont ensuite été placés dans un bain d'eau bouillante pour 5 min puis centrifugés pendant 20 min à 14 000 x g (centrifugeuse Eppendorf modèle 5415C). Les débris membranaires et l'ADN génomique contenus dans le culot ont été éliminés à l'aide d'un cure-dent. L'ADN plasmidique a ensuite été précipité par l'ajout de 220 μ l d'isopropanol. Les tubes ont ainsi été laissés pendant 10 min à -20 °C puis centrifugés pendant 15 min à 14 000 x g (centrifugeuse Eppendorf modèle 5415C). Le culot a ensuite été séché à l'air ambiant puis resuspendu dans 60 μ l de tampon TE (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA pH 8.0) et entreposé à -20 °C.

4.6- Digestion enzymatique et analyse sur gel.

Afin d'identifier les colonies recombinantes, une digestion de l'ADN plasmidique a été effectuée avec les enzymes de restrictions *Sac* I et *Eco* RI. La séquence palindromique reconnue par l'enzyme *Sac* I se situe en 5' du site multiple de clonage du vecteur pCR 1000TM et la séquence reconnue par l'enzyme *Eco* RI se retrouve en 3' de celui-ci. La digestion de l'ADN plasmidique par ces enzymes permet la libération des inserts et (selon le profil électrophorétique des fragments obtenus) l'identification des colonies recombinantes désirées. Pour ce faire, 10 µl d'ADN plasmidique a été digéré en ajoutant 10 µl de solution de digestion [2X de tampon "One phor all" (10x: 100 mM Tris-acétate pH 7,5, 100 mM acétate de magnésium, 500 mM acétate de potassium) (Pharmacia), 0.4 U/µl *Eco* RI, 0.4 U/µl *Sac* I, 0.1 µg/µl RNase A]. Les échantillons ont été incubés pendant 2 heures à 37 °C puis 10 µl de chacun des échantillons ont été chargés sur gel d'agarose 1.2 % (p/v) dans 1X de tampon de chargement (section 3.3). Après la migration, une photographie a été prise comme précédemment (section 3.3).

5- SÉQUENÇAGE PAR SYNTHÈSE DE DIDESOXYNUCLÉOTIDES

5.1- Préparation de l'ADN.

L'ADN plasmidique des colonies recombinantes a été préparé à l'aide de la trousse "Magic Miniprep[™] DNA purification system" (Promega, Fisher Scientific, Montréal, Québec, Canada). À partir de 3 ml de culture bactérienne, environ 10-15 µg d'ADN ont été recueillis. Suite à la lyse des cellules par le tampon de lyse (0.2 M NaOH, 1% (p/v) SDS), les membranes et l'ADN cellulaires ont été centrifugés à 14 000g (centrifugeuse Eppendorf modèle 5415C) pendant 5 min. L'ADN plasmidique a été ensuite recueillit à l'aide d'une résine de silice ayant une forte affinité pour l'ADN. Finalement, l'ADN a été élué de la résine avec 50 µl d'une solution faiblement ionique telle de l'eau ou du tampon TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA).

5.2- Dénaturation.

Le protocole de dénaturation utilisé a été adapté de celui de la compagnie Pharmacia (T7 Sequencing[™] Kit). Pour la dénaturation, environ 7 µg (25 µl) d'ADN purifié ont été utilisés. Ensuite, 2 volumes égaux de solution de dénaturation (0.2 M NaOH, 0.2 mM EDTA) ont été ajoutés à l'ADN. Après une légère agitation, les échantillons ont été placés pendant 30 min à 37 °C. La solution de dénaturation a été par la suite neutralisée par l'ajout de 1/10 du volume total de 2 M d'acétate de sodium pH 4,5. L'ADN dénaturé a ensuite été précipité à l'éthanol comme décrit précédemment (section 2.2).

5.3- Appariement des amorces.

Le vecteur procaryotique pCR 1000[™] possède de chaque côté du site multiple de clonage des séquences promotrices à partir desquelles des amorces sont disponibles commercialement afin de séquencer les régions avoisinantes. Au culot d'ADN dénaturé a été ajouté 2 µl de l'une des deux amorces à une concentration de 0.80 µM (M13 ou T7) dans 2 µl de tampon d'appariement (tampon contenant du MgCl₂ et du dithiothréitol) et 10 µl d'H₂O distillée. Les solutions ont été incubées pendant 20 min à 37 °C puis placées à la température de la pièce pendant 10 min. Les amorces internes (32KI2: 5'-GAATTC GAATTC CGCCTTCTTCTAGCTCT-3' et 32KH2: 5'-GCTATTCAAGAAGTT-3') ont été produites par le service de synthèse d'oligonucléotides de l'Institut Armand-Frappier afin de compléter le séquençage de la région interne des produits de PCR.

5.4- Réaction de synthèse.

La réaction de synthèse a été effectuée selon le protocole du manufacturier ["T7 SequencingTM Kit", (Pharmacia)]. Quatre réactions dans lesquelles se retrouvent une amorce, l'ADN matriciel, les quatres désoxynucléotides (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) et un des didésoxynucléotides (ddATP ou ddTTP ou ddGTP ou ddCTP), nécessaire à l'arrêt de la réplication, ont été utilisés afin de produire tous les fragments d'ADN possibles grâce à l'ADN polymérase du phage T7. Brièvement, on a placé dans quatres tubes Eppendorf marqués G, A, T ou C, 2.5 µl de solution "Mix-Short" (solution contenant les quatres désoxynucléotides et l'un des quatres didésoxynucléotides) correspondant. Par la suite, 6 µl de la solution "Enzyme Premix" (contenant la polymérase à ADN T7, [α -35S]dATP et un mélange de dGTP, dCTP et dTTP) ont été ajoutés à la solution d'appariement. Après 5 min d'incubation à la température de la pièce, 4.5μ l de la réaction ont été transférés dans chacun des tubes G, A, T ou C et le tout a été incubé pendant 5 min à 37 °C. Finalement la réaction a été arrêtée par l'ajout de 5 μ l de solution d'arrêt (solution de formamide déionisée contenant de l'EDTA, du bleu de bromophénol et du cyanole de xylène).

5.5- Électrophorèse.

5.5.1- Préparation du gel de polyacrylamide.

Le gel a été produit de la façon suivante: 48 g d'urée, 7.6 g d'acrylamide et 0.4 g de bisacrylamide ont été dissous dans 90 ml d'H₂O distillée et déionisée. La solution a ensuite été déionisée grâce à l'ajout de 5 g de résine ("Analytical Grade Mixed Bed Resin AGTM 501-X8" de BIO-RAD). Après 5 min d'agitation, le tout a été filtré sur filtre de 0.22 µm et 10 ml de tampon TBE 10X (1X: 0.09 M Tris-borate, 2 mM EDTA, pH 8.2) a été ajouté. La solution a alors été dégazée pendant 10 min. Juste avant de couler le gel entre les plaques de verre, 500 µl de persulfate d'ammonium 10% (p/v) et 10 µl de *N*, *N*, *N'*, *N'*-tetraméthyléthylenediamine (TEMED) (BIO-RAD) ont été ajoutés à 50 ml de solution.

5.5.2- Montage de l'appareil.

L'appareil d'électrophorèse utilisé a été le modèle S2 de BRL (Gibco, Burlington, Ontario, Canada). Les deux plaques de verre utilisées ont été

préalablement lavées à l'H2O distillée, à l'éthanol, puis la plus petite des plaques a été traitée au "Sigmacote" (Sigma, Mississauga, Ontario, Canada) afin de rendre la surface de la vitre anti-adhésive. Des espaceurs de 0.4 mm ont été utilisés pour sceller les côtés et une fine bande de papier Whatman 3MM a été inséré au bas du gel. Puis des pinces sont ajoutées tout autour des plaques de verre. Par la suite, une solution de polyacrylamide 8 % (p/v) préparée tel que décrit précédemment (section 5.5.1) a été coulée entre les plaques de verre. Après une heure de polymérisation à la température de la pièce, les pinces ont été enlevées et les plaques ont été placées sur le support. Ensuite, les compartiments inférieur et supérieur ont été remplis avec du tampon TBE 1X. Un peigne de 49 puits, en forme de dents de requin, a été glissé entre les deux plaques de verre à la surface du gel. Une prémigration a été effectuée durant 30 min à 1 800 volts ("Power supply" modèle FB650 de Fisher, Montréal, Québec, Canada). Après avoir lavé de nouveau la surface du gel, les échantillons ont été dénaturés pendant 2 min à 94°C puis chargés à raison de 2 μl par puits selon l'ordre G, A, T, C. La migration a été effectuée à 1 800 volts (environ 35 miliampères, 50 Watts) durant environ 2 heures (lorsque le bleu de bromophénol atteint le bas du gel).

5.5.3- Autoradiographie.

Une fois la migration terminée, les plaques ont été retirées du support et, à l'aide d'un scalpel, la petite plaque de verre a été décollée. La grande plaque de verre contenant le gel à sa surface a été déposée délicatement dans 2 litres de solution de fixation [10 % (v/v) acide acétique , 10 % (v/v) méthanol] pendant 20 min. Le gel a été retiré de la plaque suite à son adhésion à un papier de chromatographie Whatman 3MM. Une pellicule plastique a ensuite été placée à la

surface du gel puis celui-ci a été séché sous vide (système de sécheur de gel, modèle 583 de BIO-RAD) pendant 15 min à 60 °C suivie de 45 min à 80 °C. Une fois sec, le gel a été placé dans une cassette d'autoradiographie en présence d'un film Kodak X-OMAT pour un minimum de 12 heures à -70 °C. Après l'exposition, le film a été développé grâce au développeur automatique X-OMAT M20 (Kodak, Sigma).

5.6- Analyse des séquences.

À partir des séquences nucléotidiques obtenues, des analyses portant sur les cadres de lectures ouverts, les sites de restrictions, le profil d'hydrophilicité des protéines putatives, la composition en aa, le poids moléculaire, les sites potentiels de phosphorylation et de N-glycosylation etc. ont été effectués grâce aux logiciels informatiques GeneWorks 2.0 (IntelliGenetics, Inc., Mountain View, CA., États-Unis) et MacVector 3.5 (International Biotechnologies, Intersciences, Eastman Kodak, Rochester, N.Y., États-Unis) et à un ordinateur Macintosh portable modèle M5120.

6- CLONAGE DANS LE VECTEUR D'EXPRESSION pMAL[™]-c2

6.1- Réaction de PCR avec de nouvelles amorces.

Afin de cloner le gène obtenu dans le site multiple de clonage du vecteur d'expression procaryotique pMAL[™]-c2 (New England Biolabs, Mississauga, Ontario, Canada), une nouvelle réaction de PCR avec de nouvelles amorces a été réalisée. La séquence nucléotidique des deux nouvelles amorces provient des amorces 32KI et 32KH auxquelles certaines modifications ont été apportées. De plus, deux sites de restrictions *Bam* HI ont été ajoutés à l'extrémité 5' (Bam HI 32KH: 5'-GGATCC GGATCC ACTTTAAAAATGGCTGTCGC-3', Bam HI 32KI: 5'-GGATCC GGATCC TTAGTCTTCTTCAACTGGA-3'). Sur l'amorce "Bam HI 32KH", un nucléotide (adénine) a été ajouté entre les sites *Bam* HI et la séquence déduite de l'amorce 32KH. Ceci permet au gène cloné dans le vecteur pMALTM-c2 d'être dans le même cadre de lecture que la protéine de fusion de celui-ci. Avec ces nouvelles amorces, une amplification par PCR a été effectuée à partir de quoi les fragments de taille attendus ont été analysés et purifiés comme décrit précédemment (sections 3.3 et 4.1).

6.2- Linéarisation du vecteur et préparation de l'insert.

Le vecteur pMALTM-c2 est idéal pour l'expression et la purification rapide d'un gène et son produit. Le gène d'intérêt a été inséré immédiatement en 3' du gène *mal*E de *E. coli* qui code pour la protéine MBP ("maltose-binding protein"). L'expression du gène *mal*E sous le contrôle du promoteur "tac" résulte en un haut niveau de production de la protéine de fusion (protéine MBP associée à la protéine d'intérêt). Utilisant l'affinité pour le maltose de la protéine MBP, la protéine de fusion peut être purifiée directement par une chromatographie d'affinité. Afin de rendre les extrémités du vecteur compatibles avec les extrémités du gène d'intérêt, pMALTM-c2 a été digéré par l'enzyme de restriction *Bam* HI. Pour ce faire, 0.5 µg de pMALTM-c2 ont été digérés avec 20 U de *Bam* HI dans 1X de tampon de digestion "One phor all" (Pharmacia)] dans un volume final de 40 µl. Après 2 heures de digestion à 37 °C, 24 U de phosphatase alcaline intestinale de veau a été ajoutées et l'incubation s'est poursuivit pour 30 min additionnelles à 37 °C. Cette enzyme permet l'excision des groupes phosphates en 5' et empêche ainsi la recircularisation du vecteur. Après l'incubation, la phosphatase alcaline a été inactivée par une incubation de 10 min à 75 °C. La linéarisation du vecteur a été observée sur gel d'agarose 1% (p/v) et le vecteur a été purifié avec la trousse "SephaglassTM Band prep kit" tel que décrit précédemment (section 4.1). L'insert a également été digéré avec l'enzyme *Bam* HI. Environ 10 µg d'ADN purifié ont été digérés pendant 2 heures à 37 °C par 50 U d'enzyme *Bam* HI dans 1X de tampon de digestion "One phor all" (Pharmacia) dans un volume final de 100 µl. L'insert digéré a également été purifié avec la trousse "SephaglassTM Band prep kit"

6.3- Ligation dans le vecteur d'expression pMAL[™]-c2.

Pour la ligation, 100 ng de vecteur pMAL[™]-c2 a été ajouté à environ 500 ng d'insert et à 4 U de la ligase du bactériophage T4 (Pharmacia) dans 1X de tampon "One phor all" (Pharmacia) et 2 µl de 10 mM ATP pour un volume final de 20 µl. Les échantillons ont été incubés pendant une nuit à 14 °C.

6.4- Préparation de cellules compétentes TB1.

La technique utilisée pour rendre les cellules permissives aux plasmides recombinants est une méthode rapide adaptée de Cohen *et al.*, 1972. Un volume de 50 ml de milieu LB [1 % (p/v) Bacto tryptone, 0.5 % (p/v) d'extrait de levure ("Bacto yeast extract"), 1 % NaCl (p/v), pH 7,0] a été ensemencé avec une goutte de bactéries XL1-Blue dans un erlenmeyer de 500 ml. Après stérilisation, les colonies ont ensuite été placées à 37 °C dans un incubateur-agitateur à 225 rpm ("Lab-Line™ incubatorshaker", Lab-Line). Lorsque la D.O. à 600 nm était entre 0.3 et 0.5, les échantillons ont été centrifugées pendant 10 min à 1 500 rpm (Beckman GS-6R). Le surnageant a été éliminé et le culot a été repris dans 25 ml de 50 mM CaCl₂. Les échantillons ont
alors été incubés pendant 30 min sur glace puis centrifugés de nouveau pendant 10 min à 1 500 rpm. Finalement le culot a été resuspendu dans 2.5 ml de 50 mM CaCl2 et entreposé à 4 °C.

6.5- Transformation des bactéries E. coli (TB1).

Pour la transformation par choc thermique, 200 µl de cellules TB1 compétentes ont été mélangées à 8 µl de produit de ligation. Le tout a été placé sur glace pendant 30 min puis pendant 2 min à 42 °C suivi de 2 min sur glace. Après ces incubations, 800 µl de milieu SOB (section 4.4) a été rajouté et les échantillons ont été placés à 37 °C pendant 1 heure dans l'incubateur-agitateur à 225 rpm ("Lab-LineTM incubator-shaker", Lab-Line) pour permettre l'expression des gènes de résistance aux antibiotiques. Des aliquots de 50 et 100 µl de bactéries transformées ont ensuite été étalés en pétris contenant du milieu de croissance LB-agar (milieu LB additionné de 15 g/l de bacto agar) contenant 50 µg/ml d'ampicilline, 80 µg/ml de X-gal et de 0.1 M d'IPTG. Les pétris ont été laissés en position inversée pendant une nuit à 37 °C.

6.6- Criblage par hybridation avec une sonde marquée au ³²P.

6.6.1- Préparation des membranes de nitrocellulose.

Toutes les colonies blanches visualisées sur les pétris provenant de la transformation des bactéries TB1 par le vecteur pMALTM-c2 recombinant ont été repiquées sur de nouveaux pétris contenant des emplacements numérotés de 1 à 100. Ces pétris ont de nouveau été incubés pendant une nuit à 37 °C. Lorsque la

grosseur des colonies était jugée adéquate, une membrane de nitrocellulose a été déposée sur la surface de chaque gélose et laissée pendant 1 min. Chacune des membranes a été numérotée et marquée avec l'aide d'une aiguille afin de pouvoir déterminer l'emplacement des colonies. Les membranes de nitrocellulose ont été déposées successivement durant 5 min sur du papier imbibé par l'une des solutions suivantes: 1- solution de dénaturation (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl), 2- solution de neutralisation (0.5 M Tris-HCl pH 7,4, 1.5 M NaCl), 3- tampon SSC 2X (20X: 3 M NaCl, 0.34 M de citrate de sodium, pH 7,0). Finalement les membranes ont été séchées pendant 10 min à 37 °C suivi de 2 heures sous vide à 80 °C.

6.6.2- Préparation de la sonde radioactive.

La sonde marquée a été produite selon la méthode de "random primer labeling". Pour ce faire, 200 ng d'ADN provenant de la purification du produit de PCR de la taille désirée a été utilisé comme matrice pour la fabrication d'une sonde marquée au ³²P. L'ADN a été dilué dans l'eau pour un volume final de 20.5 µl puis les échantillons ont été bouillis pendant 5 min. Une fois sur glace, les produits suivants ont été ajoutés aux échantillons : 5 µl de solution 1 (4 mg/ml BSA, 30 unités de D.O. à 280 nm par ml d'hexamères aléatoires), 20 µl de solution 2 [0.5 M d'acide *N*-[2-hydroxyéthyl]piperazine-*N'*-[2-éthanesulfonique] (HEPES) pH 6,6, 12 mM MgCl2, 25 mM &-mercaptoéthanol, 0.12 M Tris-HCl pH 8,0 et un mélange de: dATP, dTTP, dGTP, 0.1 mM chacun], 5 µl de [α -³²P]dCTP (10 µCi/µl) et 4 U du fragment Klenow de l'ADN polymérase I d'*E. coli* (Pharmacia). Le tout a été incubé pendant 2 heures à la température de la pièce. L'incorporation de radioactivité de la sonde a été mesurée à partir de 0.5 µl de la sonde radioactive diluée dans 5 ml d'acide trichloroacétique 10 % (p/v). Cet échantillon a ensuite été placé pendant 10 min sur glace puis filtré sur papier de microfibres de verre Whatman[™]GF/C. Le comptage de la radioactivité incorporée a été effectué directement avec le filtre dans 5 ml d'Aquasol-2 (Dupont, Mississauga, Ontario, Canada) grâce au scintigraphe Tri-Carb (Canberra Packard, Montréal, Québec, Canada). Si le niveau de radioactivité était jugé satisfaisant (environ 25 000 cpm), la sonde était préparée pour l'hybridation. Pour ce faire, le volume de la sonde était alors ajusté à 200 µl avec de l'eau puis les protéines étaient extraites par deux traitements au phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1), suivi d'un traitement au chloroforme tel que décrit précédemment (section 2.2). La sonde a ensuite été mélangée à 10 ml de solution d'hybridation {5X Denhart's [100X: 2 % (p/v) BSA, 2 % (p/v) Ficoll, 2 % (p/v) polyvinylpyrollidone], 0.5 % (p/v) SDS, 6X SSC et 50 % (v/v) formamide}. Afin de diminuer l'hybridation non spécifique de la sonde, 125 µl de 5 mg/ml d'ADN de sperme de saumon (Pharmacia) fragmentés aux ultrason 2 min. et dénaturés par ébulition 5 min a été ajouté à la solution d'hybridation.

6.6.3- Hybridation et exposition.

Les membranes de nitrocellulose contenant les colonies recombinantes ont été placées dans un sac de plastique contenant le milieu d'hybridation (incluant la sonde radioactive). Le sac a été scellé hermétiquement, grâce au scelleur de sac "Double Seal™" (modèle 855 de Decosonic, Ville St-Laurent, Québec, Canada) en prenant bien soin de retirer tout l'air possible. Le sac a ensuite été placé dans un bain agitateur à 42 °C pendant une nuit. Une fois l'hybridation terminée, les membranes ont été lavées 2 fois pendant 15 min dans 200 ml de tampon SSC 2X contenant 0.5 % (p/v) SDS puis 2 autres fois dans du tampon SSC 0.1X contenant 0.5 % (p/v) SDS. Un dernier lavage dans le tampon SSC 0.1X contenant 0.5 % SDS a été effectué

pendant 30 à 60 min à 68°C. L'exposition des membranes a été effectuée selon le protocole décrit précédemment (section 5.5.3).

6.7- Carte de restriction des colonies recombinantes.

Puisque l'insertion du produit de PCR dans le vecteur pMAL[™]-c2 a été effectuée dans un seul site de restriction, l'orientation du fragment est aléatoire. Donc, une digestion par l'enzyme *Eco* RI a été effectuée sur les colonies recombinantes afin de déterminer l'orientation des inserts. Les techniques de préparation de l'ADN plasmidique, de digestion et d'observation des bandes sur gel d'agarose 1.2 % ont été décrites dans les sections 4.5 et 4.6. Les colonies contenant l'insert dans l'orientation 5'- 3' ont été partiellement séquencées par la technique décrite dans les sections 5.1 à 5.6 afin de vérifier si le gène de fusion *mal*E était dans la même phase de lecture que l'insert.

8- PRODUCTION D'UN ANTISÉRUM

8.1- Purification de la protéine de fusion.

8.1.1- Induction des colonies positives.

La production de la protéine de fusion MBP-ns2 a été accomplie selon le protocole d'induction fournie avec le vecteur pMALTM-c2 (New England BioLabs). Les colonies d'intérêt ont été mises en culture pendant une nuit dans 3 ml de milieu LB contenant 100 μ g/ml d'ampicilline. De cette culture, 0.8 ml ont servi à ensemencer 80 ml de milieu LB contenant 0.2 % (p/v) de glucose et 100 μ g/ml

d'ampicilline. Les cellules ont ensuite été incubées à 37 °C dans un incubateuragitateur à 225 rpm ("Lab-Line™ incubator-shaker", Lab-Line). L'incubation a été arrêtée lorsque la concentration des cellules a atteint 2×10^8 cellules/ml (D.O. à 600 nm \approx 0.5). Un ml de cette solution a été prélevé puis centrifugé pendant 1 min à 14 000 x g (centrifugeuse Eppendorf modèle 5415C). Le culot a ensuite été resuspendu dans 50 µl de tampon d'électrophorèse SDS-PAGE [0.05 M Tris-HCl pH 6,8, 8 % (v/v) glycérol, 1.6 % (p/v) SDS, 4 % (v/v) β -mercaptoéthanol, 0.001 % (p/v) bleu de bromophénol] et placé sur glace. Cet échantillon a permi de déterminer les protéines produites en absence d'induction. À partir du restant de la culture bactérienne, la production de la protéine de fusion MBP-ns2 a été induite par l'ajout d'IPTG à une concentration finale de 0.3 mM. Suite à une incubation de deux heures, 0.5 ml de la solution a été prélevé, centrifugé pendant 1 min à 14 000 x g (centrifugeuse Eppendorf modèle 5415C) et le culot a été resuspendu dans 100 µl de tampon d'électrophorèse SDS-PAGE puis mis sur glace. Le restant de la culture a été centrifugé à 4 000 x g pendant 10 min et le culot a été resuspendu dans 10 ml de tampon de chromatographie (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM azoture de sodium, 10 mM β -mercaptoéthanol). Afin de déterminer si la protéine de fusion a été synthétisée sous une forme soluble ou insoluble et si une fois produite elle est exportée dans l'espace périplasmique ou incorporée dans des corps d'inclusions cytoplasmiques, les bactéries resuspendues dans le tampon de chromatographie ont été traitées de la façon suivante. L'échantillon a d'abord été placé à -20°C pendant une nuit puis décongelé sur glace. Les cellules ont ensuite été lysées par des expositions répétées de 15 secondes aux ultrasons (Braun-Sonic modèle 2000). Le relargage des protéines a été évalué grâce au dosage des protéines à l'aide de la trousse commerciale "Protein Assay" (BIO-RAD). Pour ce faire, 0.8 ml d'échantillon a été mélangé à 0.2 ml de réactif et la mesure des protéines a été

effectuée par la lecture de la D.O. à 595 nm. Lorsque la D.O. à 595 nm était à son niveau maximum, la solution était centrifugée pendant 20 min à 9 000 x g et 4 °C. Le surnageant représente la matière soluble et le culot la matière insoluble. Le culot a été resuspendu dans 5 ml de tampon de chromatographie et déposé sur glace. Des aliquots de 5 μ l des fractions soluble et insoluble ont été mélangés séparément à 5 μ l de tampon d'électrophorèse 2X SDS-PAGE.

8.1.2- Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE).

L'appareil d'électrophorèse et le protocole qui ont été utilisé proviennent du système "Mini-Protean IITM" de BIO-RAD. Un gel de séparation de polyacrylamide [10 % (p/v) polyacrylamide (30 % T, 2.67 % C), 0.38 M Tris-HCl pH 8,8, 0.1 % (p/v) SDS, 0.05 % (v/v) de persulfate d'ammonium, 0.05% (v/v) TEMED] a été coulé entre deux plaques de verre puis un gel d'entassement [4 % (p/v) polyacrylamide, 0.125 M Tris-HCl pH 6,8, 0.1 % (p/v) SDS, 0.05 % (v/v) de persulfate d'ammonium, 0.1 % (v/v) TEMED] a été coulé au-dessus du gel de séparation selon le protocole du manufacturier. Les échantillons (cellules non induites, cellules induites, protéines insolubles et solubles) ont été bouillis 5 min puis chargés sur le gel. La migration est effectuée à 200 volts pendant 45 min. Les protéines ont été révélées suite à l'incubation des gels pendant 1 heure dans une solution de bleu de Coomassie [0.1 % (p/v) bleu de Coomassie, 40 % (v/v) méthanol, 10 % (v/v) acide acétique glacial] suivis d'une décoloration dans une solution contenant 40 % (v/v) méthanol et 10 % (v/v) acide acétique glacial. La décoloration des gels nécessite une agitation constante et un changement périodique du milieu de décoloration.

8.1.3- Conditions optimale d'induction.

Afin d'obtenir une quantité maximale de protéines de fusion, des essais faisant varier la température et le temps d'incubation ainsi que la concentration des bactéries au moment de l'induction ont été réalisés. Chaque essai a été réalisé avec 5 ml de culture en milieu LB contenant $100 \,\mu\text{g/ml}$ d'ampicilline. Les cultures ont été incubées à 37 °C jusqu'à l'obtention d'une D.O. à 600 nm de 0.3 ou 0.6. Puis 0.3 mM d'IPTG a été ajouté et la moitié des échantillons a été alors placée à 33 °C et l'autre à 37 °C. À chaque heure (maximum de 4 heures), un échantillon de chacun des essais a été retiré de l'incubateur et placé sur glace. Finalement, 0.5 ml de chaque échantillon est centrifugé pendant 1 min à 14 000 x g et les culots ont été resuspendus dans 100 μ l de tampon d'électrophorèse SDS-PAGE. Les conditions optimales ont été déterminées suite à l'observation sur SDS-PAGE (section 8.1.2) de la quantité de protéines de fusion qui a été produites, selon chacune des conditions expérimentales.

8.1.4- Libération des protéines de fusion des corps d'inclusions.

Sept cents millilitres de cultures bactériennes (bactéries TB1 transformée par le vecteur pMALTM-c2 contenant le gène ns2) ont été produits et l'induction de la protéine de fusion MBP-ns2 a été réalisée selon les paramètres optimaux établis précédemment (section 8.1.3). Les protéines de fusion emmagasinées dans les corps d'inclusion ont été libérées suite au traitement de la fraction insoluble par une solution contenant 1 % (v/v) Triton X-100 et 100 μ g/ml de lysosyme. L'échantillon a ensuite été soumis aux ultrasons comme décrit dans la section 8.1.1 puis centrifugé pendant 30 min à 9 000 x g et 4 °C. La libération des protéines de fusion a été observée avec un échantillon du surnageant par SDS-PAGE (section 8.1.2).

8.1.5- Chromatographie d'affinité.

La protéine de fusion (MBP) codée à partir du gène *mal*E de *E. coli* a la propriété de se fixer sur certains sucres tels l'amylose et le maltose. La protéine de fusion MBP-ns2 a été purifiée sur une colonne d'affinité constituée d'une résine d'amylose (New England BioLabs). Le surnageant contenant la protéine de fusion a premièrement été dilué 1/5 dans le tampon de chromatographie. Cette solution a ensuite été passée dans une colonne de 1 cm X 10 cm contenant 3 ml de résine à un débit de 1 ml par minute. Une fois l'adsorption complétée, la colonne a été lavée avec 8 volumes de tampon de chromatographie. La protéine a ensuite été éluée suite au passage dans la colonne de 50 ml de solution de chromatographie à laquelle a été additionné 10 mM de maltose. L'élution de la protéine de fusion a été suivie par une lecture continue et simultanée de la D.O. à 280 nm, grâce au détecteur d'absorbance ISCO UA-5 (ISCO, Lincoln, NE, Étas-Unis). L'éluat a été recueilli en fractions de 2 ml avec le collecteur de fraction modèle FC-203 de Gilson.

8.1.6- Dialyse et dosage.

Afin de changer le tampon de chromatographie contenu dans nos échantillons par du tampon TE, les échantillons contenant la protéine MBP-ns2 (6.5 ml) ont été dialysés 2 fois contre 2 litres de TE (dialyse de 2 heures suivi d'une dialyse d'une nuit). La concentration en protéine a été évaluée par une lecture de la D.O. à 280 nm de notre échantillon ($A_{280}/1.44 = x \mu g/ml$).

8.2- Protocole d'immunisation.

Un lapin femelle de souche Nouvelle Zélande de 2.5-3 kg a été immunisé avec la protéine de fusion MBP-ns2 selon le protocole suivant: Avant la première injection, du sérum préimmun a été prélevé afin de servir de contrôle négatif. Pour la première injection, 1 ml d'antigène (350 µg) a été émulsifié dans 1 ml d'adjuvant complet de Freund. Les injections subséquentes ont été faites avec 350 µg d'antigène émulsifié dans l'adjuvant incomplet de Freund. Lors de chaque injection, l'antigène a été administré par voie sous-cutanée en de multiples sites et intra-musculaire en un site. Les injections ont été données aux deux semaines. À partir de la troisième injection, des échantillons de sérum ont été prélevés. La spécificité et le titre des anticorps contenus dans ces échantillons ont été analysés par immunofluorescence indirecte (section 9). Au total, sept injections ont été effectuées avant d'obtenir un titre adéquat.

9- IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

9.1- Préparation des lames d'immunofluorescence.

Les lames de verre "Multitest Slide" (ICN, Mississauga, Ontario, Canada) de 12 puits préalablement lavées à l'eau et au méthanol ont été stérilisées à l'autoclave. Sous laminaire, des lames contenant des cellules non-infectées ont été préparées. Pour ce faire, 25 μ l de milieu de culture contenant 3 x 10⁴ cellules HRT-18 ont été déposés dans chacun des puits. Les lames contenant des cellules infectées ont été préparées de la façon suivante: 25 μ l de milieu de culture contenant 3 x 10⁴ cellules HRT-18 et 1.4×10^4 (HCV-OC43, M.O.I.=0.5) ou 1.5×10^5 (BCV, M.O.I.=5) particules virales infectieuses (unité formatrice de plages) ont été déposés dans chacun des puits. Les lames ont ensuite été réparties dans des boîtes de pétris stériles et placées à 37 °C avec 5% (v/v) CO₂ pour des temps variant entre 24 et 72 heures. Au temps désiré, les cellules ont été fixées sur les lames. Pour ce faire, les lames ont d'abord été lavés à deux reprises dans du PBS puis plongées dans un bain d'acétone refroidi à -20 °C. Les lames ont ainsi été incubées pendant 30 min puis séchées à l'air. À cette étape, les lames peuvent être rangées à -70 °C pour de futures expériences. Avant utilisation, le pourtour de chacun des puits des lames de verre a été délimité avec un crayon gras afin d'empêcher l'écoulement des réactifs.

9.2- Répartition des anticorps.

Lors des expériences d'immunofluorescence, plusieurs anticorps différents ont été utilisés. Les anticorps témoins ayant servi à démontrer l'infection de cellules HRT-18 par HCV-OC43 proviennent d'un sérum hyperimmun produit chez la souris contre HCV-OC43 (NIH: Cat. # V360-701-562) et des anticorps anti-protéine N du virus HEV (5B7.7) et BCV (V6). Ces deux derniers anticorps nous ont été gracieusement fournis par le Dr. Serge Dea de l'Institut Armand-Frappier. Un anticorps normal de souris (NIH: Cat. # V360-401-562) et du sérum préimmun de lapin ont été utilisés pour démontrer la spécificité de la réaction. Deux anticorps polyclonaux réagissant spécifiquement contre la protéine ns2 de BCV, produits chez la souris, (fournis par le Dr. Pascal Boireau, Centre national d'études vétérinaires et alimentaires, Maisons-Alfort, France) et un anticorps spécifique à la protéine de fusion MBP-ns2 du HCV-OC43 ont servi à analyser l'expression de la protéine ns2 en culture cellulaire. Chacun des anticorps a été utilisé à différente concentration. La dilution des anticorps a été effectuée dans du tampon PBS . Pour chaque dilution d'anticorps 25 μ l ont été déposés dans un puits. Les lames ainsi chargées ont été incubées pendant 2 heures à la température de la pièce dans une chambre humide (pétri dont le couvercle contient un mouchoir humide) puis lavées à trois reprises dans du tampon PBS (3 min par lavage). Ensuite les lames ont été asséchées et 25 μ l d'antisérums anti-immunoglobulines de souris ou de lapin conjugués à de l'isothiocyanata de fluorescéine [FITC-IgG (KPL, GIBCO, Mississauga, Ontario, Canada) dilué 1/100 dans du PBS] a été ajouté . Les lames ont été incubées pendant 1 heure dans une chambre humide puis lavées de la même façon que précédemment. Afin d'éliminer le niveau de base de la fluorescence causée par la fixation non-spécifique du conjugué, les lames ont été trempées 15 min dans une solution 0.5% (p/v) de bleu d'Evans (Sigma) dissous dans du tampon PBS. Finalement les lames ont été montées entre lames et lamelles à l'aide d'une goutte de glycérol et observées sous microscope à fluorescence à 400x de grossissement (OrthoplanTM jumelé à la caméra OrthomatTM, Leitz Wetziar).

10- IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN

10.1- Préparation des échantillons.

Pour effectuer des expérimentations d'immunobuvardages, des feuillets cellulaires de cellules HRT-18 ont été infectés comme décrit précédemment (section 2.1) par HCV-OC43. Aux temps d'infection désirés (24, 48 ou 96 heures), les feuillets cellulaires ont été lavés 2 fois avec du tampon PBS puis recueillis avec un grattoir dans 0.2 ml de tampon d'électrophorèse SDS-PAGE préalablement chauffé à 85 °C. Les échantillons ont ensuite été bouillis pendant 10 min puis soniqués comme

précédemment (section 8.1.4). Après une centrifugation à 10 000 x g pendant 10 min des échantillons, les surnageants ont été récupérés et entreposés à -20 °C. Du virus a été également purifié à partir de surnageant de culture de cellules infectées. Pour ce faire, le surnageant de 5 flacons de 150 cm² (F150 de Corning) contenant des cellules infectées a été réuni. La solution a été clarifiée par centrifugation à 10 000 x g pendant 20 min. Le surnageant a été prélevé et les virions ont été précipités au polyéthylène glycol (10 % (p/v) PEG 8000, 0.5 M NaCl) suite à une agitation constante de l'échantillon pendant une nuit à 4 °C. L'échantillon a été ensuite centrifugé à 10 000 x g pendant 30 min. Le culot a ensuite été resuspendu dans 2/3 du volume initial de tampon TMEN (50 mM Tris-acétate pH 6,2, 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl). Les particules virales ont ensuite été purifiées par centrifugation sur gradient de Nycodenz®(Nycomed, Oslo, Norvège) dans du tampon TMEN. Une première centrifugation a été effectuée en déposant 2 ml de solution virale sur le dessus d'un tube de 12 ml contenant 8 ml de 10% (p/v) Nycodenz® déposé sur un coussin de 2 ml de 50% (p/v) Nycodenz[®]. La centrifugation a été effectuée avec un rotor SW41 pendant 90 min à 148 000 x g à 4 °C. L'interphase du coussin 50-10 % de Nycodenz® a alors été recueillie et déposée sur un gradient continu 10-50% (p/v) de Nycodenz® et centrifugé pendant une nuit à 148 000 x g et 4 °C. Le virus a ensuite été collecté en fractions de 0.5 ml et chaque fraction a été observée sous microscope électronique à un grossissement de 428 400x (Hitachi 200). Pour ce faire, une grille de cuivre a été déposée dans 50 µl de chacune des fractions. Les échantillons ont ensuite été centrifugés pendant 10 min à 120 000 x g (ultracentrifugeuse Beckman modèle Airfuge[™]). Chacune des grilles a alors été déposée sur une goutte de 3 % (p/v) d'acide phosphotungstique (PTA) et laissée à la température de la pièce pendant 5 min. Une fois colorée par le PTA, les grilles ont été séchées et placées dans un portoir de grille. L'observation et l'interprétation des particules virales observées

sous le microscope électronique ont été effectuées par M. Robert Alain du service de microscopie électronique de l'Institut Armand-Frappier.

10.2 Migration et transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose.

L'électrophorèse des échantillons sur SDS-PAGE ainsi que le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose (HybondTM-C extra, Amersham, Oakville, Ontario, Canada) a été effectuée selon le protocole du manufacturier ("Mini Trans-BlotTM Electrophoretic Transfer Cell", BIO-RAD). Deux gels d'électrophorèses SDS-PAGE 10% ont été préparés, sur chacun d'eux, 15 µl d'échantillons provenant de cellules HRT-18 non-infectées, infectées durant 24 et 48 heures et également un échantillon de virus purifié ont été chargés. La migration des protéine a été effectuée comme précédemment (section 8.1.2). Après la migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose. Pour ce faire, les gels de polyacrylamides et les membranes de nitrocelluloses ont été préalablement trempés dans du tampon de transfert [25 mM Tris-HCl pH 7,2, 192 mM glycine, 20% (v/v) méthanol] puis le montage a été effectué selon le protocole du manufacturier. Le transfert a été réalisé à 100 volts et 250 miliampères pendant 1 heure dans le "Mini Trans-Blot" (BIO-RAD) ou pendant une nuit à 30 volts et 40 miliampères.

10.3- Détection des protéines par la technique d'immunobuvardage.

Pour la détection des protéines, une des deux membranes a été mise en présence d'un anticorps hyperimmun de souris dirigé contre les protéines du virus

HCV-OC43 (NIH: Cat. # V360-701-562) dilué 1/100 dans du tampon PBST [PBS contenant 0.02 % (v/v) Tween 20]. La deuxième membrane a été mise en présence des anticorps produits chez le lapin et dirigé contre la protéine ns2 recombinante du HCV-OC43 dilué 1/50 dans du tampon PBST. Les deux membranes ont été incubées sous agitation constante à 4 °C pendant 4 heures. Une fois l'incubation complétée, les membranes ont été lavées 4 fois (10 min chaque fois) avec 150 ml de tampon PBS. Les anticorps secondaires utilisés étaient des anticorps anti-souris ou anti-lapin couplés à l'enzyme peroxydase de raifort (KPL). Chaque membrane a été incubée pendant 2 heures à la température de la pièce avec l'anticorps secondaire dilué 1/1000 dans du PBST, puis lavée 4 fois (10 min chaque fois) avec 150 ml de PBS. Les membranes ont ensuite été incubées pour une durée variant entre 10 min et 1 heure dans une solution contenant 10 ml de PBS, 4 μ l de H₂O₂ et 0.5 mg/ml de 4-chloro-1-naphtol. Une fois les bandes bien visibles, les réactions ont été arrêtées en remplaçant la solution par de l'H₂O distillée. Finalement les membranes ont été photographiées tels que décrit précédemment (section 3.3).

RÉSULTATS

1- Amplification du gène ns2.

Des expériences préliminaires effectuées dans notre laboratoire ont montré l'existence pour la première fois d'un ARNm 2 chez HCV-OC43 (Fig. 6). L'approche utilisée afin de démontrer l'existence d'un gène en 5' de cet ARNm 2 codant pour une protéine putative non-structurale a été celle de l'amplification directe par la technique du RT-PCR. Se basant sur la très haute homologie entre le génome des coronavirus bovin et humain de souche OC43 (Zhang et al., 1992; Mounir et Talbot, 1993a; Mounir et al., 1994) des amorces ont été synthétisées selon les séquences connues du génome du HCV-OC43 et BCV. L'amorce complémentaire 32KI, utilisée afin de produire l'ADNc, a été déduite de l'extrémité 3' du gène codant pour la protéine ns2 de BCV et de l'extrémité 5' du gène de la HE. L'amorce 32KI contient en son extrémité 5' l'anticodon de terminaison TAA de la protéine ns2 de BCV. L'amorce homologue 32KH a été déduite à partir de l'extrémité 5' du gène codant pour la protéine ns2 de BCV, elle contient le codon d'initiation de la traduction ATG. Avec ces deux amorces une réaction de transcription inverse puis de PCR a été réalisée (Fig.7). Une bande de 870 pb a été observée après amplification de l'ARN provenant de cellules HRT-18 infectées avec HCV-OC43. Au contraire, aucune bande n'a été décelée à partir de l'ARN provenant de cellules non-infectées ou bien avec le témoin négatif (échantillon ne contenant pas d'ARN). La bande de 870 pb a ensuite été excisée d'un gel préparatif et insérée dans un vecteur T (pCR 1000™) pour être ultérieurement séquencée. Une deuxième réaction de PCR a été effectuée avec l'amorce 32KI et une amorce provenant de l'extrémité 5' de la séquence tête du HCV-OC43 (Kamahora et al., 1989) (Fig. 8). Cette réaction de PCR avait pour objectif, l'amplification de l'extrémité 5' de l'ARNm 2 incluant la séquence de tête retrouvée en 5' de chaque ARNm. Ceci devrait permettre de déterminer si d'autres ORF se

FIGURE 6. Hybridation d'ARN de type Northern indiquant les ARNm du HCV-OC43. La numérotation des ARNm est indiquée sur la gauche. Les ARNm sont révélés à l'aide de sonde marquées au ³²P. Sonde M, provient de l'extrémité 3' du génome et s'hybride à tous les ARNm. Les sondes 9.5 kDa, 12.9 kDa et S2 proviennent de régions différentes du génome et s'hybrident que sur certains ARNm. " I ", ARN provenant de cellules HRT-18 infectées par HCV-OC43. "U", ARN provenant de cellules HRT-18 non infectées.

tiré de : Mounir et Talbot, 1993



FIGURE 7. Amplification d'ADN à l'aide des amorces 32KI et 32KH. Réaction de RT-PCR effectuée sur de l'ARN provenant de: 1, cellules HRT-18 non infectées. 2, cellules HRT-18 infectées par HCV-OC43. 3, témoin négatif (aucun ARN). M, marqueur de tailles. L'origine des amorces 32KI et 32KH sur le génome de HCV-OC43 est illustrée par les lettres I et H respectivement.



FIGURE 8. Amplification d'ADN à l'aide des amorces 32KI et Leader. Réaction de RT-PCR effectuée sur de l'ARN provenant de: 1, témoin négatif (aucun ARN). 2 et 3, cellules HRT-18 infectées par HCV-OC43. 4, cellules HRT-18 non infectées. M, marqueur de tailles.



situent en 5' de la région amplifiée par le premier PCR. Suite à la réaction de PCR avec ces amorces, des bandes à 500 et 900 pb ont été observées avec deux échantillons d'ARN provenant de cellules infectées par HCV-OC43. La bande de 500 pb a également été observée avec l'ARN provenant de cellules non-infectées, ce qui laisse présumer que cette bande correspond à l'amplification d'un fragment d'ARN cellulaire. La bande de 900 pb dont la taille correspond a celle du fragment attendu a été extraite et insérée dans le vecteur pCR 1000[™].

Les deux vecteurs recombinants ont été introduits dans des bactéries InvaF' (Invitrogen). Afin de déterminer quelles étaient les colonies qui contiennaient les bonnes constructions, une vingtaine de colonies ont été prélevées et analysées par digestion des plasmides avec les enzymes de restriction *Sac* I et *Eco* RI (Fig. 9). Deux colonies de chaque construction ont été choisies afin de permettre le séquençage des inserts de 870 pb (correspondant au fragment obtenu lors du PCR réalisé avec les amorces 32KI et 32KH) et 900 pb (correspondant au fragment obtenu lors du PCR réalisé avec les amorces 32KI et Leader).

2- Séquence du gène ns2.

La séquence des fragments a été réalisée selon la méthode de Sanger et coll. (Sanger *et al.*, 1977). Deux amorces internes (32KI2 et 32KH2) ont été synthétisées afin de compléter la séquence des régions internes des fragments. La séquence des deux fragments de PCR était identique à l'exception de l'extrémité 5' du fragment de 900 pb. Ainsi, ce fragment contient une séquence additionnelle correspondant à la séquence de tête du HCV-OC43 (Fig. 10). La séquence nucléotidique des fragments amplifiés a révèlée un ORF codant pour une protéine putative de 278 aa avec une masse moléculaire prédite de 32.2 kDa. FIGURE 9. Profil de restriction. Bactéries Inv α F' transformées par le vecteur pCR 1000TM contenant le produit du RT-PCR effectué avec les amorces 32KI et 32KH. L'ADN plasmidique des colonies est digéré par les enzymes de restrictions *Sac* I et *Eco* RI. M, marqueur de tailles.



FIGURE 10. Séquence complète du gène ns2 de HCV-OC43 ainsi que la séquence en acides aminés correspondante. La séquence de tête est soulignée. La séquence intergénique consensus est doublement soulignée. Les sites potentiels de phosphorylations sont indiqués (•). Le codon de terminaison est indiqué par un astérisque.

M A v 3 GCT TAT GCA GAC AAG CCT AAT CAT TTT ATC AAT TTT CCA CTT ACC CAT TTT CAG GGT TTT GTG TTA AAT 155 A Y A D K P N H F I N F P L T H F Q G F V LN 26 TAT AMA GGT TTA CAN TTT CAN ATT CTC GAT GAA GGA GTG GAT TGT AMA ATA CAN ACA GCG CCN CAC ATT 224 YKGLQFQILDEGV DCKIQTAPHI 49 AGT CTT ACT ATG CTG GAC ATA CAG CCT GAA GAC TAT AAA AGT GTT GAT GTC GCT ATT CAA GAA GTT ATT 293 V D IQPE D Y K S LTMLD V A I QE v I GAT GAT ATG CAT TGG GGT GAT GGG TTT CAG ATT AAA TTT GAG AAT CCT CAC ATC CTA GGA AGA TGC ATA 362 D D M H W G D G F Q I K F E N P H I L G R C I 95 GTT TTA GAT GTT AAA GGT GTA GAA GAA TTG CAT GAC GAT TTA GTT AAT TAC ATT CGT GAT AAA GGT TGT 431 V L D V K G V E E L H D D L V N Y I R D K G C 118 GTT GCT GAC CAA TCC AGG AAA TGG ATT GGC CAT TGC ACC ATA GCT CAA CTC ACG GAT GCA GCA CTG TCC 500 V A D Q S R K W I G H C T I A Q L T D A A L S 141 IKENVDFI N S M Q F N Y K I TI N P S S 164 CCG GCT AGA CTT GAA ATA GTT AAG CTC GGT GCT GAA AAG AAA GAT GGT TTT TAT GAA ACC ATA GTT AGT 638 P A R L E I V K L G A E K K D G F Y E тіч S 187 CAC TGG ATG GGA ATT CGT TTT GAA TAC ACA TCA CCC ACT GAT AAG CTA GCT ATG ATT ATG GGT TAT TGT 707 HWMGIRFEYTSPTDKLAMIMGYC 210 . . TGT TTA GAT GTG GTA CGT AAA GAG CTA GAA GAA GGC GAT CTT CCC GAG AAT GAT GAT GAT GCT TGG TTT 776 CLDVVRKELEEGDLPENDDDAWF233 AAG CTA TCG TAC CAT TAT GAA AAC AAT TCT TGG TTC TTC CGA CAT GTC TAC AGG AAA AGT TTT CAT TTC 845 KLSYHYENNSWFFRHVYRKSFHF256 CGT AAG GCT TGT CAA AAT TTA GAT TGT AAT TGT TTG GGG TTT TAT GAA TCT CCA GTT GAA GAA GAC TAA 914 R K A C Q N L D C N C L G F Y E S P V E E D * 278

TTGTGAGCGAAGTTGCGTGCGTTGCATCCCGCTTCACTGATCTCTTGTTAGAACTTTAGAAACTTAAAAAATG GCT GTC 86

1

En 5' de cet ORF, on a retrouvé la séquence consensus intergénique UCUAAAC et la séquence de tête indiquant que ce gène était situé en 5' d'un ARNm.

3- Analyse et comparaison de la séquence en acides aminés.

L'analyse informatisée de la séquence des aa de la protéine putative ns2 a permis de constater qu'aucun site de *N*-glycosylation n'était présent et que six sites de phosphorylations étaient présents (Fig. 10). Le profil d'hydrophylicité a également été déterminé selon la méthode de calcule de Kyte et Doolittle (Kyte et Doolittle, 1982) (Fig. 11). L'alignement de la séquence en aa de la protéine putative ns2 du HCV-OC43 avec celle des coronavirus BCV, MHV-JHM et A59 est illustré sur la figure 12. Le tableau II montre le pourcentage d'identité entre les séquence de la protéine ns2 de ces quatres virus. Nous avons observés 93% d'identité entre les protéines ns2 de MHV-A59 et MHV-JHM, 50% d'identité entre celles des deux souches de MHV et celles des coronavirus BCV et HCV-OC43, 92% d'identité entre les protéines ns2 de BCV et HCV-OC43.

4- Expression de la protéine ns2 et production d'un antisérum.

Afin d'insérer le gène codant pour la protéine ns2 dans le vecteur d'expression pMAL[™]-c2, une amplification par PCR avec les amorces 32KI et 32KH auxquelles sont ajoutés deux sites de restriction *Bam* HI est effectuée. Les produits de cette réaction sont illustrés sur la figure 13. Une bande à 850 pb a été observée avec les réactions de PCR effectuées sur deux échantillons d'ARN provenant de cellules infectées. Cette bande a été insérée dans le site *Bam* HI du vecteur pMAL[™]c2. Suite à la transformation des bactéries XL1-blue, nous avons affectué plusieurs FIGURE 11. Profil d'hydrophilicité de la protéine ns2. (A): HCV-OC43. (B): BCV. Selon la méthode de calcul établie par Kyte et Doolittle (1982). Fenêtre de sept acides aminés. Les valeurs positives indiquent les régions hydrophiles et les valeurs négatives indiquent les régions hydrophobes.



B)



FIGURE 12. Comparaison de la séquence en acides aminés de la protéine ns2 de HCV-OC43, BCV, MHV-JHM et MHV-A59. Les points indiquent des résidus identiques à ceux de HCV-OC43. Des tirets sont introduits dans la séquence afin de maximiser l'alignement.

.

HCV-OC43 BCV MHV-JHM MHV-A59	MAVAYADKPNHFINFPLTHFQGFVLNYKGLQFQILDEGVDCKIQTAPHISLTMLDIQPEDYKSVDVAI 	68 68 70 66
HCV-OC43 BCV MHV-JHM MHV-A59	QEVIDDMHWGDGFQIKFENPHILGRCIVLDVKGVEELHDDLVNYIRDKGCVADQSRKWIGHCTIAQLTDA 	138 138 139 135
HCV-OC43 BCV MHV-JHM MHV-A59	ALSIKENVDFINSMQFNYKITINPSSPARLEIVKLGAEKKDGFYETIVSHWMGIRFEYTSPTDKLAMIMG K-EMQ.YFKLPLKHN.LLTDL.I.SS.VCSEL.I.C.E.LC.KP.P.FSD.F. K-RN.R-NE.YHKEPLKHN.LLTD.G.L.I.SS.ICSEL.V.C.E.LC.KP.P.FSD.F.	208 208 206 202
HCV-OC43 BCV MHV-JHM MHV-A59	YCCLDVVRKELEEGDLPENDDDAWFKLSYHYENNSWFFRHVYRKSFHFRKACQNLDCNCLGFYESPVEED* SEVLISVSLV* IDKI.GD.IPD.EEAEQR.TYHDN.IV.TV.RMKG.M.* IDKI.GD.IQD.EEAEQR.TYHDN.IV.TV.RMKG.M.*	278 277 265 261

.

TABLEAU II. Identité entre la séquence en acides aminés de la protéine ns2de HCV-OC43, BCV, MHV-JHM et MHV-A59.

Identité	HCV-OC43	всу	MHV-A59	мну-јнм
HCV-OC43	100 %	92 %	49 %	51 %
BCV		100 %	48 %	50 %
MHV-A59			100 %	93 %

FIGURE 13. Amplification d'ADN à l'aide des amorces *Bam* HI 32KI et *Bam* HI 32KH. Réaction de RT-PCR effectuée sur de l'ARN provenant de: 1 et 2, cellules HRT-18 infectées par HCV-OC43. 3, cellules HRT-18 non infectées. M, marqueur de tailles.


extractions d'ADN plasmidique (voir section 4.5) sur des colonies blanches (recombinantes) afin d'isoler des clones positifs. Après plusieurs essais infructueux, nous avons décidé de changer de technique. Ainsi, l'identification des bonnes constructions a été réalisée suite à l'hybridation des colonies blanches avec une sonde marquée au $[\alpha - 3^2 P]$ dCTP (Fig. 14). Parmi les colonies marquées radioactivement, deux ont été digérées avec l'enzyme de restriction Eco RI afin de déterminer l'orientation de l'insert. La colonie nommée 7-22 dont l'insert se trouve dans la bonne orientation a été par la suite partiellement séquencée. En effet les extrémités du site multiple de clonage de cette colonie ont été séquencées afin de vérifier si le gène Mal/E codant pour la protéine MBP était en phase avec le gène inséré codant pour la protéine ns2. Une fois l'intégrité du gène vérifié, la synthèse de la protéine de fusion MBP-ns2 a été induite par l'ajout d'IPTG à une culture bactérienne de la colonie 7-22 (Fig. 15, rangée 1). Par la suite, la localisation de la protéine de fusion MBP-ns2 dans la cellule a été déterminée. La figure 16 montre que la protéine MBP-ns2 précipite avec les protéines insolubles, ce qui indique que cette protéine est emmagasinée dans les corps d'inclusion. Afin d'optimiser la production de la protéine MBP-ns2, certains paramètres telles la température d'induction, la concentration bactérienne et la durée de l'induction de l'expression ont été analysés. La figure 17 illustre les résultats d'essais sur ces trois paramètres. L'induction des bactéries à 37 °C pour une durée de trois heures avec une D.O. à 600 nm de 0.6 a donné les meilleurs résultats (Fig. 17, rangée 7). Suivant ces paramètres, 3 µg de protéine de fusion MBP-ns2 ont été obtenus par chromatographie sur une colonne d'affinité de résine d'amylose à partir de 700 ml de culture bactérienne (Fig. 18). Un antisérum spécifique à la protéine de fusion MBP-ns2 a été obtenu suite à l'immunisation d'un lapin avec la protéine purifiée, préalablement dialysée contre du tampon TE.

FIGURE 14. Détection des bactéries TB1 recombinantes par hybridation avec le gène ns2 marqué au $[\alpha - 3^2P]dCTP$.



FIGURE 15. Induction de l'expression de la protéine de fusion MBP-ns2. Rangé: 1, colonie recombinante 7-22 (orientation 5' - 3') induite. 2, colonie recombinante 7-22 non induite. 3, bactérie TB1 contenant pMALTM-c2 non induit. 4, bactérie TB1 contenant pMALTM-c2 induit. 5 et 6, colonies recombinantes (orientation 3' - 5') induite. 7, bactérie TB1 non induite. M, marqueur de masses moléculaires (kDa). La masse moléculaire de MBPns2 est de 74 kDa (rangé 1) et celle de la protéine MBP est de 42 kDa (rangés 5 et 6).



FIGURE 16. Localisation cellulaire de la protéine de fusion MBP-ns2.
Ligne: 1 et 3, protéines contenues dans la matière insoluble de la colonie 7-22 induite. 2 et 4, protéines contenues dans la matière soluble de la colonie 7-22 induite.



FIGURE 17. Paramètres optimaux pour l'induction de l'expression de la protéine de fusion MBP-ns2 de la colonie 7-22. Lignes 1 à 8, température d'induction de 37°C. Ligne 9 à 12, température d'induction de 30°C. Lignes 1 à 5 et 9 à 12, densité cellulaire à l'induction de 0,3 (D.O. à 600 nm). Lignes 6 à 8, densité cellulaire à l'induction de 06 (D.O. à 600 nm). Lignes 3, 4, 5, 8 et 12, cellules induites pendant 1 heure. Lignes 2, 7 et 11, cellules induites pendant 2 heures. Lignes 1, 6 et 10, cellules induites pendant 3 heures. Ligne 9, cellules induites pendant 4 heures. Lignes 4 et 5, bactéries TB1 induites et non induites. M, marqueur de masses moléculaires (kDa).



FIGURE 18. Purification de la protéine de fusion MBP-ns2 par chromatographie d'affinité. (A): ligne 1, protéines totales de la colonie 7-22 induite. Ligne 2, protéines de la matière insoluble traitée au Triton X-100 et lysosyme. Ligne 3, protéines éluées de la colonne d'affinité. Ligne 4, protéines contenues dans la solution de lavage. M, marqueur de masses moléculaires (kDa). (B): Suivi de l'élution de la protéine de fusion MBP-ns2 par A₂₈₀.



5- Immunofluorescence.

L'expression de la protéine ns2 du HCV-OC43 par les cellules HRT-18 a été démontrée par des expériences d'immunofluorescence. Un antisérum produit chez la souris et dirigé contre la protéine ns2 de BCV a permis de montrer l'expression de la protéine ns2 du HCV-OC43 dans les cellules infectées (Fig. 19 panneau B). Des cellules non-infectées traitées avec le même antisérum ont montré la spécificité de celui-ci pour la protéine ns2 (Fig. 19, panneau A). Un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine N de HEV a servi à prouver l'efficacité de l'infection des cellules HRT-18 par le HCV-OC43 (Fig. 19, panneau D) et un sérum préimmum de souris a servi de témoin négatif (Fig. 19, panneau C).

6- Immunobuvardage.

Par immunobuvardage de type Western, les différentes protéines virales N, S, S1/S2 et HE (50 kDa, >116 kDa, 80 kDa, 38 kDa et 65 kDa) ont été identifiées sur des échantillons provenant de cellules infectées et de virus purifiés grâce à un antisérum hyperimmun de souris dirigé contre HCV-OC43 (Fig. 20, A). À l'aide de l'antisérum spécifique à la protéine de fusion MBP-ns2, nous avons démontré que la protéine ns2 était produite par les cellules infectées avec HCV-OC43 (32 kDa) mais quelle ne pouvait être détectée à partir d'une solution de virus purifié (Fig. 20, B).

FIGURE 19. Immunofluorescence indirecte des cellules HRT-18 infectées par HCV-OC43. Après 66 heures d'infection, les cellules sont fixées et marquées avec un anticorps primaire puis avec un anticorps secondaire anti-souris couplé au FITC. (A), cellules non infectées marquées avec un anticorps spécifique à la protéine ns2. (B), cellules infectées marquées avec un anticorps spécifique à la protéine ns2. (C), Cellules infectées marquées avec un antisérum préimmun. (D), cellules infectées marquées avec un anticorps monoclonal anti-N. Grossissement de 400x.



FIGURE 20. Immunobuvardage des cellules HRT-18 infectées par HCV-OC43. (A), avec un antisérum hyperimmum anti-HCV-OC43 et (B), avec un antisérum polyclonal anti-ns2 de HCV-OC43. Lignes 1 et 2, cellules infectées pendant 48 et 96 heures. Ligne 3, cellules non infectées. Ligne 4, solution de virus purifiés.



DISCUSSION

S'appuyant sur des données qui illustrent clairement la très haute homologie entre le génome du coronavirus respiratoire humain HCV-OC43 et entérique bovin BCV, la question suivante fut posée: existe-t-il une différence génomique majeure entre ces deux virus pouvant expliquer la différence de tropisme de ceux-ci? La comparaison détaillée des gènes codant pour les protéines structurales de ces deux virus n'a montré que des différences mineures et le profil des gènes codant pour les protéines non-structurales de ces virus n'est pas encore complété. Il est donc possible qu'il existe des différences majeures dans les gènes des protéines nonstructurales pouvant affecter certaines fonctions virales telles que le tropisme. L'observation d'une phosphoprotéine de 32 kDa codée à partir d'un gène situé en 5' de la HE chez BCV (Cox et al., 1989,1990) nous a amené à déterminer si une telle protéine non-structurale existe chez HCV-OC43. L'identification d'un ARNm 2 effectuée dans notre laboratoire par hybridation de type "Northern" avait suggéré l'existence possible d'ORF en 5' de cet ARNm. Deux approches ont été envisagées afin d'identifier sur HCV-OC43 ce gène observé chez BCV. La première approche était de produire une banque d'ADNc à partir d'une amorce située dans le gène de la HE. La deuxième approche consistait à amplifier le gène par RT-PCR avec des amorces dont les séquences étaient déduites du coronavirus bovin BCV. Bien que la première approche était la plus sûre des deux, nous avons privilégié la deuxième méthode puisque celle-ci était plus rapide et moins fastidieuse.

La taille du produit de la réaction de RT-PCR, obtenue avec la paire d'amorce 32KH et 32KI effectué sur de l'ARN provenant de cellules infectées par HCV-OC43, correspondait parfaitement à la taille attendue selon celle du gène ns2 observé chez BCV (Cox *et al.*, 1989). Le séquençage complet de ce fragment a permis de constater la présence d'un ORF codant pour une protéine de 278 aa. Nous avons ensuite

effectué un second RT-PCR avec une nouvelle paire d'amorces (Leader et 32KI) afin d'amplifier le gène ns2 et sa séquence de tête. La séquence du gène ns2 obtenue avec ce RT-PCR est identique en tout point avec la séquence du gène ns2 obtenue avec la réaction de RT-PCR précédente. De plus, cette réaction de RT-PCR a permis d'identifier la séquence de tête, longue de 77 nucléotides, situé en 5' de cet ARNm. La séquence intergénique consensus UCUAAAC nécessaire à la transcription est observée 15 nucléotides en 5' du codon d'initiation de la protéine ns2 putative. De plus, le codon d'initiation est placé dans un contexte favorable à son utilisation selon le principe de Kozak (Kozak, 1991). Puisque l'ARNm 3 commence par le gène de l'HE, il nous parait évident que le gène ns2 se situe sur l'ARNm 2 car la fin du gène ns2 se situe dans le début du gène de l'HE. Tout ceci indique que le gène ns2 est placé en 5' de l'ARNm 2 et qu'il est très probable qu'il soit exprimé. La comparaison de la séquence en aa de la protéine putative ns2 avec celles de protéines correspondantes d'autres coronavirus tel BCV, MHV-A59 et JHM, a permis de constater l'existence de régions très bien conservées entre ces quatres protéines, ce qui indique probablement l'importance de ces régions pour l'activité biologique de ces protéines. Les protéines ns2 provenant de deux souches de MHV ont 93 % d'identité entre elles et environ 50 % avec celles de BCV et HCV-OC43. Les protéines ns2 de BCV et HCV-OC43 montrent 92 % d'identité, un niveau de conservation aussi élevé entre la protéine ns2 de ces deux virus indique premièrement que cette protéine possède probablement un rôle biologique et deuxièmement que ces deux virus n'ont probablement divergé que récemment. Cette deuxième constatation est basée également sur le haut niveau d'identité observé pour tout le génome de ces deux virus. Malgré le haut niveau de conservation de la séquence en aa entre la protéine ns2 de BCV et HCV-OC43, une séquence de neuf aa consécutifs diffère dans la portion C-terminale de la protéine.

Cette différence est causée par un changement de cadre de lecture dû à l'insertion d'un nucléotide à la position 834 (Fig. 10). Le cadre de lecture original est restauré par l'insertion de deux nucléotides à la position 858 (Fig. 10). La présence de ces trois insertions explique pourquoi la protéine ns2 de HCV-OC43 possède un acide aminé de plus que son homologue de BCV. Le profil d'hydrophilicité de la protéine ns2 de HCV-OC43 et de BCV présente une nette différence dans la région Cterminale. Ainsi cette région est fortement hydrophobe chez BCV et est au contraire hydrophile chez HCV-OC43. Il est possible que ce changement drastique occasionne une modification de la structure secondaire et tertiaire de la protéine, ce qui par conséquent pourrait modifier la fonction biologique de celle-ci. Le profil d'hydrophilicité laisse supposer que la protéine ns2 n'est probablement pas une protéine transmembranaire. En effet, les longueurs des régions hydrophobes n'apparaissent pas suffisantes pour l'insertion de cette protéine dans une bicouche lipidique (Zoltick et al., 1990). L'analyse informatisée de la séquence a révélé la présence de six sites potentiels de phosphorylation mais aucun site de Nglycosylation n'a été retrouvé. Parmi ces sites de phosphorylation, quatres sont identiques à ceux déjà observés chez la phosphoprotéine ns2 de BCV. Ceci indique que la protéine ns2 de HCV-OC43 est probablement phosphorylée également. Les protéines ns2 de MHV-A59, MHV-JHM et BCV possèdent trois domaines de liaison aux acides nucléiques (Luytjes et al., 1988; Bredenbeek et al., 1990). Même si la protéine ns2 de HCV-OC43 possède des domaines très similaires, il est peu probable que cette protéine puisse se lier avec l'ARN puisque son point isoélectrique est de 4.8. En effet, les charges négatives de la protéine ns2 et de l'ARN devrait conduire à la répulsion de ces molécules au pH physiologique.

Bien que le gène codant pour la protéine ns2 de HCV-OC43 avait été clairement identifié, il était important de vérifier l'expression et la nature de la protéine en culture cellulaire. Pour cela, un anticorps polyclonal monospécifique à cette protéine était nécessaire. Afin de produire cet anticorps, nous avons choisi d'insérer le gène dans le vecteur d'expression procaryotique pMAL[™]-c2 (New England Biolabs). Ce vecteur possède un promoteur qui dérive des promoteurs des opérons tryptophane et lactose. Ce promoteur "tac" situé en 5' du signal d'initiation de la traduction du gène *malE* permet un haut niveau d'expression de la séquence clonée (Amann et Brosius, 1985; Duplay et al., 1984) De plus, ce vecteur permet de purifier directement les protéines produites par chromatographie d'affinité (Kellermann et Ferenci, 1982). La protéine MBP codée par le gène MalE d'E. coli a la propriété de se lier à certains sucres comme le maltose et l'amylose. Puisque la protéine MBP se fusionne à l'extrémité N-terminale de la protéine d'intérêt, celle-ci peut se purifier directement. La quantité de protéines produites a été relativement faible (3.0 mg) lorsque comparé à d'autres observations où les niveaux d'expression étaient de l'ordre de 50 mg/L de culture (Aman et Brosius, 1985; Duplay et al., 1984) mais suffisante pour la production d'un antisérum chez le lapin.

Avec cet antisérum et un antisérum de souris dirigé contre la protéine ns2 de BCV (fournit par le Dr. Pascal Boireau) nous avons pu démontrer l'expression de la protéine ns2 du HCV-OC43 en culture cellulaire. Puisque le niveau d'homologie entre la protéine ns2 de BCV et de HCV-OC43 est très élevé, il nous parait évident qu'un antisérum dirigé contre la protéine ns2 de BCV puisse reconnaître aussi bien la protéine ns2 de l'un ou l'autre virus. C'est pourquoi nous n'avons pas été étonné de constater que l'anticorps dirigé contre la protéine ns2 de BCV donne de meilleurs résultats en immunofluorescence que l'anticorps spécifique dirigé contre la protéine ns2 de HCV-OC43 produit dans notre laboratoire.

Cox et coll. avaient démontré par immunoprécipitation que la protéine ns2 de BCV était encore synthétisée en grande quantité 48 heures après l'infection. De ce fait, la protéine ns2 de BCV semble avoir le même profil d'expression que les protéines structurales des coronavirus (Cox *et al.*, 1991). Bien qu'aucune cinétique sur l'expression de la protéine ns2 du HCV-OC43 n'a été établie, les résultats d'immunofluorescence et d'immunobuvardage (ci-dessous) indiquant que cette protéine est exprimée jusqu'à 96 heures après l'infection, suggèrent aussi que la protéine ns2 est exprimée de façon constitutive.

Les affirmations indiquant que la protéine ns2 est non-structurale sont basées sur des expériences de détection à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines virales et d'antisérums hyperimmuns. Ainsi des anticorps dirigés contre les protéines du virus MHV n'ont pu déceler la présence de la protéine ns2 (Bredenbeek et al., 1990a; Zoltick et al., 1990). Afin de démontrer clairement la nature nonstructurale de la protéine ns2 du HCV-OC43, un immunobuvardage de type Western a été effectué avec des protéines provenant de cellules infectées, noninfectées et de virus purifiés. Un antisérum hyperimmun dirigé contre les protéines du virus HCV-OC43 a permis de démontrer le haut niveau d'expression de la protéine N dans les échantillons de cellules infectées et de virus purifié. De plus, ce sérum a permis d'identifier les différentes protéines structurales virales N, S, S1/S2 et HE (50 kDa, >116 kDa, 80 kDa, 38 kDa et 65 kDa) sur la préparation de virus purifié. A l'exception de la protéine N, aucune de ces protéines virales n'a pu être clairement visualisée avec les échantillons de cellules infectées. Ceci indique clairement que la concentration de protéines virales est beaucoup plus élevée dans la préparation de virus purifié que dans les cellules infectées. Nous avons ensuite

vérifié la présence de la protéine ns2 dans les échantillons de cellules infectées et de virus purifiés avec notre antisérum dirigé contre la protéine ns2 de HCV-OC43. Bien que la concentration en protéine virale soit supérieure dans la préparation de virus purifié, aucune trace de la protéine ns2 n'a été observée. Par contre, la protéine ns2 a été clairement identifiée dans les échantillons de cellules infectées. Tout ceci suggère fortement que la protéine ns2 ne s'incorpore pas dans la particule virale et qu'elle est de ce fait une protéine non-structurale. De plus, avec cette expérience, il a été possible de constater que la masse moléculaire déduite à partir de la séquence en aa (32.2 kDa) de la protéine ns2 correspond très bien à la masse moléculaire de la protéine ns2 produite en culture cellulaire (32 kDa), ce qui suggère que cette protéine est réellement le produit du gène codant pour la protéine ns2.

L'analyse informatique de la séquence en aa de la protéine ns2 n'a montré aucune structure particulière pouvant donner un indice sur sa fonction biologique. Il est malgré tout intéressant de constater que la protéine ns2 n'est exprimée que chez les coronavirus du deuxième groupe antigénique (Tableau I). Le deuxième groupe antigénique comprend en plus des virus BCV, MHV, et HCV-OC43, où la protéine ns2 est présente, deux autres virus (RbCV et HEV). Jusqu'à présent, les virus possédant la protéine ns2 possèdent également la protéine HE. Puisque le virus HEV possède cette protéine HE, il est fort probable que ce virus contient le gène codant pour la protéine ns2. De plus, on pourrait envisager l'existence d'une interaction physique et/ou fonctionnelle entre les protéines ns2 et HE.

Les protéines non-structurales sont très nombreuses chez les virus. Leurs fonctions biologiques sont souvent reliées à une activité enzymatique. De ce fait, -elles correspondent aux réplicases et transcriptases virales telles les protéines nsP3 et nsP4 du virus Sindbis (Lemm et Rice, 1993), -elles agissent comme des protéinases et c'est le cas de la protéine ns3 du virus de l'hépatite C (Tomei *et al.*, 1993), -elles peuvent agir au niveau du bourgeonnement du virion telle la protéine 6K du virus de la forêt de Semliki (Liljeström *et al.*, 1991), -elles peuvent réguler l'activation de la synthèse de l'ARN viral telles les protéines nsP2 et nsP4 du virus Sindbis (Sawicki *et al.*, 1990; Sawicki et Sawicki, 1993), -elles peuvent avoir des activités de déphosphorylations (NTPase) telle la protéine ns3 du virus de la fièvre jaune (Warrener *et al.*, 1993), etc. La grande variété des fonctions associées aux protéines non-structurales indique l'importance de leur expression *in vivo* et démontre bien à quel point leur caractérisation peut être un facteur important pour la compréhension du mécanisme de réplication des virus.

Les virus HCV-OC43 et BCV se répliquent sur la même lignée cellulaire. Pourtant, ces deux virus infectent des hôtes et des organes différents et provoquent des maladies différentes. En effet, le coronavirus bovin cause principalement des infections entériques et le coronavirus humain cause principalement des infections respiratoires. Toutes les séquences en aa connues pour ces virus ont un degré d'identité supérieur à 91 %. Les résultats présentés dans ce mémoire démontrent que les protéines ns2 de BCV et HCV-OC43 ont également un degré d'identité très élévé et ce malgré une divergence de neuf aa consécutifs dans la partie C-terminale de la protéine. Récemment, une équipe a séquencé le gène codant pour la protéine ns2 d'une autre souche de BCV (Boireau *et al.*, 1994). Bien que la séquence nucléotidique n'est pas été publiée, les auteurs affirment que l'extrémité C-terminale de la protéine ns2 de cette souche de BCV diffère de l'autre souche déjà publié (Cox *et al.*, 1989). Il semble que l'extrémité C-terminale de cette souche virale ressemble à celle du HCV-OC43 (P. Boireau, communication personnelle). Les résultats

présentés dans ce mémoire complètent la caractérisation du dernier tiers du génome du virus HCV-OC43. Les deux autres tiers du génome codent probablement pour l'ARN polymérase ARN dépendante. Donc, l'organisation génomique du virus est la suivante: 5'-pol/ns2/HE/S/ns4/sM/ns5-1/M/N-3'. Puisque les protéines structurales de ces deux virus sont pratiquement identiques, nous avions émis la possibilité que le tropisme de ces virus puisse être influencé par les protéines nonstructurales. Cette hypothèse demeure encore valable puisqu'en comparant le génome de HCV-OC43 et BCV, on s'aperçoit qu'il existe deux différences importantes au niveau des gènes codant pour des protéines non-structurales. La première se situe au niveau de l'ARNm 4 qui code chez BCV pour deux protéines putatives de 4.9 et 4.8 kDa. Sur HCV-OC43, cet ARNm ne contient qu'un ORF codant pour une protéine putative de 1.3 kDa. L'expression de ces protéines n'a pas encore été montré. La deuxième différence entre le génome de ces deux virus, se situe au niveau d'un gène interne retrouvé à l'intérieur du gène de la protéine N chez BCV (Lapps et al., 1987). La protéine correspondante a été observée en culture cellulaire (Senayake *et al.*, 1992). Sur HCV-OC43 ce gène interne est scindé en deux et les produits d'expression de ces deux ORF n'a pas été démontré. La présence de la protéine codée à partir de l'ORF interne de BCV est l'unique différence observée jusqu'à présent au niveau du profil protéique de ces deux virus.

Jusqu'à présent, seul le dernier tiers du génome de ces deux virus a été caractérisé. Il est fort probable qu'une multitude de gènes codant pour des protéines non-structurales soient présents dans les deux premiers tiers du génome comme cela fut démontré chez d'autres coronavirus (Boursnell *et al.*, 1987; Denison *et al.*, 1991; Herold *et al.*, 1993). De plus, des études ont déjà démontré que l'ARN polymérase codée à partir de cette région du génome possède une activité d'autoprotéolyse pouvant engendrer d'autres protéines non-structurales (Denison *et al.*, 1991). La caractérisation complète du génome de ces deux virus étroitement liés antigéniquement contribuera à la compréhension des fonctions biologiques reliées aux protéines virales de ces virus, l'un étant reconnu comme un pathogène respiratoire (HCV-OC43) et l'autre étant reconnu comme un pathogène entérique (BCV).

CONCLUSION

Par ce projet, nous pouvons conclure à la présence d'un gène situé immédiatement en 5' du gène de la HE et en 3' de la séquence de tête du HCV-OC43. Donc, ce gène est, par définition, situé en 5' de l'ARNm 2 et contient un ORF de 278 aa codant pour une protéine non-structurale de 32 kDa.

L'analyse informatisée ainsi que la comparaison entre la protéine ns2 du HCV-OC43 avec celle de BCV montre que la protéine ns2 est probablement phosphorylée. De plus, la séquence de cette protéine ns2 est relativement bien conservée à travers les différents membres des coronavirus. Ceci suggère que la protéine ns2 est active et possède possiblement un rôle fonctionnel important.

Sachant que la protéine ns2 est présente uniquement chez les virus possédant également la protéine structurale HE, il est possible que le rôle biologique de la protéine ns2 soit associé au rôle biologique de la protéine HE. Il a été démontré que la protéine HE permet la fixation de la particule virale à la cellule grâce à sa liaison à l'acide sialique *O*-acétylé présent à la surface de certaines cellules. Par conséquent, il est possible que la protéine ns2 joue un rôle au niveau de l'attachement virusrécepteur suite à une quelconque interaction physico-chimique entre ces deux protéines entraînant une modification de la conformation de la protéine HE. Cette hypothèse reste toutefois à être vérifiée.

BIBLIOGRAPHIE

ABRAHAM, S., T. E. KIENZLE, W. LAPPS et D. A. BRIAN. 1990a. Deduced sequence of the bovine coronavirus spike protein and identification of the internal proteolytic cleavage site. Virology <u>176</u>: 296-301.

ABRAHAM, S., T. E. KIENZLE, W. E. LAPPS et D. A. BRIAN. 1990b. 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 <u>177</u>: 488-495.

AKERS, T. G. et C. H. CUNNINGHAM. 1968. Replication and cytopathogenicity of avian infectious bronchitis virus in chicken embryo kidney cells. Arch. ges. Virusforsch. <u>25</u>: 30-37.

ALMEIDA, J. D., D. M. BERRY, C. H. CUNNINGHAM, D. HAMRE, M. S. HOFSTAD, L. MALLUCCI, K. McINTOSH et D. A. J. TYRRELL. 1968. Coronaviruses. Nature <u>220</u>: 650.

AMANN, E. et J. BROSIUS. 1985. 'ATG vectors' for regulated high-level expression of cloned genes in *Escherichia coli*. Gene <u>40</u>: 183-190.

ANDERSON, R. et F. WONG. 1993. Membrane and phospholipid binding by murine coronaviral nucleocapsid N protein. Virology <u>194</u>: 224-232.

ARMSTRONG, J., H. NIEMANN, S. SMEEKENS, P. ROTTIER et G. WARREN. 1984. Sequence and topology of a model intracellular membrane protein, E1 glycoprotein, from a coronavirus. Nature <u>308</u>: 751-752.

ARMSTRONG, J., S. SMEEKENS et P. ROTTIER. 1983. Sequence of the nucleocapsid gene from murine coronavirus MHV-A59. Nucleic Acids Res. <u>11</u>: 883-891.

BAKER, S. C., C. K. SHIEH, L. H. SOE, M. F. CHANG, D. M. VANNIER et M. M. C. LAI. 1989. Identification of a domain required for autoproteolytic cleavage of murine coronavirus gene A polyprotein. J. Virol. <u>63</u>: 3693-3699.

BARIC, R. S., K. FU, M. C. SCHAAD et S. A. STOHLMAN. 1990. Establishing a genetic recombination map for murine coronavirus strain A59 complementation groups. Virology <u>177</u>: 646-656.

BARIC, R. S., S. A. STOHLMAN et M. M. C. LAI. 1983. Characterization of replicative intermediate RNA of mouse hepatitis virus: presence of leader RNA sequences on nascent chains. J. Virol. <u>48</u>: 633-640.

BARIC, R. S., S. A. STOHLMAN, M. K. RAZAVI et M. M. C. LAI. 1985. Characterization of leader-related small RNAs in coronavirus-infected cells: further evidence for leader-primed mechanism of transcription. Virus Res. <u>3</u>: 19-33.

BATTAGLIA, M., N. PASSARANI, A. DI MATTEO et G. GERNA. 1987. Human enteric coronaviruses: further characterization and immunoblotting of viral proteins. J. Inf. Dis. <u>155</u>: 140-143.

BEAUDETTE, F. R. et C. B. HUDSON. 1937. Cultivation of the virus of infectious bronchitis. J. Am. Vet. Med. Assoc. <u>90</u>: 51-60.

BERRY, D. M., J. G. CRUICKSHANK, H. P. CHU et R J. H. WELLS. 1964. The structure of infectious bronchitis virus. Virology <u>23</u>: 403-407.

BINNS, M. M., M. E. G. BOURSNELL, D. CAVANAGH, D. J. C. PAPPIN et T. D. K. BROWN. 1985. Cloning and sequencing of the gene encoding the spike protein of the coronavirus IBV. J. Gen. Virol. <u>66</u>: 719-726.

BOIREAU, P., M. F. MADELAINE, D. SAULNIER, J. LAPORTE et J. F. VAUTHEROT. 1994. Identification, expression in *E. coli* and insect cells of the non-structural protein ns2 encoded by mRNA₂ of bovine coronavirus (BCV). Adv. Exp. Med. Biol. <u>342</u>: 69-74.

BONILLA, P. J., A. E. GORBALENYA et S. R. WEISS. 1994. Mouse hepatitis virus strain A59 RNA polymerase gene ORF 1a: heterogeneity among MHV strains. Virology <u>198</u>: 736-740.

BOURSNELL, M. E. G. et T. D. K. BROWN. 1984. Sequencing of coronavirus IBV genomic RNA: a 195-base open reading frame encoded by mRNA B. Gene <u>29</u>: 87-92.

BOURSNELL, M. E. G., M. M. BINNS et T. D. K. BROWN. 1985. Sequencing of coronavirus IBV genomic RNA: three open reading frames in the 5' "unique" region of mRNA D. J. Gen. Virol. <u>66</u>: 2253-2258.

BOURSNELL, M. E. G., T. D. K. BROWN et M. M. BINNS. 1984. Sequence of the membrane protein gene from avian coronavirus IBV. Virus Res. <u>1</u>: 303-313.

BOURSNELL, M. E. G., T. D. K. BROWN, I. J. FOULDS, P. F. GREEN, F. M. TOMLEY et M. M. BINNS. 1987. Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. J. Gen. Virol. <u>68</u>: 57-77.

BRADBURNE, A. F. 1970. Antigenic relationships amongst coronaviruses. Arch. ges. Virusforsch. <u>31</u>: 352-364.

BREDENBEEK, P. J., A. F. H. NOTEN, M. C. HORZINEK et W. J. M. SPAAN. 1990a. Identification and stability of a 30-kDa nonstructural protein encoded by mRNA 2 of mouse hepatitis virus in infected cells. Virology <u>175</u>: 303-306.

BREDENBEEK, P. J., C. J. PACHUK, A. F. H. NOTEN, J. CHARITÉ, W. LUYTJES, S. R. WEISS et W. J. M. SPAAN. 1990b. The primary structure and expression of the second open reading frame of the polymerase gene of the coronavirus MHV-A59: A highly conserved polymerase is expressed by an efficient ribosomal frameshifting mechanism. Nucleic Acids Res. <u>18</u>: 1825-1832.

BUCKNALL, R. A., L. M. KING, A. Z. KAPIKIAN et R. M. CHANOCK. 1972. Studies with human coronaviruses. II. Some properties of strains 229E and OC43. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. <u>139</u>: 722-727. BUDZILOWICZ, C. J. et S. R. WEISS. 1987. *In vitro* synthesis of two polypeptides from a nonstructural gene of coronavirus mouse hepatitis virus strain A59. Virology <u>157</u>: 509-515.

BURKS, J. S., B. L. DeVALD, L. D. JANKOVSKY et J. C. GERDES. 1980. Two coronaviruses isolated from central nervous system tissue of two multiple sclerosis patients. Science <u>209</u>: 933-934.

CAVANAGH, D. 1983a. Coronavirus IBV glycopolypeptides: size of their polypeptide moieties and nature of their oligosaccharides. J. Gen. Virol. <u>64</u>: 1187-1191.

CAVANAGH, D. 1983b. Coronavirus IBV: structural characterization of the spike protein. J. Gen. Virol. <u>64</u>: 2577-2583.

CAVANAGH, D. et P. J. DAVIS. 1986. Coronavirus IBV: removal of spike glycopolypeptide S1 by urea abolishes infectivity and haemagglutination but not attachment to cells. J. Gen. Virol. <u>67</u>: 1443-1448.

CAVANAGH, D. P. J. DAVIS et D. J. C. PAPPIN. 1986a. Coronavirus IBV glycopolypeptides: locational studies using proteases and saponin, a membrane permeabilizer. Virus Res. <u>4</u>: 145-156.

CAVANAGH, D., P. J. DAVIS, D. J. C. PAPPIN, M. M. BINNS, M. E. G. BOURSNELL et T. D. K. BROWN. 1986b. 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. <u>4</u>: 133-143.

COHEN, S. N., A. C. Y. CHANG et L. HSU. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA <u>69</u>: 2110-2114.

COLLINS, A. R. 1993. HLA class I antigen serves as a receptor for human coronavirus OC43. Immunol. Invest. 22: 95-103.

COLLINS, A. R., R. L. KNOBLER, H. POWELL et M. J. BUCHMEIER. 1982. Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for attachment and cell-cell fusion. Virology. <u>119</u>: 358-371.

COLLINS. A. R. 1994. Virus-ligand interactions of OC43 coronavirus with cell membranes. Adv. Exp. Med. Biol. <u>342</u>: 285-291.

COMPTON, S. R., D. B. ROGERS, K. V. HOLMES, D. FERTSCH, J. REMENICK et J. J. McGOWAN. 1987. *In vitro* replication of mouse hepatitis virus strain A59. J. Virol. <u>61</u>: 1814-1820.

COWEN, B. S., S. B. HITCHNER et T. UBERTINI. 1971. Characterization of a new infectious bronchitis virus isolate. II. Some chemical and physical properties of Clark 333. Avian Dis. <u>15</u>: 527-532.

COX, G. J., M. D. PARKER et L. A. BABIUK. 1989. The sequence of cDNA of bovine coronavirus 32K nonstructural gene. Nucleic Acids Res. <u>17</u>: 5847.

COX, G. J., M. D. PARKER et L. A. BABIUK. 1991. Bovine coronavirus nonstructural protein ns2 is a phosphoprotein. Virology <u>185</u>: 509-512.

DANIEL, C. et P. J. TALBOT. 1987. Physico-chemical properties of murine hepatitis virus, strain A59. Arch. Virol. <u>96</u>: 241-248.

DANIEL, C., R. ANDERSON, M. J. BUCHMEIER, J. O. FLEMING, W. J. M. SPAAN, H. WEGE et P. J. TALBOT. 1993. Identification of an immunodominant linear neutralization domain on the S2 portion of the murine coronavirus spike glycoprotein and evidence that it forms part of a complex tridimensional structure. J. Virol. <u>67</u>: 1185-1194. DE GROOT, R. J., J. MADURO, J. A. LENSTRA, M. C. HORZINEK, B. A. M. VAN DER ZEIJST et W. J. M. SPAAN. 1987. cDNA cloning and sequence analysis of the gene encoding the peplomer protein of feline infectious peritonitis virus. J. Gen. Virol. <u>68</u>: 2639-2646.

DELMAS, B., J. GELFI, H. SJÖSTRÖM, O. NOREN et H. LAUDE. 1994. Further characterization of aminopeptidase-N as a receptor for coronaviruses. Adv. Exp. Med. Biol. <u>342</u>: 293-298.

DELMAS, B., J. GELFI, R. L'HARIDON, L. K. VOGEL, H. SJÖSTRÖM, O. NORÉN et H. LAUDE. 1992. Aminopeptidase N is a major receptor for the enteropathogenic coronavirus TGEV. Nature <u>357</u>: 417-419.

DENISON, M. R., P. W. ZOLTICK, J. L. LEIBOWITZ, C. J. PACHUK et S. R. WEISS. 1991. Identification of polypeptides encoded in open reading frame 1b of the putative polymerase gene of the murine coronavirus mouse hepatitis virus A59. J. Virol. <u>65</u>: 3076-3082.

DEREGT, D., M. SABARA et L. A. BABIUK. 1987. Structural proteins of bovine coronavirus and their intracellular processing. J. Gen. Virol. <u>68</u>: 2863-2877.

DUPLAY, P., H. BEDOUELLE, A. FOWLER, I. ZABIN, W. SAURIN et M. HOFNUNG. 1984. Sequences of the *mal*E gene and of its product, the maltosebinding protein of *Escherichia coli* K12. J. Biol. Chem. <u>259</u>: 10606-10613.

DVEKSLER, G. S., C. W. DIEFFENBACH, C. B. CARDELLICHIO, K. McCUAIG, M. N. PENSIERO, G. S. JIANG, N. BEAUCHEMIN et K. V. HOLMES. 1993. Several members of the mouse carcinoembryonic antigen-related glycoprotein family are functional receptors for the coronavirus mouse hepatitis virus-A59. J. Virol. <u>67</u>: 1-8.

DVEKSLER, G. S., M. N. PENSIERO, C. B. CARDELLICHIO, R. K. WILLIAMS, G. S. JIANG, K. V. HOLMES et C. W. DIEFFENBACH. 1991. Cloning of the mouse hepatitis virus (MHV) receptor: expression in human and hamster cell lines confers susceptibility to MHV. J. Virol. <u>65</u>: 6881-6891.

EBNER, D., T. RAABE et S. G. SIDDELL. 1988. Identification of the coronavirus MHV-JHM mRNA 4 product. J. Gen. Virol. <u>69</u>: 1041-1050.

FRANA, M. F., J. N. BEHNKE, L. S. STURMAN et K. V. HOLMES. 1985. Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus: host-dependent differences in proteolytic cleavage and cell fusion. J. Virol. <u>56</u>: 912-920.

GARWES, D. J., F. STEWART et P. BRITTON. 1989. The polypeptide of M_r 14 000 of porcine transmissible gastroenteritis virus: gene assignment and intracellular location. J. Gen. Virol. <u>70</u>: 2495-2499.

GERNA, G., P. M. CEREDA, M. G. REVELLO, E. CATTANEO, M. BATTAGLIA et M. T. GERNA. 1981. Antigenic and biological relationships between human coronavirus OC43 and neonatal calf diarrhoea coronavirus. J. Gen. Virol. <u>54</u>: 91-102.

GODET, M., R. L'HARIDON, J. F. VAUTHEROT et H. LAUDE. 1992. TGEV coronavirus ORF4 encodes a membrane protein that is incorporated into virions. Virology <u>188</u>: 666-675.

GORBALENYA, A. E., E. V. KOONIN, A. P. DONCHENKO et V. M. BLINOV. 1989. Coronavirus genome: prediction of putative functional domains in the nonstructural polyprotein by comparative amino acid sequence analysis. Nucleic Acids Res. <u>17</u>: 4847-4861.

HAMRE, D. et J. J. PROCKNOW. 1966. A new virus isolated from the human respiratory tract. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. <u>121</u>: 190-193.

HEROLD, J., T. RAABE, B. SCHELLE-PRINZ et S. G. SIDDELL. 1993. Nucleotide sequence of the human coronavirus 229E RNA polymerase locus. Virology <u>195</u>: 680-691.
HERRLER, G., S. SZEPANSKI et B. SCHULTZE. 1991. 9-O-acetylated sialic acid, a receptor determinant for influenza C virus and coronavirus. Behring Inst. Mitt. <u>89</u>: 177-184.

HOFSTAD, M. S. 1956. Stability of avian infectious bronchitis virus at 56 °C. Cornell Vet. <u>46</u>: 122-128.

HOGUE, B. G. et D. A. BRIAN. 1986. Structural proteins of human respiratory coronavirus OC43. Virus Res. <u>5</u>: 131-144.

HOGUE, B. G., B. KING et D. A. BRIAN. 1984. Antigenic relationships among proteins of bovine coronavirus, human respiratory coronavirus OC43, and mouse hepatitis coronavirus A59. J. Virol. <u>51</u>: 384-388.

HOLMES, D. S. et M. QUIGLEY. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal. Biochem. <u>114</u>:193-197.

HOLMES, K. V. 1990. Coronavirus and their replication. Fields Virology par B. N. FIELDS, D. M. KNIPE *et al.*, Raven Press 2^{ième} Ed. New York. 841-856.

HOLMES, K. V., E. W. DOLLER et J. N. BEHNKE. 1981. Analysis of the functions of coronavirus glycoproteins by differential inhibition of synthesis with tunicamycin. Adv. Exp. Med. Biol. <u>142</u>: 133-142.

HOLMES, K. V., M. F. FRANA, S. G. ROBBINS et L. S. STURMAN. 1984. Coronavirus maturation. Adv. Exp. Med. Biol. <u>173</u>: 37-52.

HORZINEK, M. C., H. LUTZ et N. C. PEDERSEN. 1982. Antigenic relationships among homologous structural polypeptides of porcine, feline, and canine coronaviruses. Infect. Immun. <u>37</u>: 1148-1155.

JACOBS, L., W. J. M. SPAAN, M. C. HORZINEK et B. A. M. VAN DER ZEIJST. 1981. Synthesis of subgenomic mRNA's of mouse hepatitis virus is initiated independently: evidence from UV transcription mapping. J. Virol. <u>39</u>: 401-406. JOUVENNE, P., C. D. RICHARDSON, S. S. SCHREIBER, M. M. C. LAI et P. J. TALBOT. 1990. Sequence analysis of the membrane protein gene of human coronavirus 229E. Virology <u>174</u>: 608-612.

JOUVENNE, P., S. MOUNIR, J. N. STEWART, C. D. RICHARDSON et P. J. TALBOT. 1992. Sequence analysis of human coronavirus 229E mRNAs 4 and 5: evidence for polymorphism and homology with myelin basic protein. Virus Res. <u>22</u>: 125-141.

KAMAHORA, T., L. H. SOE et M. M. C. LAI. 1989. Sequence analysis of nucleocapsid gene and leader RNA of human coronavirus OC43. Virus Res. <u>12</u>: 1-9.

KAPKE, P. A. et D. A. BRIAN. 1986. Sequence analysis of the porcine transmissible gastroenteritis coronavirus nucleocapsid protein gene. Virology <u>151</u>: 41-49.

KAYE H. S., J. C. HIERHOLZER et W. R. DOWDLE. 1970. Purification and further characterization of an "IBV-like" virus (coronavirus). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. <u>135</u>: 457-463.

KECK, J. G., S. A. STOHLMAN, L. H. SOE, S. MAKINO et M. M. C. LAI. 1987. Multiple recombination sites at the 5'-end of murine coronavirus RNA. Virology <u>156</u>: 331-341.

KELLERMANN, O. K. et T. FERENCI. 1982. Maltose-binding protein from *Escherichia coli*. Methods Enzymol. <u>90</u>: 459-463.

KENDALL, E. J. C., M. L. BYNOE et D. A. J. TYRRELL. 1962. Virus isolations from common colds occurring in a residential school. Brit. Med. J. <u>2</u>: 82-86.

KOZAK, M. 1991. An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. J. Cell Biol. <u>115</u>: 887-903.

KYTE, J. et R. F. DOOLITTLE. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J. Mol. Biol. <u>157</u>: 105-132.

LAI, M. M. C., C. D. PATTON et S. A. STOHLMAN. 1982. Replication of mouse hepatitis virus: negative-stranded RNA and replicative form RNA are of genome length. J. Virol. <u>44</u>: 487-492.

LAMARRE, A. et P. J. TALBOT. 1989. Effect of pH and temperature on the infectivity of human coronavirus 229E. Can. J. Microbiol. <u>35</u>:972-974.

LAPPS, W. et D. A. BRIAN. 1985. Oligonucleotide fingerprints of antigenically related bovine coronavirus and human coronavirus OC43. Arch. Virol. <u>86</u>: 101-108.

LAPPS, W., B. G. HOGUE et D. A. BRIAN. 1987. Sequence analysis of the bovine coronavirus nucleocapsid and matrix protein genes. Virology <u>157</u>: 47-57.

LAUDE, H., D. RASSCHAERT et J. C. HUET. 1987. Sequence and N-terminal processing of the transmembrane protein E1 of the coronavirus transmissible gastroenteritis virus. J. Gen. Virol. <u>68</u>: 1687-1693.

LEE, H. J., C. K. SHIEH, A. E. GORBALENYA, E. V. KOONIN, N. LA MONICA, J. TULER, A. BAGDZHADZHYAN et M. M. C. LAI. 1991. The complete sequence (22 kilobases) of murine coronavirus gene 1 encoding the putative proteases and RNA polymerase. Virology <u>180</u>: 567-582.

LEIBOWITZ, J. L., J. R. DEVRIES et M. V. HASPEL. 1982. Genetic analysis of murine hepatitis virus strain JHM. J. Virol. <u>42</u>: 1080-1087.

LEMM, J. A. et C. M. RICE. 1993. Roles of nonstructural polyproteins and cleavage products in regulating Sindbis virus RNA replication and transcription. J. Virol. <u>67</u>: 1916-1926.

LILJESTRÖM, P., S. LUSA, D. HUYLEBROECK et H. GAROFF. 1991. *In vitro* mutagenesis of a full-length cDNA clone of Semliki forest virus: the small 6,000-molecular-weight membrane protein modulates virus release. J. Virol. <u>65</u>: 4107-4113.

LIU, D. X. et S. C. INGLIS. 1991. Association of the infectious bronchitis virus 3c protein with the virion envelope. Virology <u>185</u>: 911-917.

LIU, D. X. et S. C. INGLIS. 1992. Identification of two new polypeptides encoded by mRNA 5 of the coronavirus infectious bronchitis virus. Virology <u>186</u>: 342-347.

LIU, D. X., D. CAVANAGH, P. GREEN et S. C. INGLIS. 1991. A polycistronic mRNA specified by the coronavirus infectious bronchitis virus. Virology <u>184</u>: 531-544.

LUYTJES, W., L. S. STURMAN, P. J. BREDENBEEK, J. CHARITÉ, B. A. M. VAN DER ZEIJST, M. C. HORZINEK et W. J. M. SPAAN. 1987. Primary structure of the glycoprotein E2 of coronavirus MHV-A59 and identification of the trypsin cleavage site. Virology <u>161</u>: 479-487.

LUYTJES, W., P. J. BREDENBEEK, A. F. H. NOTEN, M. C. HORZINEK et W. J. M. SPAAN. 1988. Sequence of mouse hepatitis virus A59 mRNA 2: indications for RNA recombination between coronaviruses and influenza C virus. Virology <u>166</u>: 415-422.

MACNAUGHTON, M. R., H. A. DAVIES et M. V. NERMUT. 1978. Ribonucleoprotein-like structures from coronavirus particles. J. Gen. Virol. <u>39</u>: 545-549.

MACNAUGHTON, M. R., M. H. MADGE et S. E. REED. 1981. Two antigenic groups of human coronaviruses detected by using enzyme-linked immunosorbent assay. Infect. Immun. <u>33</u>: 734-737.

McINTOSH, K. 1974. Coronaviruses: A comparative review. Curr. Top. Microbiol. Immunol. <u>63</u>: 85-129. McINTOSH, K., A. Z. KAPIKIAN, K. A. HARDISON, J. W. HARTLEY et R. M. CHANOCK. 1969. Antigenic relationships among the coronaviruses of man and between human and animal coronaviruses. J. Immunol. <u>102</u>: 1109-1118.

McINTOSH, K., J. H. DEES, W. B. BECKER, A. Z. KAPIKIAN et R. M. CHANOCK. 1967a. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA <u>57</u>: 933-940.

McINTOSH, K., W. B. BECKER et R. M. CHANOCK. 1967b. Growth in sucklingmouse brain of "IBV-like" viruses from patients with upper respiratory tract disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA <u>58</u>: 2268-2273.

MEBUS, C. A., E. L. STAIR, M. B. RHODES et M. J. TWIEHAUS. 1973. Neonatal calf diarrhea: propagation, attenuation, and characteristics of a coronavirus-like agent. Amer. J. Vet. Res. <u>34</u>: 145-150.

MORTENSEN, M. L., C. G. RAY, C. M. PAYNE, A. D. FRIEDMAN, L. L. MINNICH et C. ROUSSEAU. 1985. Coronaviruslike particles in human gastrointestinal disease. Amer. J. Dis. Child. <u>139</u>: 928-934.

MOUNIR, S. et P. J. TALBOT. 1992. Sequence analysis of the membrane protein gene of human coronavirus OC43 and evidence for *O*-glycosylation. J. Gen. Virol. <u>73</u>: 2731-2736.

MOUNIR, S. et P. J. TALBOT. 1993a. Human coronavirus OC43 RNA 4 lacks two open reading frames located downstream of the S gene of bovine coronavirus. Virology <u>192</u>: 355-360.

MOUNIR, S. et P. J. TALBOT. 1993b. Molecular characterization of the S ptotein gene of human coronavirus OC43. J. Gen. Virol. <u>74</u>: 1981-1987.

MOUNIR, S., P. LABONTÉ et P. J. TALBOT. 1994. Characterization of the nonstructural and spike proteins of the human respiratory coronavirus OC43: comparison with bovine enteric coronavirus. Adv. Exp. Med. Biol. <u>342</u>: 61-67.

135

MURRAY, R. S., B. BROWN, D. BRIAN et G. F. CABIRAC. 1992a. Detection of coronavirus RNA and antigen in multiple sclerosis brain. Ann. Neurol. <u>31</u>: 525-533.

MURRAY, R. S., G. Y. CAI, K. HOEL, J. Y. ZHANG, K. F. SOIKE et G. F. CABIRAC. 1992b. Coronavirus infects and causes demyelination in primate central nervous system. Virology <u>188</u>: 274-284.

MURRAY, R. S., G. Y. CAI, K. HOEL, S. JOHNSON et G. F. CABIRAC. 1994. Coronaviruses and multiple sclerosis. Adv. Exp. Med. Biol. <u>342</u>: 353-357.

NIEMANN, H., B. BOSCHEK, D. EVANS, M. ROSING, T. TAMURA et H. D. KLENK. 1982. Post-translational glycosylation of coronavirus glycoprotein E1: inhibition by monensin. EMBO J. <u>1</u>: 1499-1504.

PACHUK, C. J., P. J. BREDENBEEK, P. W. ZOLTICK, W. J. M. SPAAN et S. R. WEISS. 1989. Molecular cloning of the gene encoding the putative polymerase of mouse hepatitis coronavirus strain A59. Virology <u>171</u>: 141-148.

PARKER, J. C., S. S. CROSS et W. P. ROWE. 1970. Rat coronavirus (RCV): A prevalent, naturally occurring pneumotropic virus of rats. Arch. ges. Virusforsch. <u>31</u>: 293-302.

PARKER, M. D., G. J. COX, D. DEREGT, D. R. FITZPATRICK et L. A. BABIUK. 1989. Cloning and *in vitro* expression of the gene for the E3 haemagglutinin glycoprotein of bovine coronavirus. J. Gen. Virol. <u>70</u>: 155-164.

PEDERSEN, N. C., J. WARD et W. L. MENGELING. 1978. Antigenic relationship of the feline infectious peritonitis virus to coronaviruses of other species. Arch. Virol. 58: 45-53.

PENSAERT, M. B., P. DEBOUCK et D. J. REYNOLDS. 1981. An immunoelectron microscopic and immunofluorescent study on the antigenic relationship between the coronavirus-like agent, CV 777, and several coronaviruses. Arch. Virol. <u>68</u>: 45-52.

RAABE, T. et S. SIDDELL. 1989. Nucleotide sequence of the human coronavirus HCV 229E mRNA 4 and mRNA 5 unique regions. Nucleic Acids Res. <u>17</u>: 6387.

RAABE, T., B. SCHELLE-PRINZ et S. G. SIDDELL. 1990. Nucleotide sequence of the gene encoding the spike glycoprotein of human coronavirus HCV 229E. J. Gen. Virol. <u>71</u>: 1065-1073.

RESTA, S., J. P. LUBY, C. R. ROSENFELD et J. D. SIEGEL. 1985. Isolation and propagation of a human enteric coronavirus. Science <u>229</u>: 978-981.

REYNOLDS, D. J., T. G. DEBNEY, G. A. HALL, L. H. THOMAS et K. R. PARSONS. 1985. Studies on the relationship between coronaviruses from the intestinal and respiratory tracts of calves. Arch. Virol. <u>85</u>: 71-83.

RISKI, H. et T. HOVI. 1980. Coronavirus infections of man associated with diseases other than the common cold. J. Med. Virol. <u>6</u>: 259-265.

ROTTIER, P. J. M. et J. K. ROSE. 1987. Coronavirus E1 glycoprotein expressed from cloned cDNA localizes in the Golgi region. J. Virol. <u>61</u>: 2042-2045.

ROTTIER, P. J. M., W. J. M. SPAAN, M. C. HORZINEK et B. A. M. VAN DER ZEIJST. 1981. Translation of three mouse hepatitis virus strain A59 subgenomic RNAs in *Xenopus laevis* oocytes. J. Virol. <u>38</u>: 20-26.

ROTTIER, P. J.M., G. W. WELLING, S. WELLING-WESTER, H. G. M. NIESTERS, J. A. LENSTRA et B. A. M. VAN DER ZEIJST. 1986. Predicted membrane topology of the coronavirus protein E1. Biochemistry <u>25</u>: 1335-1339.

SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH et T. MANIATIS. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^{ième} Ed. États-Unis.

SANGER, F., S. NICKLEN et A. R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chainterminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA <u>74</u>: 5463-5467. SAWICKI, D. L. et S. G. SAWICKI. 1993. A second nonstructural protein functions in the regulation of alphavirus negative-strand RNA synthesis. J. Virol. <u>67</u>: 3605-3610.

SAWICKI, D. L., D. B. BARKHIMER, S. G. SAWICKI, C. M. RICE et S. SCHLESINGER. 1993. Temperature sensitive shut-off of alphavirus minus strand RNA synthesis maps to a nonstructural protein, nsP4. Virology <u>174</u>: 43-52.

SAWICKI, S. G. et D. L. SAWICKI. 1990. Coronavirus transcription: subgenomic mouse hepatitis virus replicative intermediates function in RNA synthesis. J. Virol. <u>64</u>: 1050-1056.

SAWICKI, S. G. 1987. Characterization of a small plaque mutant of the A59 strain of mouse hepatitis virus defective in cell fusion. Adv. Exp. Med. Biol. <u>218</u>: 169-174.

SCHAAD, M. C. et R. S. BARIC. 1993. Evidence for new transcriptional units encoded at the 3' end of the mouse hepatitis virus genome. Virology <u>196</u>: 190-198.

SCHAAD, M. C., S. A. STOHLMAN, J. EGBERT, K. LUM, K. FU, T. WEI Jr. et R. S. BARIC. 1990. Genetics of mouse hepatitis virus transcription: identification of cistrons which may function in positive and negative strand RNA synthesis. Virology <u>177</u>: 634-645.

SCHMIDT, O. W. et G. E. KENNY. 1981. Immunogenicity and antigenicity of human coronaviruses 229E and OC43. Infect. Immun. <u>32</u>:1000-1006.

SCHWARZ, B., E. ROUTLEDGE et S. G. SIDDELL. 1990. Murine coronavirus nonstructural protein ns2 is not essential for virus replication in transformed cells. J. Virol. <u>64</u>: 4784-4791.

SENANAYAKE, S. D., M. A. HOFMANN, J. L. MAKI et D. A. BRIAN. 1992. The nucleocapsid protein gene of bovine coronavirus is bicistronic. J. Virol. <u>66</u>: 5277-5283.

SETHNA, P. B., M. A. HOFMANN et D. A. BRIAN. 1991. Minus-strand copies of replicating coronavirus mRNAs contain antileaders. J. Virol. <u>65</u>: 320-325.

SETHNA, P. B., S. L. HUNG et D. A. BRIAN. 1989. Coronavirus subgenomic minusstrand RNAs and the potential for mRNA replicons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA <u>86</u>: 5626-5630.

SHIEH, C. K., H. J. LEE, K. YOKOMORI, N. LA MONICA, S. MAKINO et M. M. C. LAI. 1989. Identification of a new transcriptional initiation site and the corresponding functional gene 2b in the murine coronavirus RNA genome. J. Virol. <u>63</u>: 3729-3736.

SIDDELL, S. G., H. WEGE, A. BARTHEL et V. TER MEULEN. 1980. Coronavirus JHM: cell-free synthesis of structural protein p60. J. Virol. <u>33</u> : 10-17.

SKINNER, M. A. et S. G. SIDDELL. 1983. Coronavirus JHM: nucleotide sequence of the mRNA that encodes nucleocapsid protein. Nucleic Acids Res. <u>11</u>: 5045-5054.

SKINNER, M. A. et S. G. SIDDELL. 1985. Coding sequence of coronavirus MHV-JHM mRNA 4. J. Gen. Virol. <u>66</u>: 593-596.

SKINNER, M. A., D. EBNER et S. G. SIDDELL. 1985. Coronavirus MHV-JHM mRNA 5 has a sequence arrangement which potentially allows translation of a second, downstream open reading frame. J. Gen. Virol. <u>66</u>: 581-592.

SMITH, A. R., M. E. G. BOURSNELL, M. M. BINNS, T. D. K. BROWN et S. C. INGLIS. 1990. Identification of a new membrane-associated polypeptide specified by the coronavirus infectious bronchitis virus. J. Gen. Virol. <u>71</u>: 3-11.

STERN, D. F. et B. M. SEFTON. 1982. Coronavirus proteins: structure and function of the oligosaccharides of the avian infectious bronchitis virus glycoproteins. J. Virol. <u>44</u>: 804-812.

STEWART, J. N., S. MOUNIR et P. J. TALBOT. 1992. Human coronavirus gene expression in the brains of multiple sclerosis patients. Virology <u>191</u>: 502-505.

STOHLMAN, S. A. et M. M. C. LAI. 1979. Phosphoproteins of murine hepatitis viruses. J. Virol. <u>32</u>: 672-675.

STOHLMAN, S. A., R. S. BARIC, G. N. NELSON, L. H. SOE, L. M. WELTER et R. J. DEANS. 1988. Specific interaction between coronavirus leader RNA and nucleocapsid protein. J. Virol. <u>62</u>: 4288-4295.

STORZ, J. et R. ROTT. 1981. Reactivity of antibodies in human serum with antigens of an enteropathogenic bovine coronavirus. Med. Micro. Immunol. <u>169</u>: 169-178.

STURMAN, L. S. et K. V. HOLMES. 1977. Characterization of a coronavirus. II. Glycoproteins of the viral envelope: tryptic peptide analysis. Virology <u>77</u>: 650-660.

STURMAN, L. S. et K. V. HOLMES. 1983. The molecular biology of coronaviruses. Adv. Virus Res. <u>28</u>: 35-112.

STURMAN, L. S., C. S. RICARD et K. V. HOLMES. 1985. Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus: activation of cell-fusing activity of virions by trypsin and separation of two different 90K cleavage fragments. J. Virol. <u>56</u>: 904-911.

STURMAN, L. S., K. V. HOLMES et J. BEHNKE. 1980. Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. J. Virol. <u>33</u>: 449-462.

SUGRUE, R. J. et A. J. HAY. 1991. Structural characteristics of the M₂ protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel. Virology. <u>180</u>: 617-624.

TALBOT, P. J. 1995. Implication des virus dans la sclérose en plaques. Médecine/Sciences. Sous presse. TALBOT, P. J. et P. JOUVENNE. 1992. Le potentiel neurotrope des coronavirus. Médecine/Sciences <u>8</u>: 119-125.

TALBOT, P. J., S. ÉKANDÉ, N. R. CASHMAN, S. MOUNIR et J. N. STEWART. 1994. Neurotropism of human coronavirus 229E. Adv. Exp. Med. Biol. <u>342</u>: 339-346.

TANAKA, R., Y. IWASAKI et H. KOPROWSKI. 1976. Intracisternal virus-like particles in brain of a multiple sclerosis patient. J. Neurol. Sci. <u>28</u>: 121-126.

TOMEI, L., C. FAILLA, E. SANTOLINI, R. DE FRANCESCO et N. LA MONICA. 1993. NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein. J. Virol. <u>67</u>: 4017-4026.

TOMPKINS, W. A. F., A. M. WATRACH, J. D. SCHMALE, R. M. SCHULTZ et J. A. HARRIS. 1974. Cultural and antigenic properties of newly established cell strains derived from adenocarcinomas of the human colon and rectum. J. Natl. Cancer Inst. 52: 1101-1106.

TOOZE, J., S. TOOZE et G. WARREN. 1984. Replication of coronavirus MHV-A59 in Sac(-) cells: determination of the first site of budding of progeny virions. Eur. J. Cell Biol. <u>33</u>:281-293.

TUNG, F. Y. T., S. ABRAHAM, M. SETHNA, S. L. HUNG, P. SETHNA, B. G. HOGUE et D. A. BRIAN. 1992. The 9-kDa hydrophobic protein encoded at the 3' end of the porcine transmissible gastroenteritis coronavirus genome is membrane-associated. Virology <u>186</u>: 676-683.

TYRRELL, D. A. J. et M. L. BYNOE. 1965. Cultivation of a novel type of commoncold virus in organ cultures. Brit. Med. J. <u>5</u>: 1467-1470.

TYRRELL, D. A. J., J. D. ALMEIDA, C. H. CUNNINGHAM, W. R. DOWDLE, M. S. HOFSTAD, K. McINTOSH, M. TAJIMA, L. Ya. ZAKSTELSKAYA, B. C. EASTERDAY, A. KAPIKIAN et R. W. BINGHAM. 1975. *Coronaviridae*. Intervirol. <u>5</u>: 76-82.

VLASAK, R., W. LUYTJES, J. LEIDER, W. SPAAN et P. PALESE. 1988a. The E3 protein of bovine coronavirus is a receptor-destroying enzyme with acetylesterase activity. J. Virol. <u>62</u>: 4686-4690.

VLASAK, R., W. LUYTJES, W. SPAAN et P. PALESE. 1988b. Human and bovine coronaviruses recognize sialic acid-containing receptors similar to those of influenza C viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA <u>85</u>: 4526-4529.

WARRENER, P., J. K. TAMURA et M. S. COLLETT. 1993. RNA-stimulated NTPase activity associated with yellow fever virus ns3 protein expressed in bacteria. J. Virol. <u>67</u>: 989-996.

WEISS, S. R., P. W. ZOLTICK et J. L. LEIBOWITZ. 1993. The ns4 gene of mouse hepatitis virus (MHV), strain A59 contains two ORFs and thus differs from ns4 of the JHM and S strains. Arch. Virol. <u>129</u>: 301-309.

WESLEY, R. D., A. K. CHEUNG, D. D. MICHAEL et R. D. WOODS. 1989. Nucleotide sequence of coronavirus TGEV genomic RNA: evidence for 3 mRNA species between the peplomer and matrix protein genes. Virus Res. <u>13</u>: 87-100.

WILLIAMS, R. K., G. S. JIANG et K. V. HOLMES. 1991. Receptor for mouse hepatitis virus is a member of the carcinoembryonic antigen family of glycoproteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA <u>88</u>: 5533-5536.

YALING, Z., J. EDERVEEN, H. EGBERINK, M. PENSAERT et M. C. HORZINEK. 1988. Porcine epidemic diarrhea virus (CV 777) and feline infectious peritonitis virus (FIPV) are antigenically related. Arch. Virol. <u>102</u>: 63-71.

YEAGER, C. L., R. A. ASHMUN, R. K. WILLIAMS, C. B. CARDELLICHIO, L. H. SHAPIRO, A. T. LOOK et K. V. HOLMES. 1992. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. Nature <u>357</u>: 420-422.

YOKOMORI, K. et M. M. C. LAI. 1991. Mouse hepatitis virus S RNA sequence reveals that nonstructural proteins ns4 and ns5a are not essential for murine coronavirus replication. J. Virol. <u>65</u>: 5605-5608.

YOKOMORI, K. et M. M. C. LAI. 1992. Mouse hepatitis virus utilizes two carcinoembryonic antigens as alternative receptors. J. Virol. <u>66</u>: 6194-6199.

YOKOMORI, K., L. R. BANNER et M. M. C. LAI. 1992. Coronavirus mRNA transcription: UV light transcriptional mapping studies suggest an early requirement for a genomic-length template. J. Virol. <u>66</u>: 4671-4678.

ZHANG, X., K. G. KOUSOULAS et J. STORZ. 1992. The hemagglutinin/esterase gene of human coronavirus strain OC43: phylogenetic relationships to bovine and murine coronaviruses and influenza C virus. Virology <u>186</u>: 318-323.

ZHAO, X., K. SHAW et D. CAVANAGH. 1993. Presence of subgenomic mRNAs in virions of coronavirus IBV. Virology <u>196</u>: 172-178.

ZOLTICK, P. W., J. L. LEIBOWITZ, E. L. OLESZAK et S. R. WEISS. 1990. Mouse hepatitis virus ORF 2a is expressed in the cytosol of infected mouse fibroblasts. Virology <u>174</u>: 605-607.

REMERCIEMENTS

Premièrement, je tiens à remercier ma femme Nathalie pour le bonheur qu'elle m'apporte et sa conpréhension lors de toutes ces soirées qu'elle a passé seule à la maison.

Je dois remercier ma Mère pour l'intérêt qu'elle porte à l'éducation et qu'elle a su me transmettre.

Je remercie mon directeur de maîtrise, le Dr. Pierre Talbot pour son ouverture d'esprit, ses conseils, son accessibilité et ses bières importées.

Je remercie mon co-directeur de maîtrise, le Dr. Samir Mounir pour son encadrement et ses encouragements répétés.

Finalement, je tiens à remercier tous les étudiants du laboratoire ainsi que la technicienne Francine Lambert pour leur support tant technique que moral.

COMMUNICATIONS

MOUNIR, S., P. LABONTÉ et P. J. TALBOT. Characterization of the nonstructural and spike proteins of the human respiratory coronavirus OC43: comparison with bovine enteric coronavirus. V^e Symposium des coronavirus. 13-18 sept. 1992. Chantilly. France.

LABONTÉ, P., S. MOUNIR et P. J. TALBOT. Caractérisation de la protéine ns2 du coronavirus humain OC43. 61^e congrès de l'ACFAS. 17-21 mai. 1993. Rimouski. Canada.

MOUNIR, S., P. LABONTÉ et P. J. TALBOT. Characterization of the ns2 protein gene of human coronavirus OC43. Congrès annuel de la Société Canadienne de Microbiologie (CSM). 1-6 août. 1993. Toronto. Canada.