

DORS

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

Campus Laval

**DIFFÉRENCIATION GÉNOMIQUE DES CORONAVIRUS
HÉMAGGLUTINANTS ET TOPOGRAPHIE DES DÉTERMINANTS
ANTIGÉNIQUES DE LA GLYCOPROTÉINE S DU VIRUS
HÉMAGGLUTINANT DE L'ENCÉPHALOMYÉLITE PORCINE.**

Par
Martine Boutin

Mémoire (par article) présenté
pour l'obtention
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en Virologie et en Immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur interne

Dr. Charles Dozois, PhD
Campus Laval

Examineur externe

Dr. Daniel Martineau, DMV, PhD
Département de pathologie et de
microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire
Université de Montréal

Directeur de recherche

Dr. Serge Dea, DMV, PhD
Campus Laval

Dédicace

À mes parents Guy et Justine,
qui ont toujours été fiers de moi.

Au Dr. Serge Dea,
qui m'a cru en mes capacités.

À Nicole Sawyer,
qui m'a appris à être fière de moi et d'avoir confiance en mes capacités.

Merci de tout mon cœur!

Sommaire

Le virus hémagglutinant de l'encéphalomyélite porcine (HEV) est un virus qui cause une infection endémique dans l'industrie porcine. En 1998 et 1999, le HEV a causé des problèmes dans des fermes porcines du Québec et de l'Ontario. Une souche virale a été isolée et nous avons cherché à comprendre les raisons de la réémergence de la maladie en étudiant les différences entre cette souche (IAF-404) et celle du prototype de référence (HEV67N), de même que les différences et/ou les similitudes entre les souches de HEV et celles d'autres coronavirus dont le Coronavirus bovin et le Coronavirus humain HCoV-OC43, tous deux antigéniquement associés au HEV.

Ce projet visait le séquençage de l'ORF 3 codant pour la glycoprotéine de surface (S) du HEV et la production d'anticorps monoclonaux (AcMo) dirigés contre cette protéine afin d'obtenir les outils nécessaires à une meilleure compréhension d'un virus peu étudié. Le second aspect de ce projet était de mettre au point un test diagnostique différentiel pour les Coronavirus bovins, porcins et humains.

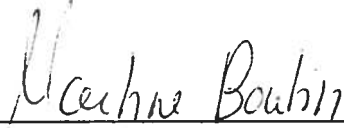
Le séquençage de l'ORF 3 s'insérait dans le projet du séquençage de l'extrémité 3' du génome, codant pour les protéines structurales, des souches HEV 67N et IAF-404. La séquence nucléotidique de l'ADNc de l'ORF3 fut déterminée par la technique de déplacement progressif sur le génome en utilisant des amorces oligonucléotidiques déduites de régions conservées chez les isolats de BCoV. Les séquences de la souche de référence HEV67N et celles d'un isolat clinique HEV IAF-404 ont été comparées aux séquences connues des virus BCoV et de HCoV-OC43. Le séquençage a mis en lumière, entre autres, que la glycoprotéine S a le plus faible pourcentage de similitude entre les souches de HEV, mais aussi avec les autres Coronavirus à l'étude et a confirmé que tout comme pour le HCoV-OC43, il y avait délétion d'une partie de l'ORF 4, codant chez les isolats de BCoV pour une protéine non-structurale de 4.9 kDa.

Les informations obtenues du séquençage ont permis la conception d'un Multiplex RT-PCR composé de trois paires d'amorces différentes. Une paire d'amorces vise

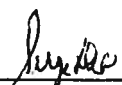
l'amplification spécifique d'un fragment de 200 pb dans l'ORF 4 des BCoV respiratoires et entériques. Une autre, permet l'amplification d'un fragment de 684 pb, dans la portion S1 de l'ORF 3, spécifique aux isolats de HEV. Ces deux paires d'amorces s'ajoutent à l'utilisation déjà connue d'une paire d'amorces pour l'amplification d'un fragment de 406 pb dans le gène de la Nucléocapside. Ce gène est hautement conservé chez les Coronavirus à l'étude et permet donc une amplification dite spécifique de groupe.

Finalement, des hybridomes producteurs d'AcMo dirigés contre la glycoprotéine S ont été obtenus. Des tests d'isotypage, d'ELISA, d'immunobuvardage de type western, d'immunofluorescence indirecte, d'inhibition de l'hémagglutination et de séroneutralisation ont été effectués pour permettre la caractérisation de ces AcMo.


Les informations scientifiques apportées par ce projet sont intéressantes et constituent une base pour des études plus approfondies en utilisant le multiplex RT-PCR et les AcMo comme outils afin d'établir la topographie des épitopes spécifiques au HEV et des régions de la protéine impliquées dans le tropisme d'espèce et les recombinaisons génétiques inter-espèces.



Martine Boutin



Serge Dea



Charles Dozois
(Président de jury)

Table des Matières

Page titre	i
Dédicace	ii
Sommaire	iii
Table des matières	v
Liste des abréviations	vii
Listes des schémas, figures et tableaux	x
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
REVUE DE LITTÉRATURE	4
1. Ordre des Nidovirales	5
2. Genre Coronavirus	5
2.1 Historique	5
2.2 Classification	6
3. Structure des coronavirus	6
3.1 Morphologie	6
3.2 Propriétés physico-chimiques	7
3.3 Génome viral	8
3.4 Protéines structurales	8
3.4.1 La nucléocapside (N)	8
3.4.2 La protéine de la matrice (M)	9
3.4.3 La petite protéine de l'enveloppe (E)	11
3.4.4 La glycoprotéine de surface (S)	11
3.4.5 La protéine de l'Hémagglutinine Estérase (HE)	14
3.5 Protéines non-structurales (ns)	15
4. Réplication Virale	16
4.1 Attachement et pénétration	17
4.2 Transcription et réplication virale	18
4.3 Assemblage des virions	20
4.4 Bourgeonnement	21
5. Le Virus Hémagglutinant de l'Encéphalomyélite Porcine (HEV)	21
5.1 Généralités	21

5.2 Manifestations cliniques	22
5.2.1 la maladie du vomissement et du dépérissement	22
5.2.2 l'encéphalomyélite	22
5.3 Pathogénie	23
5.4 Lésions macroscopiques et microscopiques causées par le HEV	24
MATÉRIELS, MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS	30
<u>Sequence of the 3'-terminal end (8.1 kb) of the genome of porcine haemagglutinating encephalomyelitis virus: comparison with other haemagglutinating coronaviruses</u>	
Attestation de la contribution des auteurs	32
Résumé en français	33
Article	34
<u>Single and multiplex RT-PCR for the detection and identification of hemagglutinating coronaviruses</u>	
Accusé de réception	41
Attestation de la contribution des auteurs	42
Résumé en français	43
Article	44
<u>Characterization of a Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus Field Strain Associated with Acute Outbreaks of a Wasting Syndrome and Encephalitis in a Confined Quebec Pig Farm</u>	
Accusé de réception	69
Attestation de la contribution des auteurs	70
Résumé en français	72
Article	73
DISCUSSION GÉNÉRALE	104
REMERCIEMENTS	111
BIBLIOGRAPHIE	113
APPENDICE A:	
<u>Bovine coronaviruses associated with enteric and respiratory diseases in Canadian dairy cattle display different reactivities to anti-HE monoclonal antibodies and distinct amino acid changes in their HE, S and ns4.9 protein</u>	142
APPENDICE B : Liste des présentations et séances d'affiche	158
APPENDICE C : Confirmation de la spécificité des amorces du multiplex RT-PCR.	160

Liste des abréviations

A	: Adénosine
a.a.	: acide aminé
Ac	: anticorps
AcMo(Mabs)	: anticorps monoclonaux
ADN(DNA)	: acide désoxyribonucléique
ADNc(cDNA)	: ADN complémentaire
AE	: activité acétyl-estérase
ARN(RNA)	: acide ribonucléique
ARNm(m RNA)	: ARN messagers
ATCC	: «American Type Culture Collection»
BCoV	: coronavirus bovin
BRCoV	: coronavirus respiratoire bovin
BVD-MD	: virus de la diarrhée virale bovine
CCoV	: coronavirus canin
cm	: centimètre
Da	: Daltons
ddH ₂ O	: H ₂ O bidistillée
DEPC	: diéthylpyrocarbonate
DMEM	: «Dulbecco's Modified Eagle Medium»
E	: petite protéine de l'enveloppe
EBCoV	: coronavirus bovin entérique
ECP	: effet cytopathique
ELISA	: «Enzyme-Linked Immunosorbant Assay»
EM	: microscopie électronique
FeCoV	: coronavirus entérique félin
FIPV	: virus de la péritonite infectieuse féline
g	: gramme
HA	: hémagglutination

HE	: glycoprotéine hémagglutinine-estérase
HEV	: coronavirus hémagglutinant de l'encéphalomyélite porcine
HCV-229E	: coronavirus respiratoire humain (souche 229E)
HCV-OC43	: coronavirus respiratoire humain (souche OC43)
HRT-18	: cellules d'un adénocarcinome intestinal humain
HRT-18G	: cellules d'un adénocarcinome intestinal humain (clone G)
I	: protéine I contenue dans le gène N
IBV	: virus de la bronchite infectieuse aviaire
IF	: immunofluorescence
IFI(IIF)	: immunofluorescence indirecte
Ig	: Immunoglobuline
IHA(HI)	: inhibition de l'hémagglutination
kb	: kilobases
kDa	: kilodaltons
M	: glycoprotéine de la matrice
MHV	: virus de l'hépatite murine
min	: minute
ml	: millilitres
mM	: millimolaire
μl	: microlitre
N	: phosphoprotéine de la nucléocapside
nm	: nanomètre
ns	: non-structural (gène ou protéine)
nt	: nucléotides
ORF	: cadre de lecture ouvert
pb(bp)	: paire de bases
PBS	: solution saline phosphatée
PCR	: réaction de la polymérase en chaîne
PCV2	: circovirus porcin de type 2
pH	: potentiel d'hydrogène
POL	: polymérase ici ARN polymérase ARN dépendante

PRCoV	: coronavirus respiratoire porcin
PRRSV	: virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin
RBCoV	: coronavirus bovin respiratoire
RbCoV	: coronavirus du lapin
RbECoV	: coronavirus entérique du lapin
RDE	: activité destructrice de récepteurs
RE	: réticulum endoplasmique
RT	: transcriptase inverse
S	: glycoprotéine de surface
SDS	: sodium dodécylsulfate
SDS-PAGE	: électrophorèse en gel d'acrylamide en présence de SDS
Sec	: seconde
SFB	: Sérum fœtal bovin
SI	: séquence intergénique
SN(VN)	: séroneutralisation
SNC(CNS)	: système nerveux central
TBS	: tampon Tris-NaCl
TCID ₅₀	: dose infectieuse produisant un ECP dans 50% des cellules.
TCoV	: coronavirus de l'entérite transmissible des dindes
TGEV	: virus porcin de la gastroentérite transmissible
U	: unité
WD	: dysenterie d'hiver

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les coronavirus du sous-groupe II sont responsables de maladies occasionnant des pertes économiques importantes pour l'industrie de l'élevage des animaux de la ferme. Le coronavirus bovin (BCoV) est associé à des problèmes respiratoires, ainsi qu'à des entérites dont la diarrhée néonatale du veau et la dysenterie d'hiver des adultes. Chez le porc, le virus hémagglutinant de l'encéphalomyélite porcine (HEV) est associé à des problèmes de dépérissement et des problèmes neurologiques. Ce coronavirus porcine a un tropisme respiratoire et est antigéniquement associé au coronavirus respiratoire humain HCoV-OC43. Ce dernier a aussi été retrouvé dans les spécimens de cerveau d'individus atteints de maladies neurologiques dégénératives. Ces virus utilisent un mode de réplication favorisant le phénomène de recombinaison génétique, et démontrent des hauts pourcentages d'homologie au niveau des séquences nucléotidiques de leurs différents gènes.

Nous avons choisi d'étudier le HEV suite à l'obtention, en l'an 2000, d'un isolat clinique provenant du cerveau d'un porcelet mort d'une encéphalite aiguë. La réapparition de cette maladie était aussi inquiétante qu'inattendue puisque les porcelets sont généralement protégés par les anticorps maternels présents dans le colostrum.

Notre hypothèse est qu'un nombre restreint d'acides aminés seraient impliqués dans le tropisme et que des mutations spontanées de même que des recombinaisons génétiques pourraient modifier de façon importante le tropisme cellulaire et/ou d'espèce d'une souche. Il est donc important de se doter d'outils pour pouvoir comprendre ces phénomènes.

Le but de ce projet était de permettre la différenciation génomique des coronavirus hémagglutinants et de faire la topographie des déterminants antigéniques de la glycoprotéine S du virus HEV porcine. Pour ce faire, le projet de recherche avait pour objectifs 1) le séquençage de l'ORF codant pour la glycoprotéine S du HEV porcine; 2) le développement d'un test diagnostique moléculaire pour la détection et la différenciation des coronavirus hémagglutinants; 3) la production d'anticorps monoclonaux (AcMo) dirigés contre des épitopes spécifiques de la glycoprotéine de surface du virus HEV.

La première partie de cet ouvrage présente une revue de littérature sur la structure et la réplication virale des Coronavirus en général et sur le Virus Hémagglutinant de l'Encéphalomyélite Porcine (HEV).

Les résultats obtenus au cours de ce projet sont présentés en seconde partie de ce mémoire dans trois articles scientifiques différents. Une attestation de la contribution des auteurs de même qu'un résumé en français complètent la présentation de chaque article.

Finalement, en annexe de ce mémoire se trouve un quatrième article, publié dans *Virus Research* en 2001. Afin de permettre la publication de cet article, les séquences des ORF codant pour les glycoprotéines HE et S de l'isolat RBCoV 3994 ont été complétées et elles ont été effectuées en supplément de ce projet de maîtrise.

REVUE DE LITTÉRA TURE

1. Ordre Nidovirales

L'ordre *Nidovirales* a été créé en 1996 pour regrouper les virus de la famille *Arteriviridae* et ceux de la famille *Coronaviridae* comprenant les genres Coronavirus et Torovirus (Pringle, C. R., 1996). Ces virus sont réunis dans cet ordre puisqu'ils ont tous pour génome un brin monocaténaire d'acide ribonucléique (ARN), linéaire et non segmenté. L'ARN viral est dit de polarité positive puisqu'il peut être traduit directement comme un ARN messager (ARNm).

Pour tous les virus de cet ordre, le gène codant pour la polymérase est localisé dans la première partie du génome (partie 5') alors que les gènes des protéines structurales et non structurales sont situés en aval de celui-ci (en 3'). Le nom que porte l'ordre vient du latin "nidus" qui veut dire nid. Cette image fait référence au réseau de molécules d'ARN sous génomiques qui est produit par ces virus lors de leur réplication. Tous les ARN sous génomiques partagent la même extrémité 3'. Ils sont polycistroniques, mais seul le cadre de lecture ouvert (ORF) situé en 5' est traduit en protéine. (Rottier, P. J. *et al.*, 1981; Cavanagh, D., 1997).

2. Genre Coronavirus

2.1 Historique

Le premier coronavirus à avoir été découvert est le virus aviaire de la bronchite infectieuse aviaire (IBV) et fut isolé chez le poulet (Beaudette, F. R. et Hudson, C. B., 1937). Il a aussi été le premier à être observé en microscopie électronique. Ce virus enveloppé, entouré de larges spicules doit son nom à son apparence de couronne, du latin corona (Berry, D. M. *et al.*, 1964). Cette caractéristique morphologique des virions, colorés négativement pour leur observation en microscopie électronique, fut longtemps la seule caractéristique considérée pour la taxonomie des virus de ce groupe (Almeida, J. D. *et al.*, 1968; McIntosh, K., 1974). Aujourd'hui, pour les fins de taxonomie de ces virus, on se doit de caractériser son mécanisme de réplication, l'organisation de son génome et de son réseau d'ARNm sous-génomiques, ainsi que l'homologie des séquences

nucléotidiques de même que les caractéristiques de ses protéines structurales (Siddell, S. G. *et al.*, 1983; Sturman, L. S. et Holmes, K. V., 1983; Spaan, W. *et al.*, 1988; Cavanagh, D. *et al.*, 1990; Cavanagh, D. et Horzinek, M. C., 1993)

2.2 Classification

Les coronavirus sont reconnus comme étant responsable de maladies d'ordre respiratoire et entérique chez les humains, les mammifères et les volailles. Les virus du genre coronavirus sont séparés en trois groupes. Ces groupes ont été formés selon les caractéristiques génomiques et sérologiques (Pedersen, N. C. *et al.*, 1978; Horzinek, M. C. *et al.*, 1982; Dea, S. *et al.*, 1990; Spaan, W. J. M. *et al.*, 1990) des membres de ce genre (Siddell, S. G., 1995). Le tableau 1 présente les coronavirus dans leur groupe respectif. Les tests sérologiques qui ont été utilisés pour cette classification sont l'inhibition d'hémagglutination (IHA), la séroneutralisation (SN), l'immunofluorescence (IF) et l'ELISA. Pour l'étude des relations génomiques, en plus de l'analyse de séquence, il y a des tests d'hybridation à l'aide des sondes moléculaires dont celles reconnaissant le gène codant pour la nucléocapside (N) (Shockley, L. J. *et al.*, 1987; Verbeek, A. *et al.*, 1991)

3. Structure des coronavirus

3.1 Morphologie

Les virions des coronavirus, quoique pléomorphes, sont plutôt sphériques à ovales avec un diamètre variant entre 80 et 160 nanomètres (nm). Ce sont des virus enveloppés par une double couche lipidique dérivant de la membrane de la cellule-hôte suite au mécanisme de bourgeonnement (Oshiro, L. S., 1973; Tooze, J. et Tooze, S. A., 1985; Griffiths, G. et Rottier, P., 1992).

À la surface du virion, il y a des projections protéiques qui forment une frange de 10 à 20 nm de longueur (Sturman, L. S. et Holmes, K. V., 1983) caractéristique à tous les coronavirus (figure 1). Cette frange est constituée des péplomères formés de la

trimérisation de la glycoprotéine de surface (S) (Delmas, B. et Laude, H., 1990). Pour certains coronavirus, il y a une double frange exposée à la surface du virion (Bridger, J. C. *et al.*, 1978; Sugiyama, K. et Amano, Y., 1981; King, B. et Brian, D. A., 1982; King, B. *et al.*, 1985; Dea, S. et Garzon, S., 1991). Cette frange supplémentaire correspond aux péplomères de la glycoprotéine de l'hémagglutinine-estérase (HE) spécifique au coronavirus du 2^{ième} groupe antigénique (tableau 1) (Callebaut, P. E. et Pensaert, M. B., 1980; King, B. et Brian, D. A., 1982; Hogue, B. G. *et al.*, 1984; King, B. *et al.*, 1985; Hogue, B. G. et Brian, D. A., 1986; Dea, S. et Tijssen, P., 1988; Dea, S. *et al.*, 1989).

Le virion de tous les coronavirus est composé de trois autres protéines structurales. Deux sont membranaires soient la glycoprotéine de la matrice (M) et la petite protéine de l'enveloppe (E) (Lai, M. M. C. et Holmes, K. V., 2001) et la dernière, la phosphonucléoprotéine (N) associée à l'ARN viral pour former une nucléocapside de symétrie hélicoïdale (Macnaughton, M. R. *et al.*, 1978; Sturman, L. S. *et al.*, 1980). Dernièrement, il a été démontré chez au moins deux coronavirus, le virus de la gastroentérite transmissible du porc (TGEV) et le virus de l'hépatite murine (MHV), qu'il existait une structure protéique supplémentaire formée par la glycoprotéine M et probablement de la N. Cette structure sphérique et probablement icosaédrique, de 65 nm de diamètre, est située à l'intérieure de la membrane et elle entoure la nucléocapside virale (Risco, C. *et al.*, 1996; Risco, C. *et al.*, 1998). (Figure 1)

3.2 Propriétés physico-chimiques

Les virions des coronavirus ont une masse moléculaire estimé à 400×10^6 Da (Siddell, S. G., 1995) et une densité de flottaison variant entre 1,15 à 1,18 g/ml de saccharose et de 1.23 à 1.24 g/cm dans le chlorure de césium (Tyrrell, D. A. J. *et al.*, 1978; Robb, J. A. et Bond, C. W., 1979; Siddell, S. G., 1995). Le virus est généralement stable à des valeurs de pH se situant entre 4 à 10 (Chappuis, G. *et al.*, 1975). Cependant, l'infectivité des virions est optimale lorsque le pH se situe au pourtour de 6.0. Toutefois, le virus est très sensible à un pH alcalin, à la chaleur, aux solvants lipidiques, aux détergents non-ioniques, à la formaldéhyde, aux agents oxydants de même qu'aux

irradiations ultraviolettes (Pensaert, M. B. et Callebaut, P. E., 1974; Sturman, L. S. *et al.*, 1990; Siddell, S. G., 1995).

3.3 Génome viral

Le génome des Coronavirus est le plus long génome viral constitué d'une molécule d'ARN non-segmentée. Sa longueur varie entre 27 et 31 kilobases (kb). Il possède une coiffe méthylée en 5' et il est polyadénylé à son extrémité 3'.

Le génome débute par une séquence dite de tête ("leader") de 65 à 98 nucléotides qui est suivi d'une région non traduite de 200 à 400 nucléotides. Cette région précède les régions codantes du génome consistant en sept à dix cadres de lecture ouverts (ORFs). Chaque ORF code pour une protéine et est séparé par une séquence intergénique (SI) (figure 2). L'ARN génomique se termine par une autre région non traduite de 200 à 500 nucléotides suivie de la queue de polyadénosine dont la longueur est variable.

L'organisation du génome est toujours la même (figure 2). La première région codante représente à elle seule les deux tiers du génome et consiste en deux ORFs (1a et 1b) précurseurs de l'ARN polymérase ARN dépendante (Pol) (Bournsell, M. E. *et al.*, 1987; Spaan, W. *et al.*, 1988; Pachuk, C. J. *et al.*, 1989; Lai, M. M., 1990; Lee, H. J. *et al.*, 1991). Outre les ORFs distincts aux membres d'un certain groupe de coronavirus, les ORFs des protéines structurales communes sont toujours organisés dans le même ordre soit 5'-Pol, S, E, M, N-3'. (Siddell, S., 1983; Spaan, W. *et al.*, 1988; Lai, M. M. C. et Holmes, K. V., 2001)

3.4 Protéines structurales

3.4.1 La protéine de la nucléocapside (N)

C'est une phosphonucléoprotéine d'une masse moléculaire de 50 à 60 kDa. Ce sont les résidus sérine, présents en grand nombre dans la protéine, qui sont phosphorylés par une protéine kinase (Stohlman, S. A. et Lai, M. M., 1979; Siddell, S. G. *et al.*, 1981).

C'est la protéine la plus conservée chez les coronavirus. Le pourcentage d'homologie de la N entre des coronavirus des trois différents groupes est faible; il existe 29% d'homologie entre la séquence de la N du coronavirus bovin (BCoV) avec celle des virus IBV ou TGEV. L'homologie est beaucoup plus élevée entre les séquences de virus du même groupe; il existe 96% d'homologie entre les séquences du coronavirus bovin (BCoV) et le coronavirus humain HCoV-OC43 (Mounir, S. et Talbot, P. J., 1993). Les anticorps dirigés contre la N démontrent une grande réactivité croisée (Horzinek, M. C. *et al.*, 1982; Hogue, B. G. *et al.*, 1984) qui ne se limite pas uniquement aux virus d'un même sous-groupe antigénique (Yassen, S. A. et Johnson-Lussenburg, C. M., 1978).

Le rôle premier de la protéine N, la plus abondante dans les cellules infectées, est d'interagir avec l'ARN viral pour former la nucléocapside (Stohlman, S. A. *et al.*, 1988). Le domaine de liaison à l'ARN, situé au centre de la protéine, est un des trois domaines structuraux conservés de la protéine N (Masters, P. S., 1992). La stabilisation du lien N-ARN serait due à une région de 50 acides aminés (a.a.) située dans la portion aminotermine de la protéine (Ollis, D. L. et White, S. W., 1987; Laude, H. et Masters, P. S., 1995). Un autre rôle de la N serait d'interagir avec la protéine de la matrice lors de la formation du virion (Sturman, L. S. *et al.*, 1980).

La N pourrait être impliquée dans le mécanisme de la réplication virale (Compton, S. R. *et al.*, 1987) et est aussi capable de se lier à des constituants cellulaires comme la membrane cellulaire ou des phospholipides (Anderson, R. et Wong, F., 1993).

3.4.2 La protéine de la matrice (M)

C'est une glycoprotéine dont la masse moléculaire varie entre 20 à 38 kDa. C'est le nombre variable d'acide aminés de la M chez les différents coronavirus, de même que le degré de glycosylation et le type de liaisons existant entre les différents sucres qui sont responsables de la grande variabilité dans la masse moléculaire de la M (Spaan, W. *et al.*, 1988).

Cette protéine traverse à trois reprises la membrane virale et possède un grand domaine carboxy-terminal interne. (Armstrong, J. *et al.*, 1984; Routledge, E. *et al.*, 1991; Locker, J. K. *et al.*, 1992; Machamer, C. E. *et al.*, 1993). Il n'y aurait que 10% de la portion amino-terminale de cette protéine qui serait exposée à la surface du virion (Spaan, W. *et al.*, 1988).

La M est essentielle pour le bourgeonnement des virions (Dubois-Dalcq, M. E. *et al.*, 1982; Tooze, J. *et al.*, 1984) qui peut survenir même en absence de la glycosylation de cette protéine (Niemann, H. *et al.*, 1982; Stern, D. F. et Sefton, B. M., 1982; Laude, H. *et al.*, 1992) et de même qu'en absence de la S et de la HE (Holmes, K. V. *et al.*, 1981; Rottier, P. J. *et al.*, 1981; Dea, S. *et al.*, 1989; Mounir, S. et Talbot, P. J., 1992).

La glycosylation de cette protéine peut s'effectuer de deux différentes façons chez les coronavirus. Il peut s'agir d'une liaison de type "N-glycosidique" où les oligosaccharides s'attachent aux résidus asparagine de la M comme pour les virus IBV, TGEV et le coronavirus des dindes (TCoV) (Deregt, D. et Babiuk, L. A., 1987; Dea, S. et Tijssen, P., 1988), ou d'une liaison de type "O-glycosidique" où les sucres se lient aux résidus sérine et thréonine de la M comme pour le virus de hépatite murine (MHV), le BCoV et le HCoV-OC43 (Niemann, H. *et al.*, 1984; Tooze, S. A. *et al.*, 1988; Rottier, P. J. M., 1995).

La protéine de la matrice est aussi reconnue pour faciliter l'incorporation de la glycoprotéine S à l'enveloppe virale. L'interaction entre ces deux protéines se produit lorsqu'elles sont co-exprimées et se fait par l'intermédiaire de leurs domaines transmembranaires (de Haan, C. A. *et al.*, 1999).

Finalement, malgré la petitesse de sa portion externe, des anticorps monoclonaux (AcMo) dirigés contre la M, peuvent intervenir, en présence du complément, dans le processus de neutralisation du virus (Collins, A. R. *et al.*, 1982; Lecomte, J. *et al.*, 1987; Fleming, J. O. *et al.*, 1989).

3.4.3 La petite protéine de l'enveloppe (E)

Il s'agit d'une protéine membranaire, très hydrophobe, d'une masse moléculaire variant entre 9 à 12 kDa (Cavanagh, D. *et al.*, 1994). La protéine E fut longtemps considérée comme une protéine de nature non structurale avant d'être reconnue comme étant associée à la membrane des virus TGEV, IBV et MHV (Liu, D. X. et Inglis, S. C., 1991; Godet, M. *et al.*, 1992; Yu, X. *et al.*, 1994).

Elle est essentielle, en présence de la M, dans les mécanismes d'assemblage et de bourgeonnement de virions possédant la forme et la grandeur des particules virales nouvellement produites et ce en absence des péplomères (Vennema, H. *et al.*, 1996; Fischer, F. *et al.*, 1998).

La E est la seule protéine des coronavirus, jusqu'à maintenant, à avoir été reconnue pour ses propriétés pro-apoptotiques (An, S. *et al.*, 1999).

3.4.4 La glycoprotéine de surface (S)

Cette glycoprotéine, dont la masse moléculaire varie entre 160 et 220 kDa, compose les spicules visibles en microscopie électronique à la surface de tous les coronavirus (Sturman, L. S. et Holmes, K. V., 1983). C'est une oligomérisation sous la forme de trimère ou de tétramère de la S qui donnerait la structure des péplomères (Delmas, B. et Laude, H., 1990).

C'est une protéine hautement glycosylée et possède entre 21 à 35 sites potentiels de glycosylation (de Groot, R. J. *et al.*, 1987; Luytjes, W. *et al.*, 1987) de type "N" (Holmes, K. V. *et al.*, 1981; Niemann, H. *et al.*, 1982; Deregt, D. et Babiuk, L. A., 1987).

La S possède trois grands domaines structuraux. À partir de l'extrémité amino-terminale, il y a un domaine externe, très impliqué dans les fonctions biologiques de la protéine dont celle de l'attachement aux récepteurs cellulaires (Godet, M. *et al.*, 1994;

Kubo, H. *et al.*, 1994), suivi respectivement d'un domaine transmembranaire, puis d'un court domaine intracytoplasmique dans sa portion carboxy-terminale.

Le domaine externe peut se diviser en deux, soient les portions S1 et S2. La présence d'un site de clivage protéolytique au centre de la glycoprotéine S de plusieurs coronavirus permet cette division en S1 et S2 (Sturman, L. S. *et al.*, 1985). Le clivage, effectué *in vivo* par des protéases cellulaires (Sturman, L. S. *et al.*, 1985) ou *in vitro* par l'addition de trypsine au milieu de culture (Cavanagh, D. *et al.*, 1986; Dea, S. *et al.*, 1989), produit deux sous-unités protéiques d'environ 100 kDa. La S1 correspond à la partie globulaire des spicules (figure 1) située à l'extrémité amino-terminale de la protéine alors que la S2, attachée à la membrane, forme la tige des spicules. Les séquences en a.a. de la S1 sont hautement variables, alors que celles de la S2 sont beaucoup plus conservées parmi les coronavirus des différentes espèces (de Groot, R. J. *et al.*, 1987; Rasschaert, D. et Laude, H., 1987; Schmidt, I. *et al.*, 1987). Cette observation permettrait d'expliquer les rôles attribués à chacune de ces parties.

La S1 est reconnue comme étant responsable du tropisme, de l'attachement aux cellules susceptibles et de l'induction de la réponse immunitaire (Collins, A. R. *et al.*, 1982; Williams, R. K. *et al.*, 1990; Hingley, S. T. *et al.*, 1994; Cavanagh, D., 1995; Suzuki, H. et Taguchi, F., 1996; Sanchez, C. M. *et al.*, 1999). Des mutations dans cette région ont été reconnues comme ayant entraîné des modifications dans le tropisme tissulaire et la spécificité d'hôte (Gallagher, T. M. et Buchmeier, M. J., 2001) de même que dans l'antigénicité et la pathogénicité des différentes souches d'un même virus (Fleming, J. O. *et al.*, 1987; Zhang, X. M. *et al.*, 1991; Fazakerley, J. K. *et al.*, 1992; Hingley, S. T. *et al.*, 1994; Rekik, M. R. et Dea, S., 1994). Dans le cas du virus de la gastroentérite transmissible du porc (TGEV), il a été démontré que le changement de deux acides aminés au niveau de la portion S1 de la S était suffisant pour modifier le tropisme de ce virus (Ballesteros, M. L. *et al.*, 1997). C'est aussi dans cette région que sont répertoriées les mutations les plus importantes responsables des différences antigéniques existant entre les souches d'un même coronavirus ou les différentes espèces de coronavirus (Rekik, M. R. et Dea, S., 1994; Cavanagh, D. *et al.*, 1995). Cependant, les

pourcentages d'homologie en a.a. existant entre les séquences de la S de coronavirus d'un même groupe reste malgré tout élevée (91% entre HCoV-OC43 et BCoV) (Spaan, W. *et al.*, 1988).

La S2, pour sa part, est la portion de la S reconnue pour être responsable de l'activité fusogène du virus (Storz, J. *et al.*, 1981; Sturman, L. S. *et al.*, 1985; Luo, Z. et Weiss, S., 1998). Cependant, cette activité peut être modifiée par des variations de séquences spécifiques présentes autant dans la S2 que dans la S1 (Gallagher, T. M. *et al.*, 1991; Routledge, E. *et al.*, 1991).

La S est très immunogène et est associée à l'induction de la production d'anticorps neutralisants (Collins, A. R. *et al.*, 1982; Deregt, D. et Babiuk, L. A., 1987; Gilmore, W. *et al.*, 1987; Vautherot, J. F. *et al.*, 1990; Hussain, K. A. *et al.*, 1991; Vautherot, J. F. *et al.*, 1992; Michaud, L. et Dea, S., 1993). Des anticorps monoclonaux (AcMo) ont été produits contre la S de différents coronavirus et ont permis de démontrer la présence de différents déterminants antigéniques localisés autant dans la sous-unité S1 que dans la S2 (Laude, H. *et al.*, 1986; Deregt, D. et Babiuk, L. A., 1987; Vautherot, J. F. *et al.*, 1992). Pour les souches de MHV, six épitopes ont été identifiés pour un total de quatre sites antigéniques (A, B, C et D). Deux des quatre sites sont de nature conformationnelle et sont reconnus par les AcMo possédant la plus forte activité neutralisante et dirigés contre la partie S1 (Talbot, P. J. *et al.*, 1984; Wege, H. et Dorries, R., 1984; Talbot, P. J. et Buchmeier, M. J., 1985). Pour le BCoV, quatre domaines antigéniques ont aussi été reconnus sur la glycoprotéine S (Vautherot, J. F. *et al.*, 1992). Les domaines A et B sont situés sur la S1 et les AcMo dirigés contre ces domaines sont eux aussi hautement neutralisants (Deregt, D. et Babiuk, L. A., 1987; Michaud, L. et Dea, S., 1993). La protéine S de TGEV possède de neuf à onze épitopes regroupés aussi dans quatre domaines majeurs (Delmas, B. *et al.*, 1986; Laude, H. *et al.*, 1986). Pour l'IBV, il y a huit sites antigéniques, six sur la sous-unité S1 et deux sur celle de la S2 (Koch, G. *et al.*, 1990).

Enfin, une autre activité biologique est reconnue à la glycoprotéine S. C'est de posséder la capacité d'héماغglutiner des érythrocytes dont ceux de rats. Plus particulièrement, la S des virus BCoV et HCoV-OC43 est reconnu pour se lier à l'acide 9-O-acétyl neuraminique (Schultze, B. *et al.*, 1991; Schultze, B. *et al.*, 1992; Schultze, B. et Herrler, G., 1992).

3.4.5 La protéine de l'Héماغglutinine Estérase (HE)

La glycoprotéine HE est une protéine additionnelle présente uniquement chez les coronavirus du 2^{ème} groupe antigénique (Callebaut, P. E. et Pensaert, M. B., 1980; King, B. et Brian, D. A., 1982; King, B. *et al.*, 1985) sauf pour la souche MHV-A59 où le cadre de lecture correspondant ne contient pas de codon d'initiation (Luytjes, W. *et al.*, 1988). C'est la liaison par des ponts disulfure d'une protéine N-glycosylée de 62 à 65 kDa qui permet la formation d'un homodimère de 130 à 140 kDa exposé à la surface du virion (Deregt, D. *et al.*, 1987; Dea, S. *et al.*, 1989; Hogue, B. G. *et al.*, 1989; Kienzle, T. E. *et al.*, 1990).

L'analyse des séquences en acide aminés a démontré que la HE des coronavirus possède 30% d'homologie avec l'héماغglutinine du virus de l'influenza C. Cette ressemblance laisse croire que ce gène aurait été obtenu par la recombinaison génétique de l'ARNm de la HE de l'influenza C avec l'ARN génomique du coronavirus ancestral (Luytjes, W. *et al.*, 1988).

C'est en 1980 que la possibilité que certains coronavirus possédaient une protéine supplémentaire, impliquée dans l'héماغglutination, a été envisagée (Callebaut, P. E. et Pensaert, M. B., 1980). Des études sur le BCoV (King, B. et Brian, D. A., 1982; King, B. *et al.*, 1985) et le TCoV (Dea, S. et Tijssen, P., 1989) ont démontré qu'en absence de la protéine S, les virus conservaient leur activité héماغglutinante. Les virus de ce groupe sont aussi appelés virus héماغglutinants puisqu'ils possèdent une activité héماغglutinante plus forte que les coronavirus des autres groupes (Dea, S. et Tijssen, P., 1988; Brian, D. A. *et al.*, 1995). Outre son activité héماغglutinante, la HE est impliquée

dans les activités acétyl-estérase (AE) et destructrice de récepteurs (RDE) (Vlasak, R. *et al.*, 1988; Parker, M. D. *et al.*, 1989; Schultze, B. *et al.*, 1991; Zhang, X. M. *et al.*, 1991).

Il a été démontré que la HE n'est pas une protéine essentielle à la réplication virale (Yokomori, K. *et al.*, 1991). Cependant, des AcMo dirigés contre cette protéine possèdent la capacité d'inhiber l'infection virale (Vautherot, J. F. *et al.*, 1984; Dereg, D. *et al.*, 1989; Milane, G. *et al.*, 1997). La HE agirait comme la protéine initiatrice de l'infection (Vlasak, R. *et al.*, 1988; Kienzle, T. E. *et al.*, 1990). La HE aurait aussi un rôle à jouer dans la pathogénicité du virus chez son hôte (Yokomori, K. *et al.*, 1992).

3.5 Protéines non structurales (ns)

Une protéine virale non structurale est une protéine qui ne fait pas partie du virion mais qui est produite lors de l'infection virale.

La première de ces protéines est en réalité une polyprotéine d'environ 700 à 800 kDa qui est clivée co- et post-traductionnellement par des protéases internes (figure 3). Un des produits de la traduction de l'ORF 1 de l'ARN génomique est la polymérase virale. Cet ORF possède deux cadre de lecture ouverts différents, soient les ORF 1a et 1b (Bournell, M. E. *et al.*, 1987). L'ORF 1a contient au moins une copie de deux différents types de domaine protéolytique. Le premier est apparenté à celui de la papaine (PLP) et le second est apparenté à la chymotrypsine des picornavirus 3C (3CLp) (Gorbalenya, A. E. *et al.*, 1989; Lee, H. J. *et al.*, 1991). Les domaines PLP et 3CLp sont responsables du clivage du polypeptide primaire même si le clivage est majoritairement effectué par 3CLp (Liu, D. X. *et al.*, 1994; Ziebuhr, J. *et al.*, 1995; Liu, D. X. *et al.*, 1998; Ziebuhr, J. et Siddell, S. G., 1999). La région 3CLp s'autoclive du polypeptide primaire pour donner une protéase active de 27kDa (Liu, D. X. et Brown, T. D. K., 1995; Lu, Y. Q. *et al.*, 1995; Ziebuhr, J. *et al.*, 1995; Lu, X. T. *et al.*, 1996) qui agirait suite à la reconnaissance d'une séquence Q/S et Q/A (Gorbalenya, A. E. *et al.*, 1989; Lee, H. J. *et al.*, 1991). Le polypeptide primaire codé par l'ORF 1b est scindé en différents domaines dont l'un correspond à une protéine de 100 kDa associée à l'activité ARN polymérase ARN dépendante essentielle à la production d'ARN viral et sous-génomiques (Liu, D. X. *et al.*,

1994; Grotzinger, C. *et al.*, 1996). Ce même domaine de l'ORF1 code aussi pour une protéine de 67 kDa associée à une activité hélicase (Dension, M. R. *et al.*, 1999).

Les autres protéines non structurales peuvent être différentes selon l'espèce de coronavirus. Par exemple, il existe un ORF situé entre celui de la polymérase et celui de la HE codant pour une protéine de 32 kDa unique aux coronavirus du deuxième groupe antigénique (Luytjes, W. *et al.*, 1988). Il est connu que cette phosphoprotéine s'accumule dans le cytoplasme des cellules infectées (Deregt, D. *et al.*, 1987; Dea, S. et Tijssen, P., 1988; Luytjes, W. *et al.*, 1988; Cox, G. J. *et al.*, 1991; Labonté, P. *et al.*, 1995) mais sa véritable fonction est encore inconnue. Entre l'ORF de la S et de la M, il existe aussi un ORF codant pour des protéines non structurales de 4.8 et 4.9 kDa chez les coronavirus bovins, mais cet ORF est tronqué chez le coronavirus humain HCoV-OC43 et chez les souches du virus hémagglutinant de l'encéphalomyélite porcine (HEV). Il a été suggéré que l'absence de ces courts ORFs pourrait être associée au tropisme respiratoire (Mounir, S. et Talbot, P. J., 1993; Vieler, E. *et al.*, 1996). Ensuite, dans le même ORF que celui de la petite protéine de l'enveloppe, c'est-à-dire l'ORF 5, il y a une protéine non structurale de 12.7 chez les BCoVs et de 12.9 chez le HCoV-OC43. La synthèse des protéines de 4.8 et de 12.7 kDa au cours de l'infection virale n'a pas encore été démontrée et le gène de la protéine de 4.9 kDa ne semble pas être traduit (Hofmann, M. A. *et al.*, 1993).

Finalement, dans l'ORF de la N, il existe un second cadre de lecture ouvert codant pour une protéine de 23kDa chez le BCoV (Lapps, W. *et al.*, 1987) alors que chez le coronavirus HCoV-OC43, il existe plutôt deux autres cadres de lecture codant pour des protéines possédant de 60 et 108 résidus d'a.a. (Kamahora, T. *et al.*, 1989; Mounir, S. *et al.*, 1993).

4. Réplication Virale

La durée du cycle de réplication virale est de 14 à 18 heures avec une période de latence de 6 à 7 heures. La réplication s'effectue entièrement dans le cytoplasme des cellules infectées. (Siddell, S. *et al.*, 1982; Tooze, J. *et al.*, 1984)

4.1 Attachement, pénétration et décapsidation

L'étape de l'attachement du virus à la cellule hôte est très importante. La reconnaissance spécifique du récepteur cellulaire par le récepteur viral constitue la première étape essentielle à l'infection virale.

C'est la glycoprotéine S qui est l'anti-récepteur viral pour tous les coronavirus, mais le récepteur cellulaire reconnu diffère selon les différents coronavirus. Pour certains coronavirus du 1^{er} groupe antigénique (HCoV-229E, TGEV, FIPV et CCoV), le récepteur cellulaire est une métalloprotéinase, soit l'aminopeptidase N (Delmas, B. *et al.*, 1992; Yeager, C. L. *et al.*, 1992; Benbacher, L. *et al.*, 1997). Il est connu que c'est la présence et non pas la fonctionnalité de cette protéine qui est importante pour l'infection virale (Williams, R. K. *et al.*, 1991; Delmas, B. *et al.*, 1992; Yeager, C. L. *et al.*, 1992). Pour les virus du 2^{ème} groupe antigénique (ex. BCoV et HCoV-OC43), le récepteur cellulaire reconnu par la S est encore inconnu. Il a été démontré que la glycoprotéine HE, supplémentaire à la surface des virions de ce groupe reconnaît l'acide 9-O-acetyl neuraminique (acide sialique) (Vlasak, R. *et al.*, 1988; Schultze, B. et Herrler, G., 1992). Cette reconnaissance serait très importante pour l'infection de la cellule-hôte sans être suffisante (Deregt, D. et Babiuk, L. A., 1987; Deregt, D. *et al.*, 1989; Schultze, B. et Herrler, G., 1992). Pour les diverses souches du MHV, autant celles possédant la HE que celles qui ne la possèdent pas, le récepteur cellulaire reconnu par la S est une glycoprotéine murine de type antigène carcinoembryonnaire de la super famille des immunoglobulines (Ig) (Dveksler, G. S. *et al.*, 1991; Williams, R. K. *et al.*, 1991). Cette glycoprotéine semble s'exprimer majoritairement chez les cellules cibles du MHV soit les cellules du foie, du tractus gastro-intestinal, des macrophages et des lymphocytes B (Coutelier, J. P. *et al.*, 1994; Godfraind, C. *et al.*, 1995).

Les mécanismes de la pénétration et la décapsidation virale sont encore mal compris. Des études sur des lignées cellulaires résistantes au MHV, avec un récepteur cellulaire fonctionnel, ont permis de mettre en évidence des gènes cellulaires impliqués dans ces différents processus (Asanaka, M. et Lai, M. M. C., 1993). De plus, les

connaissances actuelles permettent d'affirmer que les coronavirus pénètrent dans la cellule hôte soit par une endocytose dépendante du pH ou alors par un phénomène de fusion de la membrane plasmique indépendante du pH (Kooi, C. *et al.*, 1991).

4.2 Transcription et réplication du génome viral

Lorsque l'ARN viral est libéré dans le cytoplasme de la cellule infectée, il y a la traduction de l'ARN polymérase ARN dépendante. Cette enzyme est essentielle pour la transcription des ARN viraux. Les Coronavirus ont la particularité de synthétiser des ARNm sous-génomiques de taille différente ayant une structure polycistronique mais étant fonctionnellement monocistroniques (figure 2). Ils ont tous la même extrémité 3' avec une queue de poly(A) et la même extrémité 5', 65 à 98 nucléotides, identiques à la séquence de tête de l'ARN génomique (Lai, M. M. *et al.*, 1983; Spaan, W. *et al.*, 1983; Shieh, C.-K. *et al.*, 1987). Cette séquence est unique dans le génome mais entre chaque ORF, il existe des séquences intergéniques (SI) de 7 à 18 nucléotides qui sont homologues à des séquences retrouvées au niveau de la séquence de tête. La présence de cette même extrémité 5' serait indispensable due à la juxtaposition de la séquence de tête aux ARNm sous-génomiques grâce aux SI (Baric, R. S. *et al.*, 1987; Shieh, C.-K. *et al.*, 1987). Les mécanismes de la synthèse de l'ARN génomique et des ARNm demeurent controversés.

Il existe trois modèles à l'étude (figure 4). Cependant, il y a des éléments à la base de ces modèles. Tout d'abord, la transcription d'ARN de longueur génomique, au début de l'infection, serait essentielle à la transcription des ARN sous-génomique (Yokomori, K. *et al.*, 1991; Maeda, A. *et al.*, 1998) et alors qu'au cours de l'infection, chaque ARNm semble être transcrit de façon indépendante (Jacobs, L. *et al.*, 1981; Stern, D. F. et Sefton, B. M., 1982; Yokomori, K. *et al.*, 1992). Ensuite, la séquence de tête serait libre au cours de la transcription permettant ainsi de se lier de façon indépendante à n'importe quelle séquence intergénique incluant celle située sur l'ARN d'une autre souche lors d'une co-infection (Makino, S. *et al.*, 1986).

Le premier est celui de la transcription par la séquence de tête (figure 4I). Dans ce modèle, il y a tout d'abord la transcription d'un intermédiaire négatif complet du génome viral. La séquence de tête est libérée du brin positif, fort probablement par la polymérase, et s'apparierait aux séquences intergéniques complémentaires situées sur le brin négatif du génome complet afin de synthétiser les ARN sous-génomique de polarité positive. Ces ARN sont des ARNm mais serviraient aussi de gabarit à la transcription d'intermédiaire de polarité négative qui permettra à nouveau la formation ARNm (Lai, M. M., 1986). Il y a beaucoup d'expériences qui tendraient à confirmer ce modèle mais dans le cas d'une infection virale avec BCoV (Chang, R. Y. *et al.*, 1996), il n'y a pas de tête libre qui a été retrouvée comme dans le cas du MHV (Baric, R. S. *et al.*, 1987).

Le second modèle (figure 4II) prône plutôt l'idée d'une transcription discontinuée lors de la synthèse du brin négatif. Pour ce faire, il faut que la polymérase qui transcrit le brin positif en brin négatif s'arrête sur une séquence intergénique et saute directement à la portion 3' de la séquence de tête (Sawicki, S. G. et Sawicki, D. L., 1990). Ce serait donc des brins négatifs de différentes longueurs qui permettraient la transcription de ARNm sous-génomiques. Des faits intéressants qui pourraient confirmer ce modèle mais rien dans ce modèle ne pourrait expliquer la cinétique de l'apparition des ARN sous-génomiques (An, S. *et al.*, 1998) ni pourquoi il y a formation d'ARN complets au début de l'infection (Yokomori, K. *et al.*, 1992; Maeda, A. *et al.*, 1998).

Le dernier modèle repose sur la découverte chez certains coronavirus de la présence d'ARN sous-génomiques encapsidés dans le virion en présence d'un ARN génomique (figure 4III) (Sethna, P. B. *et al.*, 1989; Hofmann, M. A. *et al.*, 1990; Zhao, X. *et al.*, 1993). Ces ARNm seraient simplement transcrits en brins négatifs pour ensuite servir de gabarit à la transcription des brins positifs (Schwarz, B. *et al.*, 1990; Senanayake, S. D. *et al.*, 1992). Ce modèle n'a pas été confirmé pour les autres souches de coronavirus.

Il est très difficile de trancher entre ces différents modèles puisqu'il est possible que tous ces mécanismes soient utilisés à un moment ou un autre de l'infection virale ou

encore que les mécanismes utilisés ne soient pas les mêmes pour toutes les souches de coronavirus. Nous savons certainement que la polymérase virale est essentielle au mécanisme de transcription. Cependant, il est possible que d'autres protéines, comme la protéine N, de même que des constituants de la cellule soient impliqués (Compton, S. R. *et al.*, 1987; Li, H.-P. *et al.*, 1997; Li, H.-P. *et al.*, 1999).

La réplication du génome viral devrait se faire de façon continue à partir d'un brin de polarité négative. Cependant, il a été démontré qu'il était possible d'obtenir des génomes contenant des délétions (Zhang, X. et Lai, M. M. C., 1996) de même que des ARN génomiques résultant de recombinaisons s'étant produites aux séquences intergénomiques (Keck, J. G. *et al.*, 1987). Ces résultats semblent démontrer que l'ARN génomique est lui aussi synthétisé de façon discontinue.

4.3 Assemblage des virions

Suite à la production des différentes protéines virales nécessaires au cycle de réplication virale et la traduction des ARNm, l'étape de l'assemblage des virions commence par l'assemblage de la nucléocapside. L'encapsidation de l'ARN viral par les protéines N requiert une séquence spécifique de 61 nucléotides présente dans la dernière portion de l'ORF 1b (van der Most, R. G. *et al.*, 1991; Fosmire, J. A. *et al.*, 1992; Woo, K. *et al.*, 1997). La localisation de cette séquence permet à une copie complète du génome d'être encapsidé. (Masters, P. S. *et al.*, 1994). Cette stratégie n'est pas parfaite et il arrive que des brins d'ARN sous-génomiques soient encapsidés. Dans ce cas, les phosphonucléoprotéines s'attacheraient de façon non spécifique à la séquences de tête présente chez les ARN sous-génomiques (Stohlman, S. A. *et al.*, 1988).

La seconde étape est l'interaction de la nucléocapside avec la protéine de la matrice située dans la portion de la membrane cellulaire qui est modifiée par les protéines virales (Sturman, L. S. *et al.*, 1980). Ce "compartiment de bourgeonnement" est situé entre le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi (Dubois-Dalcq, M. E. *et al.*, 1982; Tooze, J. *et al.*, 1984; Tooze, J. et Tooze, S. A., 1985; Klumperman, J. *et al.*, 1994). La M semble être la pierre angulaire de cette membrane modifiée. En effet, la M, ancrée

dans cette membrane (Klumperman, J. *et al.*, 1994), doit interagir avec la E pour former un complexe essentiel au bourgeonnement. La E peut être retrouvée ailleurs que dans le RE ou dans le Golgi (Yokomori, K. et Lai, M. M. C., 1992; Godet, M. *et al.*, 1994). Il en va de même pour les glycoprotéines S et HE qui vont former des complexes avec la M dans le pré-Golgi (Opstelten, D. J. E. *et al.*, 1995; Nguyen, V.-P. et Hogue, B. G., 1997).

4.4 Bourgeonnement

Le bourgeonnement des coronavirus est effectué uniquement par les protéines de la membrane soit la M et la E. La co-expression de ces deux protéines donne la formation de particules virales et ce, en l'absence de la nucléocapside. Cependant, seule une nucléocapside associée à l'ARN peut être enrobée lors du bourgeonnement (Bos, E. C. W. *et al.*, 1996; Vennema, H. *et al.*, 1996). La M interagirait soit directement avec l'ARN ou avec le complexe N-ARN. Cette interaction pourrait être à la base de la formation de la structure interne présente chez certains coronavirus (Risco, C. *et al.*, 1996). Une fois le bourgeonnement complété, la maturation des virions se poursuit et ils sont regroupés dans des vésicules d'exocytose (Tooze, J. *et al.*, 1987). Finalement, la fusion de la vésicule avec la membrane plasmique permet de relarguer les virions (Griffiths, G. et Rottier, P., 1992).

5. Le Virus Hémagglutinant de l'Encéphalomyélite Porcine (HEV)

5.1 Généralités

C'est en 1962 que cet le HEV fut identifié (Greig, A. S. *et al.*, 1962). Il a été isolé suite à la propagation d'un virus provenant d'un porcelet affecté par une encéphalomyélite, maladie décrite en Ontario en 1959 (Alexander, T. J. L. *et al.*, 1959). Le virus produisait des syncytia en cultures cellulaires et le surnageant viral obtenu possédait la capacité d'hémagglutiner des érythrocytes de poussin. En 1969, des chercheurs de l'Angleterre isolèrent un virus à partir du cerveau d'un porcelet malade mais cette fois souffrant de la maladie du vomissement et du dépérissement décrite 11 ans plus tôt au Canada (Roe, C. K. et Alexander, T. J. L., 1958; Cartwright, S. F. *et al.*, 1969).

Le virus obtenu, produisant aussi des syncytia et hémagglutinait les globules rouges, fut reconnu sérologiquement très proche du virus canadien. Le HEV fut reconnu comme membre du genre Coronavirus en 1971 (Greig, A. S. *et al.*, 1971; Phillip, J. I. H. *et al.*, 1971). Finalement, c'est en 1976 que le HEV fut reconnu comme l'agent causal de la maladie du vomissement et du dépérissement et celui de l'encéphalomyélite porcine suite à la reproduction expérimentale des symptômes de ces deux maladies à partir d'un isolat clinique (Mengeling, W. L. et Cutlip, R. C., 1976).

5.2 Manifestations cliniques

Autant pour la maladie du vomissement et de dépérissement que l'encéphalomyélite porcine, ce sont des porcelets de moins de trois semaines qui sont généralement atteints.

5.2.1 La maladie du vomissement et du dépérissement

À la suite de la primo-infection, la période d'incubation dure de 4 à 7 jours avant l'apparition des premiers symptômes de cette maladie se caractérisent par de l'anorexie, de la faiblesse, des nausées et des vomissements. Les animaux infectés ne boivent que peu ou pas d'eau, signe d'une paralysie potentielle du pharynx, et perdent rapidement du poids. Contrairement aux autres infections coronavirales du porc, aucune diarrhée n'est associée à la maladie. Les porcelets plus jeunes tombent dans le coma et meurent suite à une sévère déshydratation. Pour les porcelets un peu plus âgés, la fréquence des vomissements diminue après trois à quatre jours. Malgré cela, l'appétit des animaux ne revient pas. Ils peuvent mourir rapidement ou survivent quelques semaines avant de succomber suite à leur incapacité de s'alimenter ou des conséquences d'une infection secondaire (Pensaert, M. B. et Andries, K., 1993).

5.2.2 L'encéphalomyélite porcine

Les premiers symptômes de l'encéphalomyélite sont semblables à ceux de la maladie du vomissement et du dépérissement. Les premiers signes d'atteinte du système

nerveux central (SNC) apparaissent après quelques jours et se traduisent par de la détresse respiratoire et une légère paralysie des membres postérieurs. Les animaux deviennent faibles rapidement. Lors de la phase plus sévère, apparaissant dans les dix jours, les animaux peuvent souffrir de dyspnée et de cécité pour finalement succomber. Il arrive que certains animaux récupèrent de l'infection et survivent sans aucune séquelle. (Pensaert, M. B. et Andries, K., 1993)

5.3 Pathogénie

Le porc semble être l'hôte spécifique du HEV. Cependant, le virus possède la faculté d'infecter des souris lorsqu'il est adapté à ces dernières de façon expérimentale (Kaye, H. S. *et al.*, 1977; Yagami, K. *et al.*, 1986). Cette susceptibilité varie selon l'âge de l'animal et la voie d'inoculation. La voie de l'infection de l'animal semble être oronasale et la transmission se ferait par les aérosols. L'infection se produit lors des premières semaines de sa vie (Alexander, T. J. L., 1962; Appel, M. *et al.*, 1965). Par contre, les porcs plus âgés ou les porcelets nouveaux-nés qui ont reçu le colostrum maternel ne présentent pas de signes cliniques lorsqu'ils sont exposés au HEV (Appel, M. *et al.*, 1965). Le virus HEV se réplique dans les cellules épithéliales des voies respiratoires supérieures et des amygdales, de même que dans les neurones du tractus digestif et du SNC. Trois voies différentes pourraient être impliquées dans l'infection du SNC à partir du système nerveux périphérique. La première voie de propagation se ferait à partir de la muqueuse nasale vers le ganglion trigéminal et le nerf trijumeau, constitué du nerf ophtalmique, maxillaire et mandibulaire, dans le tronc cérébral. Cette voie permettrait d'expliquer la cécité chez les porcelets atteints sévèrement de l'encéphalomyélite. La seconde voie passerait par le nerf vague pour que le virus se rende aussi au tronc cérébral. La dernière voie impliquerait le passage du virus par les plexus intestinaux et la moelle épinière. Dans le SNC, c'est la moelle allongée (bulbe rachidien) qui est infectée plus particulièrement mais toutes les parties du cerveau semblent aussi pouvoir être infectées par le HEV. Il a été démontré que les vomissements étaient causés par l'infection des ganglions du nerf vague et par des impulsions électriques envoyées au centre du vomissement par des neurones infectées. Le dépérissement, pour sa part, serait

dû, en plus de l'infection du nerf vague, à l'infection des plexus de l'estomac qui provoquerait une stase gastrique. (Pensaert, M. B. et Andries, K., 1993).

5.4 Lésions macroscopiques et microscopiques causées par le HEV

La cachexie ou amaigrissement prononcé des animaux de même que la dilatation de l'abdomen provoquée par la présence de gaz dans l'estomac sont les seules caractéristiques macroscopiques de l'infection naturelle par le HEV.

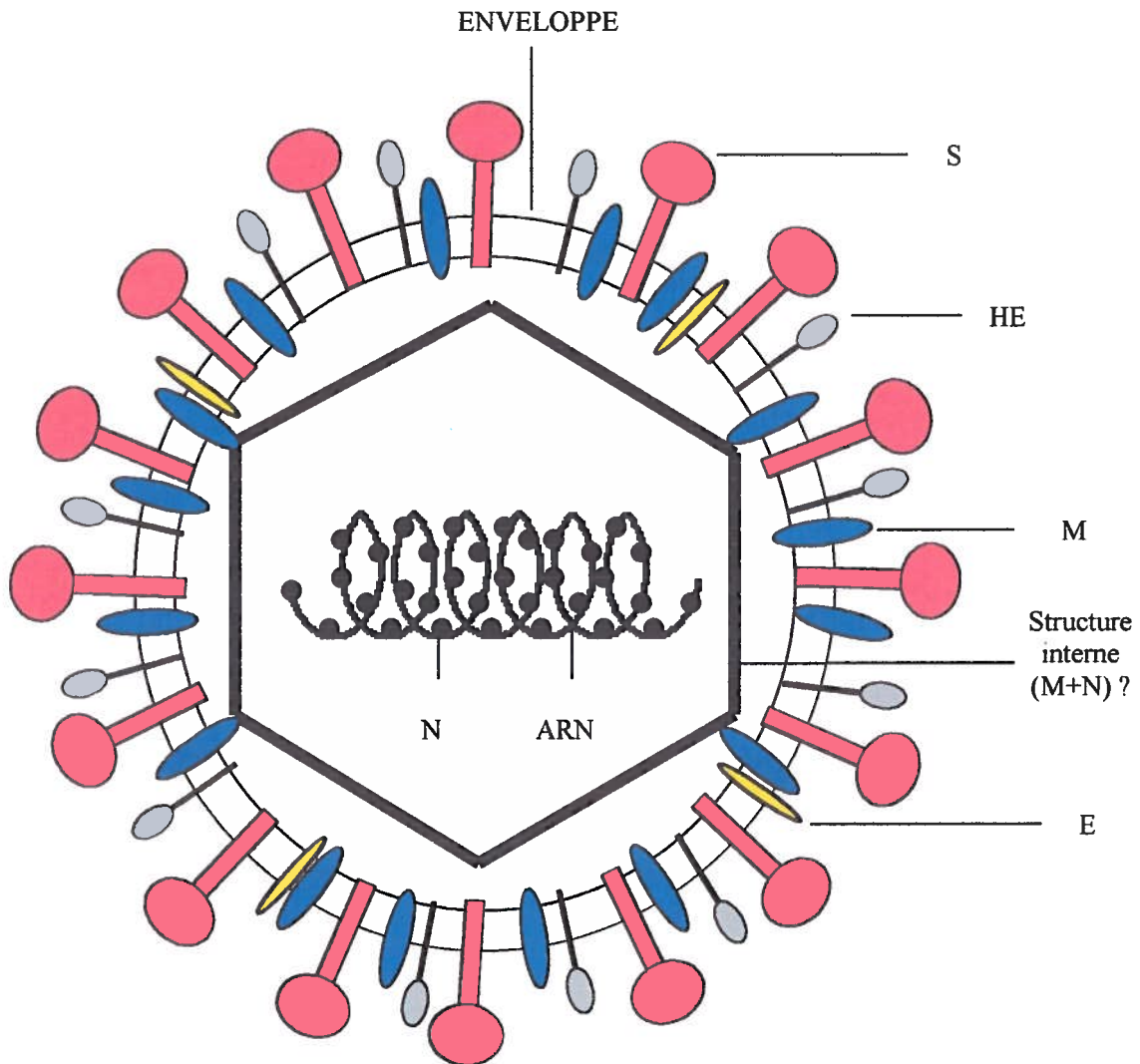
Des lésions microscopiques ont été rapportées dans les amygdales, dans le système nerveux et respiratoire, de même qu'au niveau de l'estomac. Au niveau des amygdales, les lésions sont caractérisées par une dégénérescence des cellules épithéliales et par une infiltration des cryptes par des cellules lymphatiques. Pour le SNC, c'est une encéphalomyélite non suppurative caractérisée par un engorgement leucocytaire périvasculaire, une gliose et par une dégénérescence des neurones. La matière grise de la moelle allongée et du pont du tronc cérébral de même que celle des cornes dorsales de la moelle épinière supérieure est généralement atteinte. Ces lésions peuvent être présentes dans 70 à 100% des cas d'encéphalomyélite et dans 20 à 70% des animaux souffrant du syndrome de vomissement et de dépérissement suite à l'infection par le HEV. D'autres lésions au SNC ont été rapportées, soit une névrite au niveau du ganglion trigéminal.

Les lésions du système respiratoire sont caractérisées par une pneumonie interstitielle péribranchiolaire avec une infiltration de neutrophiles et de macrophages au niveau des alvéoles pulmonaires. Ces lésions sont présentes dans environ 20% des animaux infectés. Les lésions microscopiques retrouvées au niveau de l'estomac sont caractérisées par une dégénérescence des ganglions nerveux stomacaux et par un engorgement leucocytaire périvasculaire plus spécifiquement dans la région pylorique. Ces lésions sont présentes chez 15 à 85% des animaux souffrant spécifiquement du syndrome de vomissement et de dépérissement (Pensaert, M. B. et Andries, K., 1993).

TABLEAU 1: Groupes antigéniques des coronavirus et leurs hôtes naturels		
Groupe antigénique	Virus	Hôte
I	HCoV-229E	Humain
	TGEV	Porc
	PRCoV	Porc
	PEDV	Porc
	CCoV	Chien
	FeCoV	Chat
	FIPV	Chat
	RbCoV	Lapin
II	HCoV-OC43	Humain
	MHV	Souris
	BCoV	Bovin
	HEV	Porc
	TCoV	Dinde
	SDAV	Rat
III	IBV	Poulet
	TCoV	Dinde

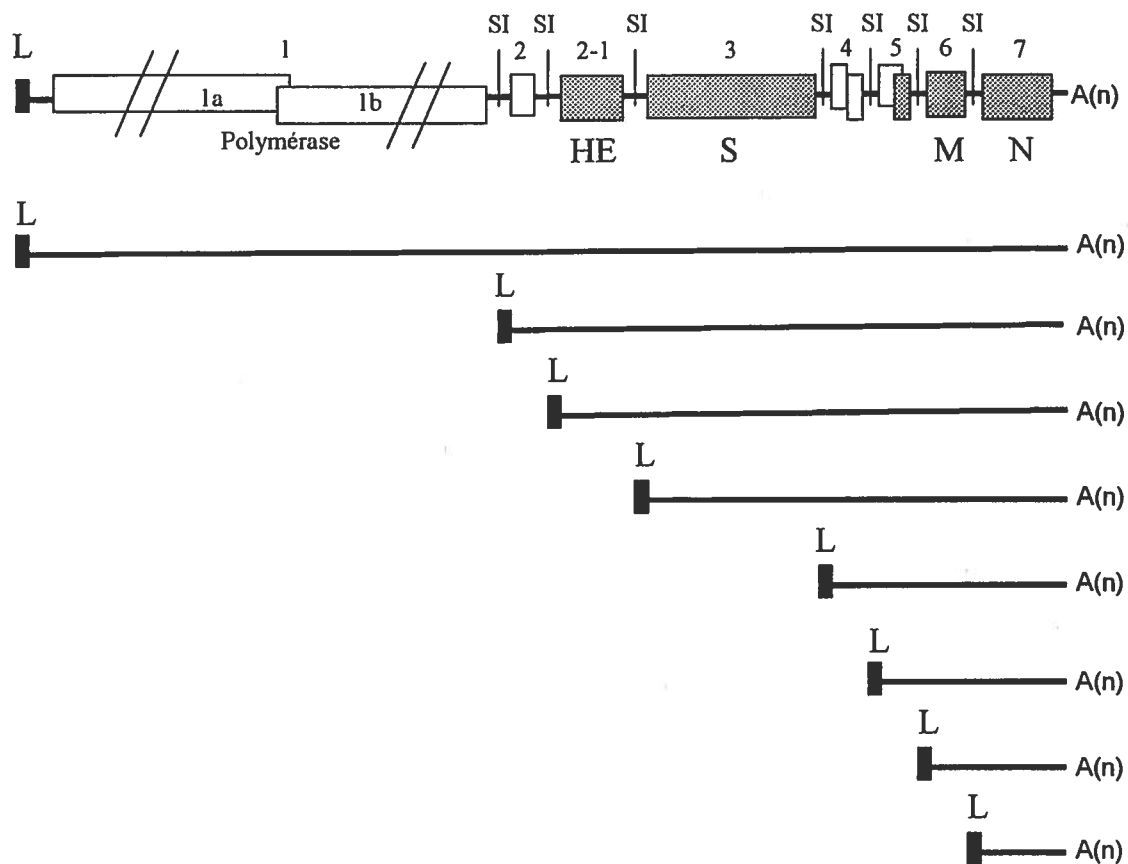
Les coronavirus sont classés dans trois groupes antigéniques distincts selon les résultats d'analyses de réactions croisées observées notamment par les épreuves d'immunofluorescence indirecte, d'ELISA, d'immunobavardage et d'immunomicroscopie électronique (Pedersen *et al.*, 1978; Schockley *et al.*, 1987; Dea et Tijssen, 1989). HCoV-229E, coronavirus respiratoire humain (souche 229E); TGEV, virus de la gastro-entérite transmissible des porcs; PRCoV, coronavirus respiratoire porcin; PEDV, le virus porcin de la diarrhée épidémique; CCoV, coronavirus canin; FeCoV, coronavirus entérique félin; FIPV, virus de la péritonite infectieuse féline; RbCoV, coronavirus du lapin; HCoV-OC43, coronavirus respiratoire humain (souche OC43); MHV, virus de l'hépatite murine; BCoV, coronavirus entérique bovin; HEV, virus de l'encéphalomyélite hémagglutinante porcine; TCoV, coronavirus entérique de la dinde; SDAV, virus de la sialodacryadénite des souris; RbEVC, IBV, virus de la bronchite infectieuse aviaire. (Adapté de Holmes et Lai, 2001)

Figure 1 : Schéma du virion d'un coronavirus.



Adaptée de Field's Virology, 2001

Figure 2 : Organisation génomique et réseau d'ARN sous-génomique du HEV.



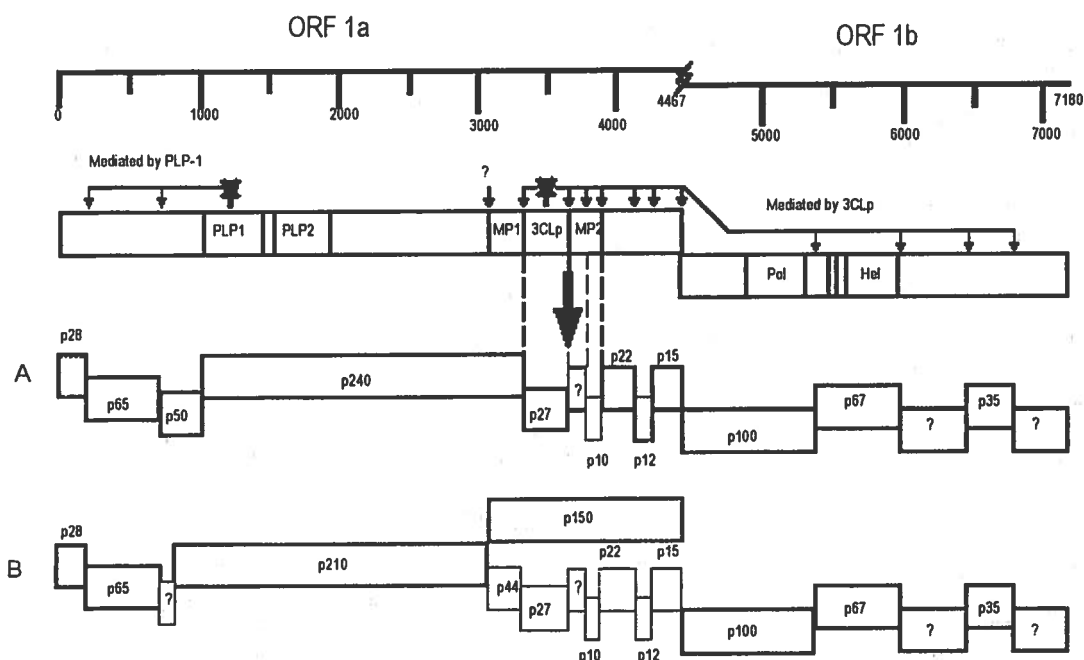
L : Séquence de tête

SI : Séquence intergénique

A(n) : Queue de polyadénosine

Adaptée de Field's Virology, 2001

Figure 3 : Représentation schématique de l'ORF 1a et 1b et des produits protéolytiques potentiels des produits de ces polyprotéines du coronavirus MHV.



A et B : profil potentiel de clivage.

lignes pointillées : portion non confirmée des produits ou site de clivage.

PLP : protéase semblable à la papaine

3CLp : chymotrypsine semblable à celle des picornavirus 3C

Pol : Polymérase

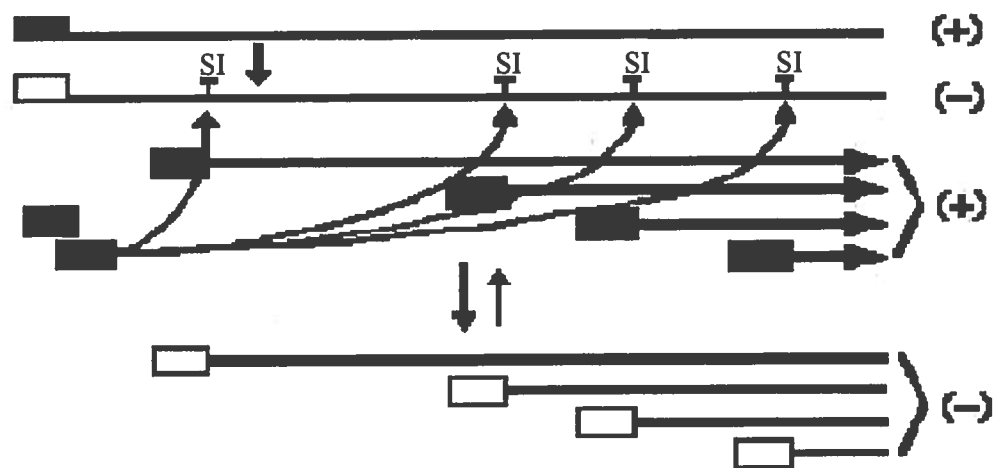
Hel : Hélicase

MP : domaine de liaison à la membrane

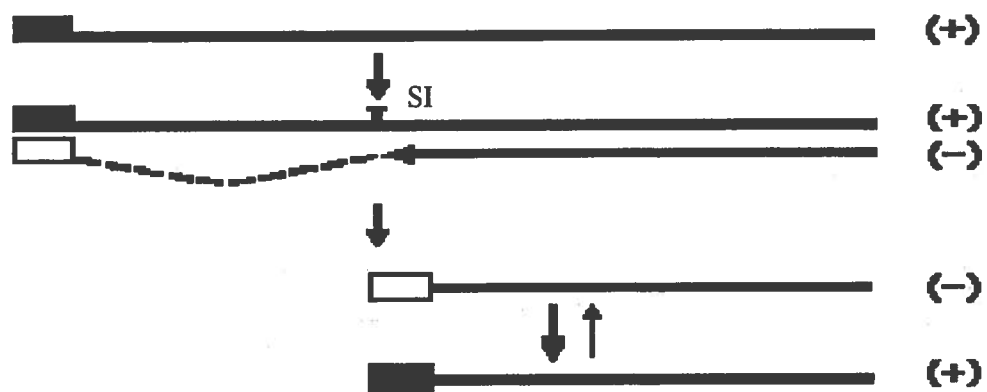
extraite de Field's Virology, 2001

Figure 4 : Modèles de transcription génomique des coronavirus

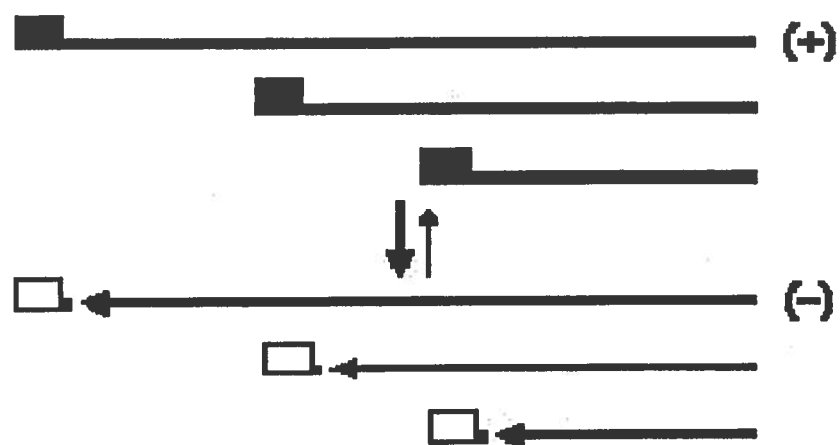
I. Transcription par la séquence de tête



II. Transcription discontinue durant la synthèse du brin négatif



III. Transcription par ARNm associés au virion



MATÉRIELS, MÉTHODES ET RÉSULTATS

PREMIER ARTICLE

Sequence of the 3'-terminal end (8.1 kb) of the genome of porcine haemagglutinating encephalomyelitis virus: comparison with other haemagglutinating coronaviruses

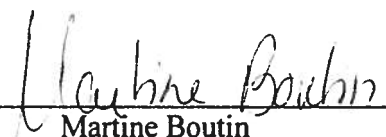
Attestation de la contribution des auteurs

La Docteur A. Marie-Josée Sasseville est première auteur sur cet article. Elle a réalisé la majorité des expériences et de même que les analyses des séquences obtenues. C'est elle qui a écrit la presque totalité de l'article.

En ce qui me concerne, je suis deuxième auteur sur cet article. Ma contribution scientifique se reflète dans toutes les étapes du séquençage de l'ORF correspondant à la glycoprotéine S, de la conception des amorces à l'analyse des séquences obtenues. Les conclusions apportées au sujet de cette glycoprotéine constituent ma participation à la rédaction de l'article.

La contribution de madame Anne-Marie Gélinas consiste en une aide technique de quelques PCRs pour éclaircir certains nucléotides ambigus pendant le retrait préventif de la Docteur Sasseville.

Le Dr Serge Dea fut responsable de la supervision et de la gestion de ce projet. Son expertise sur les coronavirus furent très utiles. Il participa activement à la correction et à la modification de l'article.


Martine Boutin


Serge Dea


Charles Dozois

(Président de jury)

Résumé en français

Cet article présente les résultats de séquençage des gènes codant pour les protéines structurales de deux isolats du virus hémagglutinant de l'encéphalomyélite porcine (HEV), soit l'extrémité 3' du génome des Coronavirus. Il s'agit d'une souche qui a été isolée suite à une épidémie de HEV au Québec et en Ontario (IAF-404) et la souche de prototype HEV 67N dont la séquence n'avait été que très peu étudiée à ce jour. Les résultats obtenus démontrent que la séquence du virus HEV est demeurée relativement stable depuis son isolement initial en 1962 malgré les changements de 1, 2, 3, 7 et 28 a.a. dans les protéines structurales E, M, N, HE et S respectivement. Les séquences obtenues ont aussi été comparées à celles déjà publiées de deux autres Coronavirus du même sous-groupe soit le Coronavirus bovin BCoV Mebus et le Coronavirus humain HCoV OC43. Malgré le fait que ces derniers infectent des hôtes différents, ils possèdent un très haut degré d'homologie de séquences au niveau de leurs protéines structurales variant de 91 à 96 %. Les comparaisons de ces virus aux virus HEV donnent des pourcentages d'homologie en a.a. plus faibles variant entre 80 et 95 %. C'est la glycoprotéine S qui possède le plus faible pourcentage d'homologie et cet écart s'accroît lorsque la comparaison ne comporte que la portion S1 de cette protéine pour ne donner que 73 et 71% d'homologie avec BCoV souche Mebus et HCoV OC43, respectivement. Cette étude ne couvre que le tiers du génome de ces deux souches mais permet de croire, en corrélation avec la littérature, que la glycoprotéine S joue un rôle dans le tropisme d'hôte et probablement dans la virulence et reste une cible intéressante pour des études subséquentes.

Sequence of the 3'-terminal end (8.1 kb) of the genome of porcine haemagglutinating encephalomyelitis virus: comparison with other haemagglutinating coronaviruses

A. Marie-Josée Sasseville, Martine Boutin, Anne-Marie Gélinas and Serge Dea

INRS-Institut Armand-Frappier, Centre de Microbiologie et Biotechnologie, Université du Québec, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7

A cytopathogenic coronavirus, serologically identified as porcine haemagglutinating encephalomyelitis virus (HEV), has recently been associated with acute outbreaks of wasting and encephalitis in nursing piglets from pig farms in southern Québec and Ontario, Canada. The 3'-terminal end of the genome of the prototype HEV-67N strain and that of the recent Québec IAF-404 field isolate, both propagated in HRT-18 cells, were sequenced. Overall, sequencing data indicated that HEV has remained antigenically and genetically stable since its first isolation in North America in 1962. Compared with the prototype strain of bovine enteropathogenic coronavirus (BCoV), HEV, as well as the human respiratory coronavirus (HCoV-OC43) showed a major deletion in their ORF4 gene. Deduced amino acid sequences for both HEV strains revealed 89/88, 80, 93/92 and 95/94% identities with the structural proteins HE, S, M and N of BCoV and HCoV-OC43, respectively. Major variations were observed in the S1 portion of the S gene of both HEV strains, with only 73/71% amino acid identities compared with those of the two other haemagglutinating coronaviruses.

Coronaviruses are enveloped, positive-stranded RNA viruses responsible for enteric, hepatitis, neurological and respiratory infections in humans and animals. Porcine haemagglutinating encephalomyelitis virus (HEV) is a member of the antigenic subgroup of haemagglutinating coronaviruses, including human respiratory coronavirus (HCoV-OC43), bovine coronavirus (BCoV) and some North American isolates of

turkey-origin coronaviruses (TCoV), as well as mouse hepatitis virus (MHV) (Spaan *et al.*, 1988). Recent data from the USA and the UK indicate that coronaviruses associated with acute enteritis in turkey poult are genetically related to infectious bronchitis virus (IBV) of chicken and not to BCoV (Breslin *et al.*, 1999; Cavanagh *et al.*, 2001; Ismail *et al.*, 2002; Loa *et al.*, 2000), contrary to Canadian and US isolates characterized in the early 1990s (Dea *et al.*, 1990; Verbeek & Tijssen, 1991) and even until very recently (Lin *et al.*, 2002). In addition to the four structural proteins of all coronaviruses – N (nucleophosphoprotein, 50–60 kDa), M (matrix glycoprotein, 20–26 kDa), E (small membrane protein, 9.5 kDa) and S (peplomeric glycoprotein, 180–200 kDa) – coronaviruses of the second subgroup (haemagglutinating coronaviruses) also possess a 140 kDa envelope-associated glycoprotein, the haemagglutinin-esterase (HE), which is made of two 65 kDa subunits linked together by disulfide bonds (Dea & Tijssen, 1989; Hogue & Brian, 1986; King *et al.*, 1985). The HE is associated with granular projections located near the base of the typical large bulbous peplomers and displays haemagglutinating (HA), acetyltransferase (AE) or receptor-destroying enzyme (RDE) activities (Parker *et al.*, 1990a, b; Vlasak *et al.*, 1988). The S and HE glycoproteins both possess antigenic determinants that trigger the immune response for the production of antibodies that neutralize virus infectivity and inhibit HA activity (Dea & Tijssen, 1989; Deregt & Babiuk, 1987; Michaud & Dea, 1993; Vautherot *et al.*, 1992). Except for HCoV-OC43, BCoV and TCoV, these viruses do not seem to cross-react by seroneutralization or haemagglutination inhibition, but they all share common antigenic determinants on their structural proteins, as demonstrated by indirect immunofluorescence, Western blotting and immunoprecipitation assays (Dea & Tijssen, 1989). The S glycoprotein possesses an N-terminal signal sequence, which is cleaved during intracellular processing, and thus is absent from the mature S protein (Abraham *et al.*, 1991; Boireau *et al.*, 1990; Parker *et al.*, 1990a, b). The S protein is synthesized as a high-molecular-mass precursor, which, after glycosylation, undergoes proteolytic cleavage, a host-cell-dependent event, to yield two subunits of molecular mass 85–100 kDa corresponding to the N-terminal S1 and the C-terminal

Author for correspondence: Serge Dea.

Fax +1 450 686 5627. e-mail serge.dea@inrs-iaf.quebec.ca

The GenBank accession numbers that have been assigned to the HE to N genomic regions are AY078417 for the HEV-67N strain and AF481863 for the Québec HEV field isolate IAF-404.

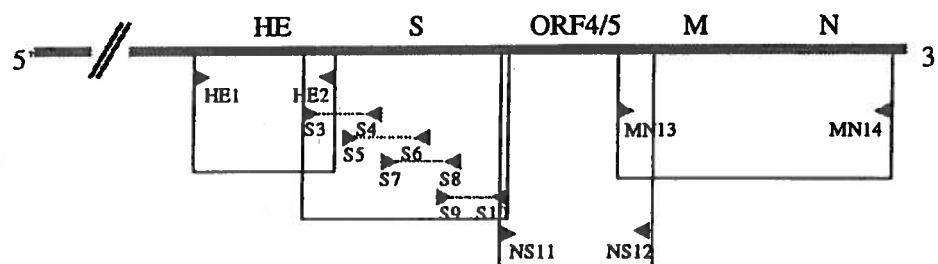


Fig. 1. The HEV genome and the approximate location of the oligonucleotide primers used to amplify the genes of interest.

S2 glycopolypeptides (Boireau *et al.*, 1990; Parker *et al.*, 1990a, b). Deduced amino acid sequences of BCoV and HCoV-OC43 revealed as much as 95, 91, 94 and 96% identities between their HE, S, M and N proteins, respectively (Mounir & Talbot, 1992, 1993a, b).

HEV, which specifically infects pigs, has a strong tropism for epithelial cells of the upper respiratory tract and for the central nervous system (CNS) (Andries & Pensaert, 1980). The virus causes two clinical syndromes: the vomiting and wasting disease, and an encephalomyelitis (Pensaert & Andries, 1993). The mode of transmission is through nasal secretions and the virus is spread via the peripheral nervous system to the CNS. This virus infection is believed to be widespread in many pig-producing countries as a subclinical condition. However, in the autumn of 1998 and 1999, several clinical manifestations suggestive of HEV infections were reported in Québec and Ontario, Canada. A cytopathogenic coronavirus strain, IAF-404, was isolated from the brain of a paretic weaned piglet and cultivated in the established human rectal tumour cell lines, HRT-18 and/or HRT-18G cells (Storz *et al.*, 1996). This field HEV isolate, as well as the reference HEV-67N (ATCC VR741) strain, induced the production of syncytia in infected cell monolayers, which did not appear to depend on the presence of trypsin in the culture medium. The IAF-404 HEV strain displayed HA and high AE and RDE activities, and displayed cross-antigenic relatedness with the reference strain by haemagglutination inhibition (HI) tests (data not shown).

As the HEV genomic sequence was still unknown, sequencing analysis of the 3'-terminal end (8.1 kb) of the genome of both HEV strains was undertaken to allow comparison with other haemagglutinating coronaviruses. This paper describes the molecular characteristics of the deduced non-structural (ns) and structural proteins encoded by the ORF2b-ORF7 genes of the prototype 67N strain (HEV-67N) and the IAF-404 field isolate of HEV.

RT-PCR using the *Taq* (Invitrogen) or *Pwo* (Roche Diagnostic) DNA polymerase was carried out to amplify the HE, S, ORF4/5 and MN regions of the viral genomes. The viruses were propagated for less than five passages in HRT-18 and/or HRT-18G cells. Genomic RNA was extracted from concentrated virus or lysates of virus-infected cells by Tripure

(Boehringer Mannheim). The oligonucleotide primers were designed according to the cDNA nucleotide sequence of the Mebus strain of BCoV (Kienzle *et al.*, 1990; Lapps *et al.*, 1987) or the partial cDNA nucleotide sequence of the prototype HEV-67N strain available in the literature (Vieler *et al.*, 1995, 1996), and that of the specific IAF-404 sequence reported here. The location of the primers on the HEV genome is illustrated in Fig. 1. For sequencing of the cDNA clones, RT-PCR-amplified cDNA fragments with A overhangs were ligated into a TA cloning vector (plasmid pCR2.1; Invitrogen) providing single 5' T overhangs at the insertion sites. As an alternative, PCR-amplified gene fragments were extracted from the PCR-amplified mixtures and sequenced directly, following purification of the amplified cDNAs using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Sequencing was performed with an Automated Laser Fluorescent DNA sequencer (Pharmacia LKB). To overcome the error rate of the RT and *Taq* DNA polymerase, clones from at least two different RT-PCR events were sequenced. The sequences were computer-analysed with the MacVector 7.0 program (Oxford Molecular Group).

The 3'-terminal end of coronaviruses contains the genes for all their structural proteins except for ORF4 and 5, which encode ns proteins. ORF4 encodes two putative ns proteins of 4.9 and 4.8 kDa, and ORF5 encodes a putative ns protein of 12.7 kDa and the structural 9.5 kDa small envelope-associated protein E. As the major genomic variations between HCoV-OC43 and the European strains of HEV and BCoV were identified in the ORF4 region, this genomic region was analysed first (Fig. 2a). In comparison with BCoV, both HEV strains analysed, as well as the HCoV-OC43 virus, lacked the ORF4 genomic region encoding the ns 4.8 protein, whereas their ns 4.9 kDa protein was apparently truncated, being 23 amino acids shorter than that of the reference Mebus enteropathogenic strain of BCoV, but nine amino acids longer than that of the HCoV-OC43 human respiratory coronavirus (Mounir & Talbot, 1993a, b; Vieler *et al.*, 1996). Previous investigators (Mounir & Talbot, 1993a, b; Vieler *et al.*, 1996) suggested this deletion, which results in a shorter protein, to be involved in the apparently preferential respiratory tropism of HCoV-OC43 and HEV. Interestingly, a truncated ns 4.9 kDa

Table 1. Amino acid changes for the predicted proteins of both HEV strains compared with those of the BCoV (Mebus) strain and HCoV-OC43 human respiratory coronavirus

The sequences used for comparison were: BCoV (Mebus), accession nos M30612 and M16620; HCoV-OC43, accession nos M76373, M99576 and M93390 and the sequences of Kamahora *et al.* (1989).

Strain	Compared with strain	Protein							
		HE	S	4.9 kDa	4.8 kDa	12.7 kDa	E	M	N
HEVIAF-404	HEV-67N	417 (+2)* 98%†	1322 (+7) 97%	20 100%	Del‡	108 99%	84 100%	228 (+1) 99%	446 (+2) 99%
	BCoV	382 (+16) 90 (+3)%	1102 (+108) 80 (+7)%	7 (+1) 16 (+2)%	Del	94 (+6) 86 (+5)%	82 97%	215 (+9) 93 (+3)%	429 (+7) 95 (+1)%
	HCoV	375 (+17) 88 (+4)%	1088 (+107) 80 (7)%	5 25%	Del	93 (+7) 85 (+6)%	83 98%	212 (+7) 92 (+3)%	424 (+9) 94 (+2)%
HEV-67N	BCoV	383 (+17) 90 (+4)%	1116 (+101) 81 (+7)%	7 (+1)% 16 (+2)%	Del	95 (+6) 87 (+5)%	82 97%	217 (+8) 94 (+3)%	428 (+9) 95 (+2)%
	HCoV	376 (+17) 88 (+4)%	1100 (+102) 81 (+7)%	5 25%	Del	94 (+7) 86 (+6)%	83 98%	214 (+6) 93 (+2)%	423 (+11) 94 (+2)%
	BCoV	404 (+9) 95 (2)%	1248 (+32) 91 (+2)%	9 20%	Del	102 (+3) 93 (+2)%	81 96%	217 (+5) 94 (+2)%	433 (+6) 96 (+1)%
Total no. of aa per protein...		424 (all strains)	1364 (BCoV) 1354 (HCoV) 1350 (HEV)	43 (BCoV) 11 (HCoV) 20 (HEV)	45 (BCoV)	109 (all strains)	84 (all strains)	230 (all strains)	448 (BCoV) 448 (HCoV) 449 (HEV)

* Number of amino acid identities (similarities).

† Percentage identities (similarities).

‡ Del, Deleted in HEV and HCoV.

since both HEV isolates displayed only two amino acid substitutions compared with the Mebus strain of BCoV and one amino acid substitution compared with the HCoV-OC43 human respiratory coronavirus, corresponding to 97 and 98% amino acid identities, respectively. The N protein also appeared to be highly conserved; the only difference demonstrated among the haemagglutinating coronaviruses studied instead corresponded to the insertion of an additional amino acid residue (glutamate) at position 384 of the N protein of both HEV strains (data not shown).

The significance of specific amino acid residues for HEV strains, in view of their virulence for pigs and their respiratory and neurological tropism, is difficult to interpret, considering that they are apparently distributed randomly among the previously mentioned proteins, except for the S protein. The S1 portion of the envelope-associated S glycoprotein is known to carry major antigenic determinants of coronaviruses that trigger the host immune response to induce the production of virus-neutralizing (VN) antibodies (Dea & Tijssen, 1989; Deregt & Babiuk, 1987; Vautherot *et al.*, 1992). Consequently, sequence differences in S1 are thought to be responsible for many of the antigenic differences between coronaviruses (Spaan *et al.*, 1988). As expected, the variability of the predicted amino acid sequence of the HEV S protein appeared to be concentrated in the S1 region, with only

73/71% identities compared with that of the enteropathogenic Mebus strain of BCoV and of the human HCoV-OC43 respiratory coronavirus, respectively, whereas a 97% amino acid identity was demonstrated for the S1 portion of the S glycoproteins of both HEV strains. As displayed in Fig. 2(b), this variability included amino acid changes in the predicted N-terminal signal peptide (aa 1–17) (Von Heijne, 1986) and a few clusters of amino acid substitutions within the N-terminal portion and the hypervariable region of S1 (aa 452–593) (Parker *et al.*, 1990a, b; Yoo *et al.*, 1991). Furthermore, in comparison with BCoV and HCoV-OC43, three specific gaps within this hypervariable region of S1 (aa 464–469, 494–495 and 502–511) were identified for both HEV strains. The putative N-linked glycosylation sites (NXS and NXT), identified in the S1 sequence of BCoV strains associated with variable pathologies (Gelinas *et al.*, 2001), appeared to be mostly conserved in the S1 region of the HCoV-OC43 peplomeric glycoprotein, but this was not the case for either of the HEV strains studied.

Overall, the data from sequencing analysis presented here indicates that the 3'-terminal end of the genome of the Québec field isolate IAF-404 of HEV appears relatively well conserved in comparison with the reference HEV-67N strain. However, sequences of genes encoding the four major structural proteins revealed species specificity between haemagglutinating cor-

onaviruses, which, for diagnostic purposes, will be useful to distinguish among these viruses. With the potential risk of recombination between members of the subgroup of haemagglutinating coronaviruses, notably at the level of subgenomic mRNAs synthesized in the infected cells during the replication cycle, specific and group-specific immunologic or genomic probes are required for a definitive diagnosis and control of possible interspecies infections. Recently, group-specific or species-specific single and multiplex RT-PCR approaches have been designed for the detection and differentiation of haemagglutinating coronaviruses (Boutin *et al.*, 2001). The propagation of the Québec IAF-404 field isolate of HEV in porcine primary lung cells (data not shown) may allow us to study the pathogenesis of HEV in swine with a better efficacy than with the prototype HEV-67N strain, which has been propagated for several passages on human and porcine primary and continuous cell cultures, resulting in the attenuation of its virulence for pigs.

This work was supported by an operating grant received from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (Grant # OGP0046412). The authors thank Nicole Sawyer for technical assistance. The authors greatly acknowledge J. Storz (Veterinary School of Medicine, Louisiana's State University) for providing HRT-18G cells and Yves Langelier for critical reading of the manuscript. We are also grateful to Dr C. Montpetit (Direction de la Santé Animale, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec) for providing tissue and blood specimens from the clinical cases of encephalomyelitis in swine. A.M.-J.S. has been a recipient of a post-doctoral fellowship from the Fondation Armand-Frappier.

References

- Abraham, S., Klenzie, T. E., Lapps, W. & Brian, D. A. (1991). Deduced sequence of the bovine coronavirus spike protein and identification of the internal proteolytic cleavage site. *Virology* **176**, 296–301.
- Andries, K. & Pensaert, M. B. (1980). Virus isolated and immunofluorescence in different organs of pigs infected with hemagglutinating encephalomyelitis virus. *American Journal of Veterinary Research* **41**, 215–218.
- Boireau, P., Cruclere, C. & Laporte, J. (1990). Nucleotide sequence of the glycoprotein S gene of bovine enteric coronavirus and comparison with the S proteins of two mouse hepatitis virus strains. *Journal of General Virology* **71**, 487–492.
- Boutin, M., Sasseville, A. M.-J. & Dea, S. (2001). Detection and identification of hemagglutinating coronaviruses using group-specific single and multiplex RT-PCR. In *Proceedings of the X International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnostics*, Salsomaggiore, Parma, Italy, July 4–7. pp. 391–392.
- Breslin, J. J., Smith, L. G., Fuller, F. G. & Guy, J. S. (1999). Sequences analysis of the turkey coronavirus nucleocapsid gene and 3' untranslated region identifies the virus as a close relative of infectious bronchitis virus. *Virus Research* **65**, 187–198.
- Cavanagh, D., Mawdlitt, K., Sharma, M., Drury, S. E., Alnsworth, H. L., Britton, P. & Gouch, R. E. (2001). Detection of a coronavirus from turkey poult in Europe genetically related to infectious bronchitis virus of chickens. *Avian Pathology* **30**, 365–378.
- Dea, S. & Tijssen, P. (1989). Antigenic and polypeptide structure of turkey enteric coronaviruses as defined by monoclonal antibodies. *Journal of General Virology* **70**, 1725–1741.
- Dea, S., Verbeek, A. J. & Tijssen, P. (1990). Antigenic and genomic relationships among turkey and bovine enteric coronaviruses. *Journal of Virology* **64**, 3112–3118.
- Deregt, D. & Babiuk, L. A. (1987). Monoclonal antibodies to bovine coronavirus: characteristics and topographical mapping of neutralizing epitopes on the E2 and E3 glycoproteins. *Virology* **161**, 410–420.
- Gellinas, A., Boutin, M., Sasseville, A. M.-J. & Dea, S. (2001). Bovine coronaviruses associated with enteric and respiratory diseases in Canadian dairy cattle display different reactivities to anti-HE monoclonal antibodies and distinct amino acid changes in their HE, S and ns 4-9 protein. *Virus Research* **76**, 43–57.
- Greig, A. S. & Bouillant, A. M. (1972). Studies on the hemagglutination phenomenon of hemagglutinating encephalomyelitis virus (HEV) of pigs. *Canadian Journal of Comparative Medicine* **36**, 366–370.
- Hogue, B. G. & Brian, D. A. (1986). Structural proteins of human respiratory coronavirus OC43. *Virus Research* **5**, 131–144.
- Ismail, M. M., Cho, K. O., Hasoksuz, M., Saif, L. J. & Saif, Y. M. (2002). Antigenic and genomic relatedness of turkey-origin coronaviruses, bovine coronavirus, and infectious bronchitis virus of chickens. *Avian Diseases* **45**, 978–984.
- Kamahora, T., Soe, L. & Lai, M. M. (1989). Sequencing analysis of the nucleocapsid gene and leader RNA of human coronavirus OC43. *Virus Research* **12**, 1–9.
- Kienzie, T. E., Abraham, S., Hogue, B. G. & Brian, D. A. (1990). Structure and orientation of expressed bovine coronavirus hemagglutinin-esterase protein. *Journal of Virology* **64**, 1834–1838.
- King, B., Potts, B. J. & Brian, D. A. (1985). Bovine coronavirus hemagglutinin protein. *Virus Research* **2**, 53–59.
- Lapps, W., Hogue, B. G. & Brian, D. A. (1987). Sequence analysis of the bovine coronavirus nucleocapsid and matrix protein genes. *Virology* **157**, 47–57.
- Lin, T. I., Tsal, S. C., Wu, C. C., Bryan, T. A., Thaker, H. L., Hooper, T. & Schrader, D. (2002). Characterization of turkey coronaviruses from turkey poult with acute enteritis. *Veterinary Microbiology* **84**, 179–186.
- Loa, C. C., Lin, T. L., Wu, C. C., Bryan, T. A., Thacker, H. L., Hooper, T. & Schrader, D. (2000). Detection of antibody to turkey coronavirus by antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay utilizing infectious bronchitis virus antigen. *Avian Diseases* **44**, 498–506.
- Michaud, L. & Dea, S. (1993). Characterization of monoclonal antibodies to bovine enteric coronavirus and antigenic variability among Quebec isolates. *Archives of Virology* **131**, 455–465.
- Mounir, S. & Talbot, P. J. (1992). Sequence analysis of the membrane protein gene of human coronavirus OC43 and evidence for O-glycosylation. *Journal of General Virology* **73**, 2731–2736.
- Mounir, S. & Talbot, P. J. (1993a). Human coronavirus OC43 RNA 4 lacks two open reading frames located downstream of the S gene of bovine coronavirus. *Virology* **192**, 355–360.
- Mounir, S. & Talbot, P. J. (1993b). Molecular characterization of the S protein gene of human coronavirus OC43. *Journal of General Virology* **74**, 1981–1987.
- Parker, M. D., Yoo, D., Cox, G. J. & Babiuk, L. A. (1990a). Primary structure of the S peplomer gene of bovine coronavirus and surface expression in insect cells. *Journal of General Virology* **71**, 263–270.
- Parker, M. D., Yoo, D. & Babiuk, L. A. (1990b). Expression and secretion of the bovine coronavirus hemagglutinin-esterase glycoprotein

A. M.-J. Sasseville and others

- by insect cells infected with recombinant baculoviruses. *Journal of Virology* **64**, 1625–1629.
- Pensaert, M. & Andries, K. (1993). Hemagglutinating encephalomyelitis virus. In *Diseases of Swine*, section 2. *Viral Diseases*, 7th edn, pp. 268–273. Ames, Iowa: ISU Press.
- Spaan, W., Cavanagh, D. & Horzinek, M. C. (1988). Coronaviruses: structure and genome expression. *Journal of General Virology* **69**, 2939–2952.
- Storz, J., Stine, L., Liem, A. & Anderson, G. A. (1996). Coronavirus isolation from nasal swab samples in cattle with signs of respiratory tract disease after shipping. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **208**, 1452–1455.
- Vautherot, J. F., Madelaine, M. F., Boireau, P. & Laporte, J. (1992). Bovine coronavirus peplomer glycoproteins: detailed antigenic analyses of S1, S2 and HE. *Journal of General Virology* **73**, 1725–1737.
- Verbeek, A. & Tijssen, P. (1991). Sequence analysis of the turkey enteric coronavirus nucleocapsid and membrane protein genes: a close genomic relationship with bovine coronavirus. *Journal of General Virology* **72**, 1659–1666.
- Vieler, E., Schlapp, T., Anders, C. & Herbst, W. (1995). Genomic relationship of porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus to bovine coronavirus and human coronavirus OC43 as studied by the use of bovine coronavirus S gene-specific probes. *Archives of Virology* **140**, 1215–1223.
- Vieler, E., Schlapp, T. & Herbst, W. (1996). The region between the M and S genes of porcine haemagglutinating encephalomyelitis virus is highly similar to human coronavirus OC43. *Journal of General Virology* **77**, 1443–1447.
- Vlasak, R., Luytjes, W., Leider, J., Spaan, W. & Palese, P. (1988). The E3 protein of bovine coronavirus is a receptor-destroying enzyme with acetylsterase activity. *Journal of Virology* **62**, 4686–4690.
- Von Heijne, G. (1986). A new method for predicting signal sequence cleavage amino acid sites. *Nucleic Acids Research* **14**, 4683–4690.
- Yoo, D., Parker, M. D., Song, J., Cox, G. J., Deregt, D. & Babiuk, L. A. (1991). Structural analysis of the conformational domains involved in neutralization of bovine coronavirus using deletion mutants of the spike glycoprotein S1 subunit expressed by recombinant baculoviruses. *Virology* **183**, 91–98.

Received 11 March 2002; Accepted 21 May 2002

DEUXIÈME ARTICLE

Single and multiplex RT-PCR for the detection and identification of hemagglutinating
coronaviruses

Accusé de réception

De : j.v.meth@rfc.ucl.ac.uk [<mailto:j.v.meth@rfc.ucl.ac.uk>]
Envoyé : 5 mars, 2003 07:23
À : serge.dea@inrs-iaf.quebec.ca
Objet : VIRMET, Editor's decision: revise, Dea, sergedea_20021206/1,
Single and multiplex...

Dear Prof Dea,

On 06-Dec-2002 you submitted a new paper
number VIRMET_sergedea_20021206/1 to Journal of Virological Methods entitled:

'Single and multiplex RT-PCR for the detection and identification of hemagglutinating
coronaviruses'

The Editorial reference number for this paper is: JVMOL/2002/7

Your paper has been reviewed and requires revision before it can be considered further.
Please revise your paper according to the following comments:

I am pleased to inform you that your paper has been accepted, subject to revision in
accordance with the referees' comments. Correspondence to this effect, together with the
reviews was posted to you on 3rd March, 2003.

Please submit your revision to:
<http://www.elsubmit.com/submit/virmet/sergedea/>

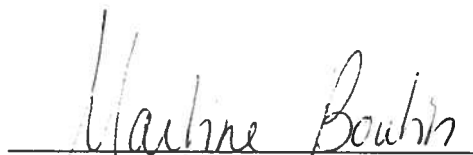
Prof. A. Zuckermann
Editor-in-Chief,
Journal of Virological Methods

Attestation de la contribution des auteurs


Je suis la première auteur sur cet article. Ce travail constitue la portion la plus importante de mon projet de maîtrise. J'ai fait la conception des amorces, la mise au point du multiplex RT-PCR et effectué les tests de sensibilité et de spécificité. Il n'y a que les titres viraux présentés dans cet article qui ont été réalisés par madame Lise Cousineau. La rédaction de cet article est aussi mon œuvre sous l'œil attentif et critique du Dr Serge Dea.

La contribution de la docteur A. Marie-Josée Sasseville, deuxième auteur sur cet article, fut importante puisque ce projet n'aurait pu être réalisé sans l'isolement du HEV IAF-404 et le séquençage des souches HEV 67N et IAF-404. Ses critiques et suggestions scientifiques m'ont permis de mener à bien ce projet.

Le Dr Serge Dea est responsable de l'idée de départ du projet incluant la suggestion des régions les plus intéressantes pour un tel test.


Martine Boutin


Serge Dea


Charles Dozois
(Président de jury)

Résumé en français

Les Coronavirus du 2^{ième} groupe antigénique possèdent de hauts pourcentages d'homologie au niveau de leurs protéines structurales et partagent des déterminants antigéniques importants. Le diagnostic différentiel par la sérologie est à toute fin pratique impossible d'où la nécessité de se tourner vers d'autres méthodes. Cette étude propose une méthode de diagnostic par multiplex RT-PCR. Le but est de pouvoir détecter la présence spécifique de coronavirus du 2^{ième} groupe antigénique tout en permettant de différencier de quelle espèce il s'agit. Le multiplex RT-PCR utilise trois paires d'amorces différentes. La première paire permet l'amplification d'un fragment de 406 pb dans l'ORF de la nucléocapside qui est très conservée chez tous les coronavirus du 2^{ième} groupe antigénique. La seconde paire d'amorces permet l'amplification d'un fragment de 200 pb spécifique à la présence de l'ARN viral des Coronavirus bovin. Ces amorces sont situées dans une région de l'ORF 4 codant pour une protéine non structurale 4.9 kDa qui est absente dans le génome des Coronavirus hémagglutinants porcins et humains. La dernière paire d'amorces permet l'amplification spécifique d'un fragment de 684 pb du génome des HEVs dans la région codant pour la portion S1 de la glycoprotéine S. L'étude a démontré que le multiplex RT-PCR est effectivement spécifique aux Coronavirus hémagglutinants à l'étude dans le respect de leur profil distinct d'amplification. La spécificité a aussi été prouvée par l'analyse de séquence (Appendice C). Il a été aussi démontré que ce test diagnostique pourrait permettre la détection d'aussi peu que 0,06 TCID₅₀ de virus dans un échantillon. La prochaine étape est de tester des échantillons cliniques, mais ce test sous sa forme actuelle semble constituée une alternative intéressante aux tests conventionnels du moins pour l'identification de nouveaux virus mutants émergeant suite à la recombinaison entre les RNAm sous-génomiques de deux de ces virus infectant une même cellule et pour lequel on ne connaîtrait pas la pathogénie.

**Single and multiplex RT-PCR for the detection and identification of
hemagglutinating coronaviruses**

Martine Boutin, A. Marie-Josée Sasseville, Serge Dea

INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, P.Q., Canada, H7V 1B7

**Short title: Genomic differentiation amongst group 2 hemagglutinating
coronaviruses.**

Corresponding author. Mailing address:

Dr Serge Dea

Professor

INRS-Institut Armand-Frappier,

Université du Québec, 531 boul. des Prairies,

Laval, Québec, Canada, H7V 1B7

Phone:(450) 687-5010 extension 4219

Fax:(450) 686-5627

Email address: serge.dea@inrs-iaf.quebec.ca

Abstract.

Bovine coronavirus (BCoV), human respiratory coronavirus OC43 (HCoV-OC43) and porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus (HEV) share antigenic determinants in their structural proteins with high percentages of amino acid identities, making differential diagnosis difficult. In this study, oligonucleotide primers were designed for the development of group-specific and species-specific RT-PCR. One primer pair allowed the amplification of a 406 bp-DNA fragment in the nucleocapsid gene of BCoV, HCoV-OC43 and HEV, and were thus designated as "group-specific" primers. The second primer pair was BCoV specific, since it permitted the amplification of a 200 bp-DNA fragment of ORF4 which is absent in HCoV-OC43 and HEV genomes. The third primer set appeared to be specific to HEV since it allowed the amplification of a 684 bp-DNA fragment of the S1 portion of HEV spike glycoprotein gene. The oligonucleotide primers that have been designed from the specific sequence of individual hemagglutinating coronavirus could be used with similar efficacy in single, duplex or triplex RT-PCRs. The main advantages of the multiplex RT-PCR are an increased specificity for individual virus and the possibility to detect potential genomic variants that could arise following recombination between BCoV, HCoV-OC43 and HEV field isolates or new established genomic variants of these viruses.

Keywords : RT-PCR, detection, differentiation, hemagglutinating coronaviruses, recombination

1. Introduction

Coronaviruses are important pathogens of animals and human beings and are associated with respiratory, enteric, hepatic and/or neurological diseases, as well as immuno-mediated diseases such as feline infectious peritonitis, and other persistent infections (Spaan et al., 1988). The viral genome, comprised of a helicoidal nucleocapsid, consists of a large single-stranded RNA molecule with positive polarity, of approximately 30 kb in length. It encodes for at least four structural proteins: the phosphorylated nucleocapsid protein (N) of 50 to 60 kDa, the integral matrix glycoprotein (M) of 20 to 38 kDa, the small membrane protein of 9.5 kDa (E) and the spike (S) glycoprotein of about 200 kDa which forms long club-shaped surface projections (Dea et al., 1990; Lapps et al., 1987; Spaan et al., 1988). Avian and mammalian coronaviruses usually fall into two distinct and unrelated subgroups (Lai and Holmes, 2001) Two major antigenic and genomic subgroups of mammalian coronaviruses are distinguished. The bovine coronavirus (BCoV), human respiratory coronavirus (HCoV-OC43), porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus (HEV) and mouse hepatitis virus (MHV) belong to the subgroup of mammalian hemagglutinating coronaviruses. Members from this subgroup possess an additional 140 kDa envelope-associated glycoprotein, the hemagglutinin-esterase (HE), which is made of two separate 65 kDa subunits linked together by disulfide bonds (Dea et al., 1990; Hogue and Brian, 1986). The HE glycoprotein is associated to the hemagglutinating and receptor destroying enzyme (RDE) activities (Vlasak et al., 1988). Recent data from the U.S.A. and U.K. indicate that coronaviruses associated with acute enteritis in turkey poult are genetically and antigenically related to infectious bronchitis virus (IBV) of chicken but not to BCoV (Breslin et al., 1999; Cavanagh et al., 2001; Ismail et al., 2001; Loa et al., 2000), contrarily to Canadian and U.S. isolates characterized in the early 1990s (Dea et al., 1990; Verbeek and Tijssen, 1991), even until very recently (Lin et al., 2002).

Except for HCoV-OC43, BCoV and a few field strains of TCoV, the viruses belonging to this subgroup do not seem to cross-react by seroneutralisation (SN) and hemagglutination (HA) inhibition (HAI), but all share analogous antigenic determinants on their structural proteins (Dea et al., 1990; Spaan et al., 1988). Deduced amino acid (aa)

sequences of HEV revealed 89/88%, 80%, 93/92% and 95/94% identities with structural proteins HE, S, M and N of BCoV and HCoV-OC43, respectively (Sasseville et al., 2002), whereas BCoV and HCoV-OC43 structural proteins revealed as much as 92 to 96% aa identities (Spaan et al., 1988).

With the potential risk of recombination between members of this subgroup, notably at the level of subgenomic mRNA synthesis, specific and group specific immunologic or genomic probes are required for a definitive diagnosis and control of possible interspecies infections (Shockley et al., 1987). With the recent advances made in molecular biology, new techniques have become readily available for the detection of fastidious microorganisms. The immense potential of the PCR methodology to specifically amplify minimal amounts of DNA is particularly appealing for the diagnosis of viral diseases.

Amongst modifications of the classical PCR method most relevant to viral diagnosis are nested PCR methods (Christopher-Hennings et al., 1995), multiplex PCR methods (Caron et al., 2000; Ouardani et al., 1999), RT-PCR methods for the detection of RNA viruses (Mardassi et al., 1994b), and quantitative PCR methods (Molitor et al., 1991; Vezina et al., 1995).

Nested PCR methods are known to be highly sensitive and have the useful effect of diluting possible inhibitors that can be present in the original sample. However, the nested PCR increases the risk of template contamination when many samples are tested (Christopher-Hennings et al., 1995). Such methods have been widely used in the last few years with clinical specimens containing only limited amounts of viruses or bacteria known as difficult to propagate *in vitro*. It is mainly recommended in cases of specimens generally toxic for cell cultures like semen, milk, faeces and stomach contents. In pigs and cattle, nested PCR methods are currently used on such specimens forwarded to the diagnostic laboratory for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) (Christopher-Hennings et al., 1995; Shin et al., 1997), porcine transmissible gastroenteritis (TGEV) (Kim et al., 2000), circovirus type 2 (PCV2) (Ouardani et al., 1999), bovine viral diarrhoea virus (BVD-MD) (Rossmanith et al., 2001) and Mycoplasma infections (Caron et al., 2000).

Multiplex PCR or RT-PCR methods are mainly used to increase the specificity of the amplification reaction by targeting simultaneously two different genes of a known pathogen or different regions of a similar gene (Caron et al., 2000; Gilbert et al., 1997; Ouardani et al., 1999). Such PCR methods have been also designed to discriminate between viruses or etiological agents that are genetically closely related such as mycoplasma species in swine (Caron et al., 2000), the pathogenic serotype 2 and a pathogenic serotype 1 of porcine circovirus (Laroche et al., 1999; Ouardani et al., 1999), the European and North American strains of porcine arterivirus (Gilbert et al., 1997; Mardassi et al., 1994b), as well as porcine or human influenza viruses (Choi et al., 2002).

Many regions of the BCoV, HCoV-OC43 and HEV genomes may be considered for the production of group- or species-specific genetic probes. Indeed, in addition to the genes that encode for structural proteins, the 3' terminal end of the coronavirus genome contains the ORF4, which encodes non structural (ns) proteins, and ORF5. The ORF4 encodes for two putative ns proteins of 4.9 and 4.8 kDa, and ORF5 encodes for a putative ns protein of 12.7 kDa and for the E protein. In comparison to BCoV, both European and North American HEV strains, as well as the HCoV-OC43, lack the ORF4 genomic region encoding for the ns 4.8 protein, whereas their ns 4.9 kDa protein is truncated (Mounir and Talbot, 1993a; Mounir and Talbot, 1993b; Sasseville et al., 2002; Vieler et al., 1996). Previous investigators (Mounir and Talbot, 1993a; Mounir and Talbot, 1993b; Vieler et al., 1996) suggested this deletion, which results in a shorter protein, to be involved in the apparently preferential respiratory tropism of HCoV-OC43 and HEV. Interestingly, a truncated ns 4.9 kDa protein was rather identified for respiratory BCoV isolates, as a consequence of mutation of a single specific nucleotide giving rise to a non-sense (stop) codon (Gélinas et al., 2001). In 1995, Vieler *et al.* produced a S1 probe for BCoV that allowed the cross-hybridization to HCoV-OC43 but not to HEV-67N. Thus the genomic relationship between HEV to BCoV and HCoV-OC43 remains to be explored (Vieler et al., 1995). Recently, the sequence of large 3' genome segment of 8.1kb of two different HEV isolates, namely the prototype HEV-67N and the Quebec field IAF-404, has been reported (Sasseville et al., 2002). Sequence comparison with BCoV and HCoV-OC43 revealed significant variations in the S1 portion of the S gene (ORF3) and in the ORF4

that is known to encode for two small non-structural proteins of 4.9 and 4.8 kDa. These variations allowed us to design oligonucleotide primers to develop group-specific, as well as species-specific, single and multiplex RT-PCR for detection of mammalian hemagglutinating coronaviruses.

2. Materials and methods

2.1. Viruses and cells

A cytopathogenic porcine coronavirus, IAF-404, was isolated in the beginning of 1999 from the brain of a parietic weaned piglet from a pig farm in Southern Quebec having experienced a severe outbreak of vomiting and wasting disease affecting pigs of all ages followed by neurological problems in piglets. The virus was propagated in HRT-18G cells (kindly provided to us by J. Storz., School of veterinary medicine, Louisiana State University) and serological identification was confirmed by hemagglutination inhibition (HAI) and indirect immunofluorescence (IIF) (Sasseville et al., 2002). The cell culture-adapted and attenuated Mebus strain of enteric bovine coronavirus (EBCoV) was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC-VR874 strain, Rockville, MD), as well as the reference porcine HEV-67N strain (ATCC-VR741), whereas the prototype HCoV-OC43 strain of human hemagglutinating coronavirus was kindly provided to us by PJ Talbot (INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Quebec, Canada). The prototype OK-0514 strain of respiratory bovine coronavirus (RBCoV) was obtained from J. Storz laboratory (Storz et al., 1996). The BCQ.2590 strain of EBCoV was isolated from fecal specimens of adult cattle from a Quebec dairy farm experiencing a severe outbreak of winter dysentery (Dea et al., 1995). The coronaviruses were propagated for several passages in HRT-18G cells, in the presence of 10 U/ml of bovine pancreatic trypsin to cleave the envelope-associated spike (S) glycoprotein (Abraham et al., 1990; Dea et al., 1980), so as to obtain viral suspensions with infectious titers greater than 5×10^5 TCID₅₀/ml.

For the control of specificity, oligonucleotidic primers used for single or multiplex RT-PCRs were tested for their capacity to generate amplicons from preparations of genomic DNA or RNA extracted from gram-positive and gram-negative bacteria (kindly

provided to us by M. Gottschalk, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, St-Hyacinthe, Qc, Canada), *Mycoplasma* species and viruses commonly colonizing the porcine and/or bovine respiratory tracts (listed in Table 3). The selected viruses included the North American IAF-Klop strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), the Purdue strain of porcine transmissible gastroenteritis virus (TGEV, ATCC VR-763), a USDA isolate of porcine respiratory coronavirus (PRCV; kindly provided by R.D. Wesley, USDA, Ames, IA), the IAF-Q890 strain of porcine encephalomyocarditis virus (EMCV), the IAF-2897 strain of porcine circovirus type 2, the A/H1N1/Sw/Quebec/5393/91 (swQC-91) strain and an A/H3N2 field isolate (obtained from Biovet inc., Minn.) of swine influenza virus, the Colorado strain of bovine herpes type 1 virus, the New York strain of bovine viral diarrhea type I virus and a Quebec field isolate of bovine parainfluenza type 3 virus. The origins, cultivation and purification procedures for these viruses isolated from pigs and cattle with respiratory symptoms have been described elsewhere (Dea et al., 1991; Dea et al., 1990; Elazhary et al., 1984; Mardassi et al., 1994a; Ouardani et al., 1999; Rekik and Dea, 1994; Sasseville et al., 2002). The strains PRRSV IAF-Klop, PCV2 IAF-2897 and *Mycoplasma hyopneumoniae* have been used as positive RNA or DNA extraction control and were also tested for specific amplification in PCR (Caron et al., 2000; Mardassi et al., 1994b; Ouardani et al., 1999).

2.2. Oligonucleotide primers

The oligonucleotide primers were designed according to the cDNA sequence of the Mebus strain of BCoV (EMBL/Gen Bank accession No M31053, M30612 and M76372) and our own cDNA sequences from HEV-67N and IAF-404 (No AY078417 and AF481863). Primers designation, sequences and sizes of the expected amplicons generated with different hemagglutinating coronaviruses are depicted in Table 1. Sequence analyses for the selection of primers were performed using the Gene Works 2.2 (IntelliGenetics Inc., Mountain View, California.) sequence analysis program. The oligonucleotide primers were synthesized in an automated Gene assembler DNA synthesizer (Pharmacia LKB).

2.3. Group-specific and Species-specific RT-PCR

Purified extracellular viruses, from infected clarified supernatant of a 75 cm²-plastic tissue culture flask, were obtained following isopycnic ultracentrifugation onto sucrose cushion (Dea et al., 1989). Genomic RNA was extracted from the sucrose pellet using the TriPure commercial extraction kit (Roche, Laval, Que.). RT reaction mixture consisted of 1/5 (5µl) of extracted RNA added to 50 pmol of downstream primer (Table 1) and 3 µl of DEPC-treated water. The tubes were heated 10 min at 70 °C and placed on ice 3 min before adding 10 µl of RT reaction solution containing 20 mM of dNTPs, 15 units of RNAGuardTM (AmershamPharmacia) and 200 units of M-MLV reverse transcriptase (Gibco BRL). All samples were incubated 1hr at 42 °C, then 5 min at 95 °C for denaturation, and finally chilled on ice for 10min. Two µl of this cDNA preparation were added to the first PCR mixture containing 20 mM of dNTPs and 50 pmol of sense and antisense primers, adjusted to 80 µl with ddH₂O before adding 20 µl of the second PCR mixture. The latter contained 2.5 units of TAQ DNA Polymerase (Gibco BRL) and 5 µl of 50 mM MgCl₂. DNA amplification, using Engine thermocycler (model PT-100 with hot bonnet; MJ Research), was performed according to the following conditions; a preliminary denaturation step of 5 minutes at 94 °C was followed by 35 cycles which included a first step of denaturation at 94°C for 30 sec, a second step of annealing at 58°C for 30 sec and a final step of elongation period at 72°C for 45 sec. Aliquots of 10 µl of the PCR amplified products were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis.

2.4. Multiplex RT-PCR

The mRT-PCR conditions were essentially identical to those of the single RT-PCR, except that 25 pmol of BCoV.N.498.AS, BCoV.6509.4.9.AS and 3'S1HEV.AS were added simultaneously. As in the single PCR, 2 µl of cDNA were added to the first PCR mixture containing 50 pmol of both species-specific BCoV 4.9 and S1 HEV primer pairs, compared to only 25 pmol of group-specific N primers (Table 1). Finally, each PCR product resulting from the mRT-PCR for BCoV Mebus strain, HEV IAF-404 and HCoV-OC43 were purified by gel extraction (Qiaquick gel extraction kit, Qiagen) for sequencing analysis.

2.5. Sensitivity test for single RT-PCR and mRT-PCR

To determine the sensitivity, single RT-PCR and mRT-PCR were performed using specimens that consisted of genomic RNA extracted from 200 µl of serial tenfold dilutions of clarified supernatant fluids from BCoV (Mebus strain) or HEV (IAF-404 strain) infected-HRT-18G cell monolayers. The analytic sensitivities of the RT-PCR methods were determined by considering that the highest positive dilution of the viral suspensions represents the limit of detection. The infectivity titers of undiluted clarified viral suspensions were determined as $10^{7.2}$ TCID₅₀/ml and $10^{7.5}$ TCID₅₀/ml for BCoV and HEV, respectively.

3. Results

3.1 Selection of primer sets by single RT-PCR

The group-specific primers were selected within the N gene because it is highly conserved amongst members of the subgroup of hemagglutinating coronaviruses (Spaan et al., 1988). As depicted in Fig. 1, these primers were able to amplify a 407 bp DNA fragment from the N gene of all hemagglutinating coronaviruses studied (A). In contrast, primers overlapping the genomic region encoding for the 4.9 ns protein allowed the amplification of a 200 bp DNA amplicon only with BCoV isolates (B) and the primer pairs designed from the nt sequence of the S1 portion of the HEV S gene yielded a 684 bp DNA fragment only with both strains of HEV (C). These results gave rise to the parameters for a differential multiplex RT-PCR.

3.2. Development of multiplex RT-PCR

As shown in Fig 2, different multiplex amplification profiles were obtained for individual hemagglutinating coronaviruses. For all these viruses the 407 bp DNA fragment of the N gene could be amplified. Simultaneous amplification of the 200 bp DNA fragment of the ns 4.9 gene was observed only with BCoV strain, whereas the 684 bp DNA fragment of the S1 portion of the S gene was co-amplified only with HEV

isolates. In the case of HCoV-OC43, under the same mRT-PCR conditions, only the N fragment could be amplified even if the reaction mixture also contained the ns 4.9 kDa and S1 primer pairs. Furthermore, the sequence analysis of each mRT-PCR products from Mebus BCoV, HEV IAF-404 and HCoV-OC43 strains revealed that the described primers were targeted specifically to their corresponding regions (Data not shown).

3.3. Sensitivity of viral RNA detection by multiplex RT-PCR.

The group-specific primers, selected within cDNA corresponding to N protein, allowed the detection of 0.06 TCID₅₀ of virus, corresponding to the 10⁻⁶ dilution of clarified supernatant fluid of HRT-18G cells infected with the EBCoV Mebus isolate (see Fig. 3). The same result could be observed for the detection of the 200 bp DNA fragment from the ns 4.9 gene fragment (BCoV-specific). With the HEV-infected supernatant fluid, S1 specific primers permitted the amplification of the expected 684 bp DNA fragment in a 10⁻³ viral dilution corresponding to a sensitivity of 120 TCID₅₀.

3.4. Specificity of oligonucleotide primers for hemagglutinating coronaviruses

The positive RNA or DNA extraction control (PRRSV IAF-Klop, PCV2 IAF-2897 and *Mycoplasma hyopneumoniae*) had a positive reaction for their specific PCR amplification (Data not shown) but no reactivity was obtained by single PCR or RT-PCR with any of the primer sets, designed such as to allow universal or species-specific detection of hemagglutinating coronaviruses, when tested with DNA or RNA of other viruses known to be responsible of respiratory disorders in pigs and cattle. Similarly, no reactivity could be obtained with genomic DNA extracted from gram-positive and gram-negative bacteria as well as *Mycoplasma* species commonly colonizing the porcine and/or bovine respiratory tracts (Table 2).

4. Discussion

In the present study, a multiplex RT-PCR approach was developed for the identification and differentiation of hemagglutinating coronaviruses that have been

classified within the second antigenic subgroup of the family *Coronaviridae* (Dea et al., 1990; Spaan et al., 1988). Contrarily to mammalian coronaviruses and avian coronaviruses classified respectively in the subgroups one and three, and that only show partial antigenic cross-reactivity with other members of their subgroup, the hemagglutinating coronaviruses studied can hardly be distinguished by serological tests using polyclonal species-specific antisera (Dea et al., 1990; Spaan et al., 1988). In fact, the hemagglutinating coronaviruses of this distinct subgroup share unique properties which other coronaviruses lack such as the presence of a second type of surface projection made of an additional glycoprotein, designated as the HE protein, which has been clearly associated to their HA, acetyl-esterase and receptor destroying enzyme activities (Dea et al., 1990; Hogue and Brian, 1986; Vlasak et al., 1988). These coronaviruses, mainly HEV, BCoV, HCoV and a few isolates of TCoV also share analogous antigenic determinants located on each of their structural proteins, although they can be distinguished by hemagglutination-inhibition and seroneutralization (Dea et al., 1990; Shockley et al., 1987; Spaan et al., 1988).

Previous investigators demonstrated that cloned cDNAs corresponding to the N and M protein encoding genes of TGEV and BCoV could be used as hybridization probes to identify coronaviruses antigenically closely related to the parental virus but not to coronaviruses of other antigenic subgroups, therefore confirming the analogy that exists between the genomic and antigenic classification of coronaviruses (Shockley et al., 1987; Verbeek et al., 1990). As for HEV and TGEV, two antigenically-related coronaviruses responsible for endemic infections in pigs, the analogous human respiratory HCoV-229E and HCoV-OC43 are diagnosed in clinical specimens by RT-PCR using distinct primers corresponding to the N and M genes, followed by molecular hybridization of the PCR product with a specific probe recognizing either HCoV-229E or HCoV-OC43. These species-specific probes allow both a control of the specificity and an increase of the RT-PCR sensitivity in the range of 0.05 TCID₅₀ for HCoV-229E and 0.01 TCID₅₀ for HCoV-OC43, respectively (Vabret et al., 2001). In these previous reports, primers allowing amplification and distinction of both human and porcine coronaviruses were chosen in the N and M genes since they respectively encode for the more conserved proteins, among viruses from the same subgroup, and more abundant structural proteins synthesized in the

infected cells, which also contain large amounts of the corresponding mRNAs (Spaan et al., 1988).

Oligonucleotide primers selected and retained as universal primers for the detection of the above mentioned hemagglutinating coronaviruses were also designed from the N gene since viruses from this subgroup, including EBCoV (neonatal calf diarrhea, winter dysentery in adult cattle) and RBCoV isolates, display 96% to 99% amino acid (aa) identities when compared to each other (Sasseville et al., 2002), but less than 35% to 65% aa identities when compared to coronaviruses of the two other subgroups (Abraham et al., 1990; Lapps et al., 1987; Spaan et al., 1988; Verbeek and Tijssen, 1991). Interestingly, the sensitivity of the single RT-PCR with those universal primers was estimated to 0.06 TCID₅₀ thus within the range as that previously reported by others following an additional hybridization step with a non-radioactive N probe (Vabret et al., 2001; Verbeek and Tijssen, 1991) to detect the RT-PCR products. Furthermore, the single PCR reactions with those universal primers were found to be highly specific to the hemagglutinating coronaviruses, as no reactivity was observed with genomic DNA or RNA extracted from bacteria, mycoplasmas and DNA or RNA viruses commonly associated with respiratory diseases in pigs and cattle.

To genetically differentiate HEV from BCoV and HCoV, targeting the HE, N, M and E encoded genes was irrelevant because of the very high percentages of aa identities (>90-100%) that exist for the analogous proteins in the same subgroup members. Indeed, only point mutations or randomly distributed nt or aa substitutions could be identified amongst sequences of those structural genes (Gélinas et al., 2001; Sasseville et al., 2002; Zhang et al., 1992). However, HEV specific primers could be designed from the S1 nt sequences for which percentages of aa identities in the range of 80% were previously reported by comparison of HEV isolates to the reference Mebus strain of EBCoV and to HCoV-OC43 (Mounir and Talbot, 1993b; Sasseville et al., 2002). As expected, variations of the predicted aa sequence of the HEV S protein appeared to be concentrated in the S1 moieties with only 73/71% identities with that of BCoV and HCoV-OC43, more precisely in the portion extending from aa469 to aa593 corresponding to the hypervariable region of S1 (Parker and Buchmeier, 1990; Rekik and Dea, 1994; Yoo et al., 1991). However, the described HEV-specific primers were apparently 2000 times less sensitive than the

used group-specific primers. Nevertheless, the use of the HEV-specific primer set still remains interesting because of its ability to detect at least 120 TCID₅₀.

Finally, to differentiate HEV and HCoV-OC43 isolates from BCoV, primers were designed from the nt sequence of the Mebus strain of BCoV in the ORF4 genomic region. This region, located immediately downstream of the S gene, encodes for two small non-structural proteins of BCoV designated ns 4.8 and ns 4.9. These proteins are respectively deleted and truncated in both HEV and HCoV-OC43 genomes, thus resulting in distinct amplification profiles for these hemagglutinating coronaviruses with an apparently preferential respiratory tropism (Mounir and Talbot, 1993a; Mounir and Talbot, 1993b; Sasseville et al., 2002; Vieler et al., 1996), an assumption also plausible in the case of RBCoV isolates (Gélinas et al., 2001). The sensitivity of the viral detection with BCoV 4.9 primers was evaluated at 0.06 TCID₅₀, as observed for PCR using the universal primers.

All these oligonucleotide primers were designed from the specific sequences of individual hemagglutinating coronaviruses and could be used with similar efficiency in single, duplex or triplex RT-PCR (data not shown). However, the main advantages of the multiplex RT-PCR in comparison with single RT-PCR are thought to be an increased specificity for individual virus and the possibility to detect new established genomic variants of BCoV and HEV field isolates, as well as potential genomic variants that could arise following recombination between both viruses. Indeed, homologous RNA recombination has been demonstrated for coronaviruses (Lai et al., 1985). During a mixed infection of two MHV strains, *in vitro* or *in vivo*, RNA recombination occurred at high frequencies (Lai et al., 1985; Makino et al., 1986). The frequency of recombination for the entire MHV genome has been estimated to be 25% (Baric et al., 1990). At present, it is not known how widespread homologous RNA recombination is among other coronaviruses, except for IBV in avian species (Kusters et al., 1990). Moreover, although coronavirus RNA recombination was first thought to take place at certain "hot spots" (Banner et al., 1990), it was later recognized that recombination is almost random and that these previously identified "hot spots" resulted from selection of recombinant viruses by a copy-choice mechanism (Liao and Lai, 1992).

It is also of great interest that data from a recent sequencing study demonstrated that porcine HEV remains genetically stable since its first isolation in North America in 1962 (Sasseville et al., 2002). However, it is noteworthy that the sequenced genomic region does not represent more than 30-40% of the complete genome. The remaining 60 to 70% of the genome encodes for the RNA-dependent RNA-polymerase and other enzymes associated with virus replication. It would also be of interest to test swine specimens from pigsties built on sites of previous dairy farms or located in regions with extensive bovine production for possible isolation of new variants or mutants emerging from a possible RNA recombination mechanism involving HEV and BCoV with non-predictable pathogenesis for both species, and possibly humans. The reactivity of human specimens to HEV S1-specific primers, as well as the reactivity of porcine clinical specimens to BCoV and HCoV-OC43-specific primers, or immunologic probes such as monoclonal antibodies, should also be investigated considering the possibilities of RNA recombination between these closely related coronaviruses. The molecular approach described in the present report must be considered as one of the possibilities that could permit detection of such mutants and identification of the parental coronavirus involved.

Acknowledgements

The authors want to acknowledge the technical assistance of Lise Cousineau. We also thank Dr. Claude Montpetit, Ministère de l'Agriculture des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec and Dr Marcello Gottschalk, Department of Microbiology and Pathology, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, who respectively provided most of the viruses and bacterial species used as controls. This report was taken in part from a dissertation to be submitted by M. Boutin to the INRS-Institut Armand-Frappier, in partial fulfillment of the requirements for the MSc degree. A. M.-J. Sasseville was a recipient of a post-doctoral fellowship from the Fondation Armand-Frappier. This research was sponsored by an operating grant received from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (Grant # OGPOO46412).

References

- Abraham, S., Kienzle, T.E., Lapps, W. and Brian, D.A. (1990) Deduced sequence of the bovine coronavirus spike protein and identification of the internal proteolytic cleavage site. *Virology* 176(1), 296-301.
- Banner, L.R., Keck, J.G. and Lai, M.M. (1990) A clustering of RNA recombination sites adjacent to a hypervariable region of the peplomer gene of murine coronavirus. *Virology* 175(2), 548-55.
- Baric, R.S., Fu, K., Schaad, M.C. and Stohlman, S.A. (1990) Establishing a genetic recombination map for murine coronavirus strain A59 complementation groups. *Virology* 177(2), 646-56.
- Breslin, J.J., Smith, L.G., Fuller, F.G. and Guy, J.S. (1999) Sequences analysis of the turkey coronavirus nucleocapsid gene and 3' untranslated region identifies the virus as a close relative of infectious bronchitis virus. *Virus Res.* 65, 187-98.
- Caron, J., Ouardani, M. and Dea, S. (2000) Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes. *J. Clin. Microbiol.* 38(4), 1390-6.
- Cavanagh, D., Mawdiit, K., Sharma, M., Drury, S.E., Ainsworth, H.L., Britton, P. and Gouch, R.E. (2001) Detection of a coronavirus from turkey poults in Europe genetically related to infectious bronchitis virus of chickens. *Avian Pathol.* 30, 365-78.
- Choi, Y.K., Goyal, S.M., Kang, S.W., Farnham, M.W. and Joo, H.S. (2002) Detection and subtyping of swine influenza H1N1, H1N2 and H3N2 viruses in clinical samples using two multiplex RT-PCR assays. *J. Virol. Methods* 102(1-2), 53-9.
- Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., Nelson, J.K., Hines, R.J., Swenson, S.L., Hill, H.T., Zimmerman, J.J., Katz, J.B., Yaeger, M.J., Chase, C.C.L. and Benfield, D.A. (1995) Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1730-1734.
- Dea, S., Bilodeau, R., Sauvageau, R. and Martineau, G.P. (1991) Outbreaks in Quebec pig farms of respiratory and reproductive problems associated with encephalomyocarditis virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3(4), 275-82.
- Dea, S., Garzon, S. and Tijssen, P. (1989) Isolation and trypsin-enhanced propagation of turkey enteric (bluecomb) coronaviruses in a continuous human rectal adenocarcinoma cell line. *Am. J. Vet. Res.* 50(8), 1310-8.
- Dea, S., Michaud, L. and Milane, G. (1995) Comparison of bovine coronavirus isolates associated with neonatal calf diarrhoea and winter dysentery in adult dairy cattle in Quebec. *J. Gen. Virol.* 76(Pt 5), 1263-70.

- Dea, S., Roy, R.S. and Begin, M.E. (1980) Bovine coronavirus isolation and cultivation in continuous cell lines. *Am. J. Vet. Res.* 41(1), 30-8.
- Dea, S., Verbeek, A.J. and Tijssen, P. (1990) Antigenic and genomic relationships among turkey and bovine enteric coronaviruses. *J. Virol.* 64(6), 3112-8.
- Elazhary, M.A., Silim, A. and Dea, S. (1984) Prevalence of antibodies to bovine respiratory syncytial virus, bovine viral diarrhoea virus, bovine herpesvirus-1, and bovine parainfluenza-3 virus in sheep and goats in Quebec. *Am. J. Vet. Res.* 45(8), 1660-2.
- Gélinas, A.M., Boutin, M., Sasseville, A.M. and Dea, S. (2001) Bovine coronaviruses associated with enteric and respiratory diseases in Canadian dairy cattle display different reactivities to anti-HE monoclonal antibodies and distinct amino acid changes in their HE, S and ns4.9 protein. *Virus Res.* 76(1), 43-57.
- Gilbert, S.A., Larochelle, R., Magar, R., Cho, H.G. and Deregt, D. (1997) Typing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by multiplex PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 35, 264-267.
- Hogue, B.G. and Brian, D.A. (1986) Structural proteins of human respiratory coronavirus OC43. *Virus Res.* 5(2-3), 131-44.
- Ismail, M.M., Cho, K.O., Hasoksuz, M., Saif, L.J. and Saif, Y.M. (2001) Antigenic and genomic relatedness of turkey-origin coronaviruses, bovine coronaviruses, and infectious bronchitis virus of chickens. *Avian Dis.* 45(4), 978-84.
- Kim, L., Chang, K.O., Sestak, K., Parwani, A. and Saif, L.J. (2000) Development of a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay for differential diagnosis of transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus from feces and nasal swabs of infected pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12(4), 385-8.
- Kusters, J.G., Jager, E.J., Niesters, H.G. and van der Zeijst, B.A. (1990) Sequence evidence for RNA recombination in field isolates of avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Vaccine* 8(6), 605-8.
- Lai, M.M., Baric, R.S., Makino, S., Keck, J.G., Egbert, J., Leibowitz, J.L. and Stohlman, S.A. (1985) Recombination between nonsegmented RNA genomes of murine coronaviruses. *J. Virol.* 56(2), 449-56.
- Lai, M.M.C. and Holmes, K.V. (2001) *Coronaviridae: The viruses and their replication*. In: S.E. Straus (Ed), *Fields Virology*, 4 ed, Vol. 1, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1163-1185.
- Lapps, W., Hogue, B.G. and Brian, D.A. (1987) Sequence analysis of the bovine coronavirus nucleocapsid and matrix protein genes. *Virology* 157(1), 47-57.

- Larochelle, R., Antaya, M., Morin, M. and Magar, R. (1999) Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. *J. Virol. Methods* 80(1), 69-75.
- Liao, C.L. and Lai, M.M. (1992) RNA recombination in a coronavirus: recombination between viral genomic RNA and transfected RNA fragments. *J. Virol.* 66(10), 6117-24.
- Lin, T.I., Tsai, S.C., Wu, C.C., Bryan, T.A., Thaker, H.L., Hooper, T. and Schrader, D. (2002) Characterization of turkey coronaviruses from turkey poult with acute enteritis. *Vet. Microbiol.* 84, 179-86.
- Loa, C.C., Lin, T.I., Wu, C.C., Bryan, T.A., Thaker, H.L., Hooper, T. and Schrader, D. (2000) detection of antibody, to turkey coronavirus by antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay utilizing infectious bronchitis virus. *Avian Dis.* 44, 498-506.
- Makino, S., Keck, J.G., Stohlman, S.A. and Lai, M.M. (1986) High-frequency RNA recombination of murine coronaviruses. *J. Virol.* 57(3), 729-37.
- Mardassi, H., Athanassious, R., Mounir, S. and Dea, S. (1994a) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: morphological, biochemical and serological characteristics of Quebec isolates associated with acute and chronic outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome. *Can. J. Vet. Res.* 58(1), 55-64.
- Mardassi, H., Wilson, L., Mounir, S. and Dea, S. (1994b) Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and efficient differentiation between Canadian and European strains by reverse transcription and PCR amplification. *J. Clin. Microbiol.* 32(9), 2197-203.
- Molitor, T.W., Oraveerakul, K., Zhang, Q.Q., Choi, C.S. and Ludemann, L.R. (1991) Polymerase chain reaction (PCR) amplification for the detection of porcine parvovirus. *J. Virol. Methods* 32(2-3), 201-11.
- Mounir, S. and Talbot, P.J. (1993a) Human coronavirus OC43 RNA 4 lacks two open reading frames located downstream of the S gene of bovine coronavirus. *Virology* 192(1), 355-60.
- Mounir, S. and Talbot, P.J. (1993b) Molecular characterization of the S protein gene of human coronavirus OC43. *J. Gen. Virol.* 74(Pt 9), 1981-7.
- Ouardani, M., Wilson, L., Jette, R., Montpetit, C. and Dea, S. (1999) Multiplex PCR for detection and typing of porcine circoviruses. *J. Clin. Microbiol.* 37(12), 3917-24.
- Parker, S.E. and Buchmeier, M.J. (1990) RNA sequence analysis of the E2 genes of wildtype and neuroattenuated mutants of MHV-4 reveals a hypervariable domain. *Adv. Exp. Med. Biol.* 276, 395-402.

- Rekik, M.R. and Dea, S. (1994) Comparative sequence analysis of a polymorphic region of the spike glycoprotein S1 subunit of enteric bovine coronavirus isolates. *Arch. Virol.* 135(3-4), 319-31.
- Rossmannith, W., Vilcek, S., Wenzl, H., Rossmannith, E., Loitsch, A., Durkovic, B., Strojny, L. and Paton, D.J. (2001) Improved antigen and nucleic acid detection in a bovine virus diarrhoea eradication program. *Vet. Microbiol.* 81(3), 207-18.
- Sasseville, A.M.-J., Boutin, M., Sawyer, N., Gélinas, A.M. and Dea, S. (2002) Sequence of 3'-terminal end (8.1 kb) of the genome of porcine haemagglutinating encephalomyelitis virus: comparison with other haemagglutinating coronaviruses. *J. Gen. Virol.* 83, 2411-6.
- Shin, J., Torrison, J., Choi, C.S., Gonzalez, S.M., Crabo, B.G. and Molitor, T.W. (1997) Monitoring of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in boars. *Vet. Microbiol.* 55(1-4), 337-46.
- Shockley, L.J., Kapke, P.A., Lapps, W., Brian, D.A., Potgieter, L.N. and Woods, R. (1987) Diagnosis of porcine and bovine enteric coronavirus infections using cloned cDNA probes. *J. Clin. Microbiol.* 25(9), 1591-6.
- Spaan, W., Cavanagh, D. and Horzinek, M.C. (1988) Coronaviruses: structure and genome expression. *J. Gen. Virol.* 69(Pt 12), 2939-52.
- Storz, J., Stine, L., Liem, A. and Anderson, G.A. (1996) Coronavirus isolation from nasal swap samples in cattle with signs of respiratory tract disease after shipping. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208(9), 1452-5.
- Vabret, A., Mouthon, F., Mourez, T., Gouarin, S., Petitjean, J. and Freymuth, F. (2001) Direct diagnosis of human respiratory coronaviruses 229E and OC43 by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 97(1-2), 59-66.
- Verbeek, A. and Tijssen, P. (1991) Sequence analysis of the turkey enteric coronavirus nucleocapsid and membrane protein genes: a close genomic relationship with bovine coronavirus. *J. Gen. Virol.* 72(Pt 7), 1659-66.
- Verbeek, A.J., Dea, S. and Tijssen, P. (1990) Bovine enteric coronavirus detection by molecular probes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 276, 467-472.
- Vezina, S.A., Roberge, D., Fournier, M., Dea, S., Oth, D. and Archambault, D. (1995) Cloning of porcine cytokine-specific cDNAs and detection of porcine tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 (IL-6), and IL-1 beta gene expression by reverse transcription PCR and chemiluminescence hybridization. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2(6), 665-71.

- Vieler, E., Schlapp, T., Anders, C. and Herbst, W. (1995) Genomic relationship of porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus to bovine coronavirus and human coronavirus OC43 as studied by the use of bovine coronavirus S gene-specific probes. *Arch. Virol.* 140(7), 1215-23.
- Vieler, E., Schlapp, T. and Herbst, W. (1996) The region between the M and S genes of porcine haemagglutinating encephalomyelitis virus is highly similar to human coronavirus OC43. *J. Gen. Virol.* 77(Pt 7), 1443-7.
- Vlasak, R., Luytjes, W., Leider, J., Spaan, W. and Palese, P. (1988) The E3 protein of bovine coronavirus is a receptor-destroying enzyme with acetylcysteine activity. *J. Virol.* 62(12), 4686-90.
- Yoo, D.W., Parker, M.D., Song, J., Cox, G.J., Deregt, D. and Babiuk, L.A. (1991) Structural analysis of the conformational domains involved in neutralization of bovine coronavirus using deletion mutants of the spike glycoprotein S1 subunit expressed by recombinant baculoviruses. *Virology* 183(1), 91-8.
- Zhang, X.M., Kousoulas, K.G. and Storz, J. (1992) The hemagglutinin/esterase gene of human coronavirus strain OC43: phylogenetic relationships to bovine and murine coronaviruses and influenza C virus. *Virology* 186(1), 318-23.

Table 1

Primers designed for RT-PCR of hemagglutinating coronaviruses

Primers	Sequence (5'-3')	Length (bp)	Expected RT-PCR results		
			(R-E)BCoV	HEV	HCoV-OC43
BCoV.N.92.S*	GCCGATCAGTCCACCAATC	406	+	+	+
BCoV.N.498.AS*	AGAATGTCAGCCGGGGTAT				
BCoV.6309.4.9.S	GACCCATTGAGGTCGAGCAT	200	+	-	-
BCoV.6509.4.9.AS	CCAGTGGTGCTAGTGTCAATAC				
5'S1.HEV.S	CCGTTTCTTCGCCTCTT	684	-	+	-
3'S1.HEV.AS	CTCCAGCCTAGAAGCC				

* From Tsunemitsu et al., 1994

Table 2

Microorganisms used for testing the specificity of group- and species-specific primers

Viruses and bacteria sp	Strain	Titer TCID ₅₀ /ml	PCR amplification with primers for		
			2 ^{sd} group N	BCoV 4.9	HEV S1
Swine viruses					
PRRSV	IAF-Klop	10 ^{4.5}	-	-	-
TGEV	Purdue	10 ^{5.8}	-	-	-
PRCV	Wesley	10 ^{3.9}	-	-	-
PPV	NADL II	10 ^{5.2}	-	-	-
EMC	IAF-Qc890	10 ^{8.4}	-	-	-
Influenza virus H1N1	A/SW/Qc91	10 ⁵	-	-	-
Influenza virus H3N2	A/SW/Minn 2000	10 ^{3.5}	-	-	-
PCV type 2	PMWS; IAF-2897	10 ^{6.7}	-	-	-
HEV	IAF- 404	10 ^{7.5}	+	-	+
Bovine viruses					
BVDV	ATCC VR-534	10 ^{6.8}	-	-	-
IBR	ATCC VR-864	10 ^{7.7}	-	-	-
PI3	ATCC VR-281	10 ^{6.1}	-	-	-
EBCoV	ATCC VR-874	10 ^{7.2}	+	+	-
Bacteria sp					
<i>Escherichia coli</i>	K99 O9:K30:F5	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	K88 O149:K91:F4	-	-	-	-
<i>Streptococcus suis</i>	R735 serotype 2	-	-	-	-
<i>Haemophilus parasuis</i>	SW114 serotype3	-	-	-	-
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	4074 serotype 1	-	-	-	-
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	81-750 serotype 5	-	-	-	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	ATCC-19345	-	-	-	-
<i>Pasteurella multocida</i>	ATCC-12948	-	-	-	-
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	ATCC-25934	-	-	-	-
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	ATCC-17981	-	-	-	-
<i>Mycoplasma bovis</i>	ATCC-25523	-	-	-	-

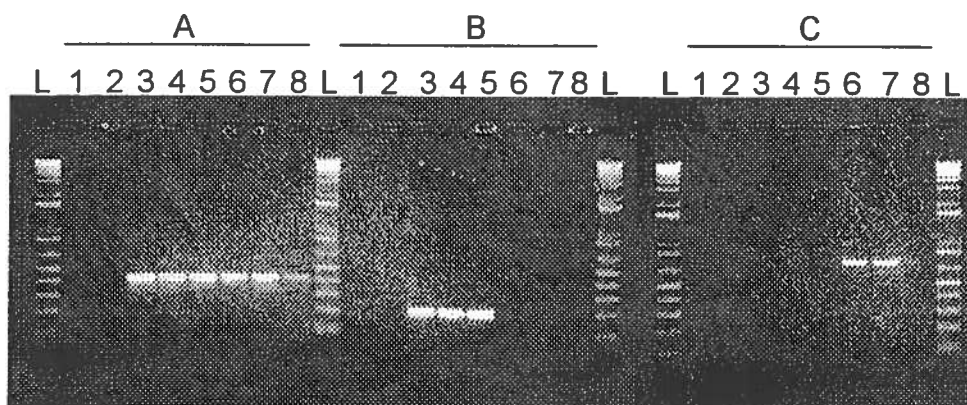


Fig. 1 Electrophoretic profiles of BCoV, HCoV-OC43 and HEV gene fragments amplified by single RT-PCR A, Reactivity of N-group-specific primers (406 bp); B, Reactivity of BCoV specific primers, directed to ORF4 (200 bp); C, Reactivity of HEV-specific primers, directed to S1 portion of S gene (684 bp); L, molecular weight marker (1 kb⁺ DNA ladder, Invitrogen); 1, Negative control (H₂O); 2, Cellular control (HRT-18); 3, Purified virus BCoV VR874; 4, Purified virus BCQ WD2590; 5, Purified virus RBCoV OK-514; 6, Purified virus HEV 67N; 7, Purified virus HEV IAF-404; 8, Purified virus HCoV-OC43.

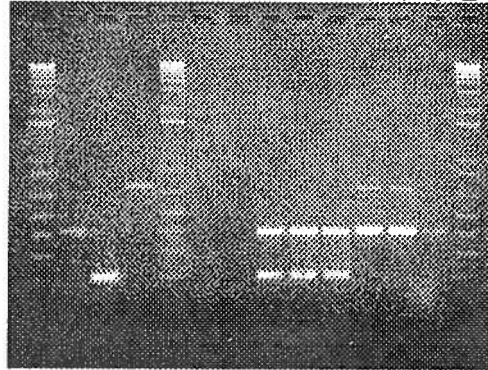


Fig. 2 Electrophoretic profiles of BCoV, HCoV-OC43 and HEV gene fragments amplified by multiplex RT-PCR. A, single PCR product of HCoV-OC43 with N primers (406 bp); B, Single PCR product of VR-874 with 4.9 primers (200 bp); C, single PCR product of HEV 67N with S1 primers (684 bp); L, molecular weight marker (1 kb⁺ DNA ladder, Invitrogen); 1, Negative control (H₂O); 2, Cellular control (HRT-18); 3, Purified virus BCoV VR874; 4, Purified virus BCQ WD2590; 5, Purified virus RBCoV OK-514; 6, Purified virus HEV 67N; 7, Purified virus HEV IAF-404; 8, Purified virus HCoV-OC43.

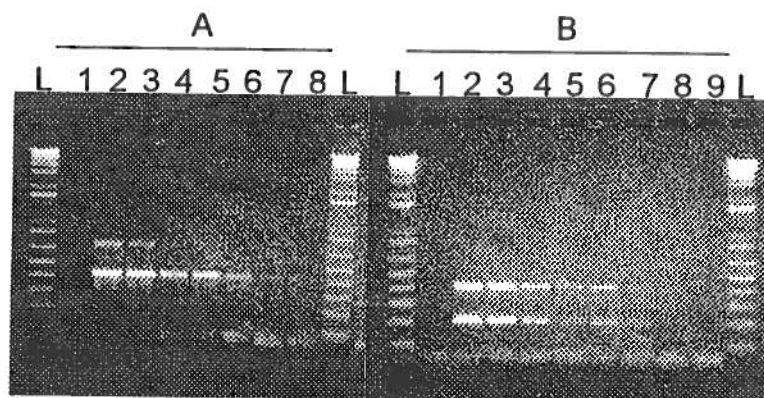


Fig. 3 Electrophoretic profiles of ten-fold dilution of HEV and BCoV viral supernatant amplified by multiplex PCR. A, Multiplex RT-PCR for HEV IAF-404 viral supernatant; B, Multiplex RT-PCR for BCoV viral supernatant; L, molecular weight marker (1 kb⁺ DNA ladder, Invitrogen); 1, Negative control (H₂O); 2, Undiluted viral supernatant; 3, dilution 10⁻¹; 4, dilution 10⁻²; 5, dilution 10⁻³; 6, dilution 10⁻⁴; 7, dilution 10⁻⁵; 8, dilution 10⁻⁶; 9, dilution 10⁻⁷

TROISIÈME ARTICLE

Characterization of a Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus Field Strain
Associated with Acute Outbreaks of a Wasting Syndrome and Encephalitis in a Confined
Quebec Pig Farm

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY
*Journals Department*1752 N STREET, N.W.
WASHINGTON, DC 20036-2904
TEL: (202) 737-3600
FAX: (202) 942-9355

Dr. S. Dea
INRS-Institut Armand-Frappier
Centre de Microbiologie et
Biotechnologie
Université du Québec
531 boul. des Prairies, Laval
Québec, H7V 1B7
CANADA

30 December 2002
Received: 12/26/02
Article: JCM 1856-02

Title: Characterization of a Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus Field Strain Associated with Acute Outbreaks of a Wasting Syndrome and Encephalitis in a Confined Quebec Pig Farm

The above manuscript has been received. It is being referred to Dr. Andrew B. Onderdonk, Channing Laboratory, 181 Longwood Avenue, Boston, MA 02115-5804 (phone 617-525-2270, fax 617-731-1541, e-mail aonderdonk@partners.org), who will notify you as to its acceptability or suggestions for improvement. In any communications relating to this paper, please refer to the article number shown above.

In submitting this manuscript to the *Journal of Clinical Microbiology*, the author(s) guarantees that a manuscript with substantially the same content has not been submitted or published elsewhere.

By publishing in the journal, the authors agree that any plasmids, viruses, and living materials such as microbial strains and cell lines newly described in the article are available from a national collection or will be made available in a timely fashion and at reasonable cost to members of the scientific community for noncommercial purposes.

If "in press" references cited in the submitted manuscript are important for it to be judged, send three copies of each to Dr. Onderdonk immediately. Failure to do so may delay the review.

If your manuscript is accepted for publication, a condition of acceptance is that you assign copyright to the American Society for Microbiology. A copyright transfer agreement is sent with each letter of acceptance.

If the manuscript is accepted for publication in a 2003 issue, page charges (subject to change without notice) will be assessed at \$42 per page for the first four pages and \$56 for each page in excess of four for a corresponding author who is an ASM member or \$49 per page for the first four pages and \$64 for each page in excess of four for a nonmember corresponding author. To obtain the member rate, a member corresponding author must include his 2003 member number on the reprint/page charge form that will be included with the proofs. To obtain the member rate, a nonmember corresponding author should complete the enclosed ASM membership application and submit it and payment of the membership fee to ASM. If the research was not supported, you may send a request for a waiver of page charges to the Director, Journals. This request must indicate how the work was financed and should be accompanied by copies of the title page and the Acknowledgments section of the paper.

If your manuscript is accepted for publication, you will be required to provide a current e-mail address in the correspondent footnote since proofs will be handled electronically.

Thank you for submitting your manuscript for consideration.

Tasha Thomasian
Production Editor
Journal of
Clinical Microbiology

Attestation de la contribution des auteurs

Docteur A. Marie-Josée Sasseville est la première auteur de cet article. Elle a participé à l'isolement de la souche HEV IAF-404, avec l'aide de Mme Nicole Sawyer et Mme Raymonde Jetté, cette dernière oeuvrant pour les services d'analyse virologiques INRS-IAF-MAPAQ sous la tutelle du Dr Claude Monpetit. Tous les tests d'activités biologiques présentés dans cet article ont été réalisés de concert entre docteur Sasseville et Mme Sawyer. J'ai effectué les tests préliminaires en immunofluorescence indirecte sur les anticorps monoclonaux (AcMo) Anti-N mais c'est Dr Sasseville qui a complété les expériences pour les présenter dans cet article. La figure 2-B et la figure 3 ont été réalisées par Dr Sasseville. Finalement, elle est la responsable de la rédaction de cet article.

Je suis deuxième auteur sur cet article. En plus de ma contribution présentée ci-haut, j'ai préparé les fractions protéiques qui ont servi à l'immunisation des souris Balb/c pour les fusions anti-S et anti-HE de la souche HEV IAF-404. La fusion Anti-S et la sélection des AcMo, de même que les tests sérologiques se rapportant aux 9 premiers AcMo anti-S présentés dans cet article ont aussi été mon oeuvre. J'ai réalisé la figure 1 de cet article en m'inspirant d'une figure de Field's Virology.

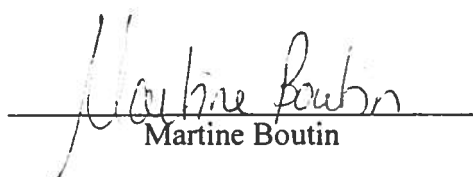
La contribution de madame Chabot consista dans la réalisation de la fusion anti-HE de la souche HEV IAF-404, qui a fourni trois autres AcMo anti-S et les 3 AcMo anti-HE présentés dans cet article. Les tests sérologiques se rapportant à ces 6 AcMo sont aussi sa réalisation. La figure 2-A a été réalisée conjointement par mme Chabot et moi-même. J'ai aussi aidé madame Chabot pour la conception et la réalisation des expériences menant aux résultats présentés dans l'article.

La contribution de Dr Ali Kheyar consiste en une supervision et en une aide technique précieuse. Sans lui, les fusions anti-S et anti-HE de la souche HEV IAF-404, n'auraient pu être menées à bien. Ses critiques et suggestions scientifiques sont aussi à souligner.

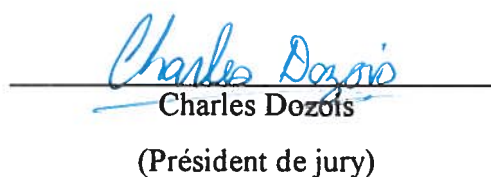
En ce qui concerne la microscopie à la figure 2-C, c'est le résultat d'une infection par la souche HEV IAF-404 qui a été photographié par monsieur Robert Alain, responsable du service de la microscopie électronique de l'INRS-Institut Armand-Frappier.

La fusion et la sélection des anticorps monoclonaux anti-N de HEV 67N ont été l'oeuvre du Dr. Serge Dea et de mme Nicole Sawyer.

Le Dr. Serge Dea fut responsable de la supervision de ce projet en plus d'être l'instigateur de l'ajout des résultats obtenus par madame Chabot et moi-même à cet article.


Martine Boutin


Serge Dea


Charles Dozois
(Président de jury)

Résumé en français

En 1998 et en 1999, il y eu de sévères manifestations cliniques de symptômes liés à une infection par le virus HEV dans les fermes du Québec et de l'Ontario. Les porcelets infectés manifestaient des désordres du système nerveux central, majoritairement une paralysie des membres postérieurs, et les taux de mortalité s'approchaient de 100%. La souche IAF-404 fut isolée, à partir d'un cerveau de porcelet infecté, sur une lignée cellulaire d'adénocarcinome rectal humain (HRT-18). Cet isolat, qui provoque la formation de larges syncytia, fut identifié comme un coronavirus HEV par une réaction positive en immunofluorescence indirecte (IFI) avec un anti-sérum de lapin dirigé contre la souche de référence HEV 67N. La séquence des gènes codant pour des protéines structurales permit de confirmer la filiation avec la souche HEV 67N. Cet article présente l'isolement de HEV IAF-404 ainsi que les activités biologiques des virus HEV IAF-404 et 67N. De plus, des études sérologiques effectuées avec des anticorps monoclonaux dirigé contre la protéine N de la souche prototype HEV 67N et contre les glycoprotéines S et HE de la souche IAF-404 sont présentées. L'isolat IAF-404 possède les activités acétyl-estérase d'hémagglutination et de destruction enzymatique du récepteur alors que cette dernière activité n'est pas observée avec la souche 67N. Parmi les AcMo étudiés, 1 anti-N, 1 anti-HE et 9 anti-S ont réagi spécifique en IFI contre les deux souches de HEV alors qu'un seul anti-HE a réagi contre la souche IAF-404 seulement. Un anti-HE et un anti-S possédaient la capacité d'inhiber l'hémagglutination de la souche IAF-404 et 6 AcMo anti-S ont permis la séroneutralisation de cette même souche. Il n'existe pas encore de vaccin commercial contre le HEV, mais les résultats obtenus au cours de cette étude constituent une première étape pour la détermination des épitopes impliqués dans l'infection virale de l'hôte et dans les mécanismes d'évasion du système immunitaire.

Characterization of a Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus Field Strain Associated with Acute Outbreaks of a Wasting Syndrome and Encephalitis in a Confined Quebec Pig Farm

A. M.-J. SASSEVILLE¹, M. BOUTIN¹, S. CHABOT¹, A. KHEYAR,¹ C.MONTPETIT^{1,2}
AND S. DEA^{1*}.

¹INRS-Institut Armand-Frappier, Centre de Microbiologie et Biotechnologie; ²Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ), INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7.

Short title: Characterization of a porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus field isolate.

Paper length: Summary: 250 words, Text: 4170 words, including acknowledgments.

* Corresponding author. Mailing address:

Dr Serge Dea, professor

INRS-Institut Armand-Frappier,

Centre de Microbiologie et Biotechnologie

Université du Québec,

531 boul. des Prairies, Laval,

Québec, Canada, H7V 1B7

Phone: (450) 687-5010, extension 4219.

Fax: (450) 686-5627.

Email: serge.dea@inrs-iaf.quebec.ca

From fall 1998 to fall 1999, several clinical manifestations suggestive of porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus (HEV) infections have been reported in Quebec and Ontario. Some newborn piglets were affected by the vomiting and wasting form of the disease. Further, in all cases early weaned pigs (2 to 5%) manifested clinical signs of CNS involvement, mainly a posterior paralysis, with mortality that reached 100%. A cytopathic coronavirus, serologically identified as HEV-IAF-404, was isolated in HRT-18 cells from the brain of a paretic weaned piglet. Identification was confirmed by indirect immunofluorescence (IIF) using a reference rabbit anti-HEV-67N hyperimmune serum. The HEV-IAF-404 displayed hemagglutinating, acetyl esterase and RDE activities. The deduced amino acid (aa) sequences of both HEV isolates revealed 89/88%, 80/80%, 93/92% and 95/94% identities within structural proteins HE, S, M and N of bovine (BCoV) and human respiratory (HCoV-OC43) coronaviruses, respectively. Major variations were observed in the S1 portion of S protein of both HEV strains with only 73/71% aa homologies with that of the two other hemagglutinating coronaviruses. Hybridoma cell lines, producing monoclonal antibodies (MAbs) to the nucleophosphoprotein (N), the typical peplomeric glycoprotein (S) or the hemagglutinin-esterase (HE) of HEV were generated. Eleven anti-N, twelve anti-S and three anti-HE MAbs appeared to be directed either against species-specific or antigenic-group determinants. Six of the anti-S MAbs were able to seroneutralize the IAF-404, and one anti-HE and one anti-S were able to inhibit the IAF-404 hemagglutinating activity. Species-specific anti HEV-N (1), anti HEV-S (9) and anti HEV-HE (2) MAbs failed to cross-react with BCoV and HCoV-OC43.

Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus (HEV) was first isolated in Canada in the early 60's (19), and later classified as a coronavirus on the basis of its morphological and biochemical characteristics (36, 47). As for other members of *Coronaviridae* family, porcine HEV comprises a large positive single-stranded RNA virus that is mostly spherical in shape, enveloped, and displays long club-shaped surface projections. The virions have a total diameter ranging between 120 to 150 nm, possess a helical nucleocapsid and are made of 5 structural proteins, amongst which 4 are present in all coronaviruses: the phosphorylated nucleocapsid protein (N) of 50 to 55 kDa, the spike (S) glycoprotein of 180 kDa which forms the typical surface projections, the matrix glycoprotein (M) of 30 to 32 kDa, and the small membrane protein (E) of 9.5 kDa (6, 56). The S glycoprotein of some group II and III coronaviruses can be cleaved near the center by trypsin-like proteases to form two polypeptides that remain associated with the oligomeric spike (1, 17). As antigenically related hemagglutinating coronaviruses, including bovine coronavirus (BCoV), human respiratory coronavirus HCoV-OC43 and some North American isolates of turkey-origin coronaviruses (TCoV), the porcine HEV possesses an additional 130 kDa envelope-associated glycoprotein, the hemagglutinin-esterase (HE), which is made of two 60-65 kDa-subunits linked together by disulfide bonds (6, 14, 21, 24, 33). The HE is associated to granular projections located near the base of the typical large bulbous peplomers, and like the S glycoprotein, it possesses antigenic determinants that trigger the immune response for the production of antibodies that neutralize viral infectivity and inhibit hemagglutinating activity (HA) (14, 16, 37, 60). The HE is also associated with HA, acetyl-esterase (AE) and receptor destroying enzyme (RDE) activities (44, 64).

The HEV infection is naturally restricted to swine species, but the virus can experimentally infect mice (68). Two clinical syndromes are associated with HEV infection in pigs: an acute, clinically apparent encephalomyelitis and the vomiting and wasting disease (VWD) (7, 46). All degrees of severity may occur for both syndromes that exhibit many signs in common. The mode of transmission is probably through nasal secretions. The primary viral replication occurs in the epithelial cells of the upper

respiratory tract and then, the virus spreads via the peripheral nerves to the central nervous system (CNS) (3).

HEV infection is believed to be widespread in many pig producing countries as a sub-clinical condition. However, from fall 1998 to fall 1999, several clinical manifestations suggestive of HEV infections have been reported in Quebec and possibly in Ontario. A cytopathogenic coronavirus, HEV-IAF-404, was isolated from the brain of a paretic weaned piglet and cultivated in human rectal tumor cells. The sequence analysis of the 3' terminal region of the genome of both HEV strains was described previously (53) and showed that this porcine coronavirus remained antigenically and genetically stable since its isolation from North American pig herds in the early 70's. The (EMBL: GenBank: DDBJ) nucleotide sequences accession numbers that have been assigned to the HE to N genomic regions are: AY078417 for the HEV-67N strain and AF481863 for the Quebec HEV field isolate IAF-404. Deduced amino acid (aa) sequences of both HEV strains revealed 89/88%, 80/80%, 93/92% and 95/94% identities with structural proteins HE, S, M and N of bovine (BCoV) and human respiratory (HCoV-OC43) coronaviruses, respectively (Fig. 1). Major variations were observed in the S1 portion of S protein of both HEV strains with only 73/71% aa homologies with that of the two other hemagglutinating coronaviruses. This report describes the clinical and pathological findings associated with these recent outbreaks of encephalitis in unweaned and weaned piglets, as well as the biological and molecular characteristics of the HEV isolate involved. It also describes the reactivity of monoclonal antibodies (MAbs) directed against the N, HE or S protein of HEV viruses to establish correlation between sequence differences amongst coronaviral strains and their biological activity and antigenic characteristics.

MATERIALS AND METHODS

Viruses and cells. To isolate the cytopathogenic coronavirus, IAF-404, clarified brain homogenate of a paretic weaned piglet was prepared in RPMI 1640 medium supplemented with antibiotics and used to inoculate human rectal adenocarcinoma HRT-18 cells. The prototype 67N strain of HEV (VR 741) and the Mebus strain of BCoV (VR 874) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). The HCoV-OC43 virus was kindly provided to us by P.J. Talbot, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada. The Quebec Winter dysentery BCoV strain BCQ-2590 has been described previously (12). The prototype OK-0514 strain of the respiratory BCoV (RBCoV) was kindly provided to us by J. Storz, Louisiana State University (57). All viruses were propagated in HRT-18 and/or HRT-18G cells, a cell line derived from HRT-18 cells and also provided to us by J. Storz (57). For some of them, the propagation was done in the presence of 10 U/ml of bovine crystallized trypsin into the maintenance medium (13, 14). When needed, extracellular viral particles were concentrated and semi-purified by ultracentrifugation onto a 30% sucrose cushion, following three freeze and thaw cycles and clarification of the infected culture media (14).

Negatively stained electron microscopy. Aliquots of supernatant fluids from infected-HRT-18G cells were spotted on formvar-carbon-coated grids, then stained negatively with 3% sodium phosphotungstate in 0,01M PBS, pH 7.0, as previously described (14).

Antibodies and indirect immunofluorescence (IIF). Monoclonal antibodies (MAbs) were obtained following fusion experiments of SP2/0 cell line with splenocytes from Balb/c mice immunized with the concentrated and purified prototype 67N strain of HEV, as previously described (14). As an alternative, mice were sensitized by intra-peritoneal injection of an enriched peplomeric fraction which was obtained following N-octylglucoside-treatment of the purified virion of HEV-IAF-404 to solubilize the components of the lipid envelope (38). A rabbit hyperimmune serum was also produced against the HEV-67N strain whole virion following standard immunization protocol (11).

HEV-, HCoV-OC43-, or BCoV-infected HRT-18G cells in 96-well plates were processed for IIF 2 to 7 days post-infection (pi) or until the appearance of a cytopathic effect (CPE). Infected monolayers were washed twice with ice-cold PBS, fixed with cold acetone (80% acetone prepared in PBS) for 20 min at 4°C, rinsed twice with ice-cold PBS, air-dried and stored at -20°C until use. Fixed monolayers were rehydrated with PBS, incubated with anti-HEV antibodies 45 min at room temperature, and washed three times with PBS before being incubated for 45 min with FITC-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse IgG diluted 1:50 in PBS. The fluorescence was observed under an UV microscope (Leyca, Leitz Wetzlar, Germany).

Serological tests and biological activities. Hemagglutination (HA) of rat erythrocytes (0.4% suspension) at 4°C and 37°C, and hemagglutination inhibition (HAI) were performed, as previously described (13). The HA titers were determined as the reciprocal of highest dilutions of clarified supernatant fluids showing complete agglutination of the rat erythrocytes. The HAI titers were expressed as the reciprocal of highest serum or hybridoma supernatant dilution that inhibits 8 HA units of the virus preparation.

The receptor destroying enzyme (RDE) activity was also determined as described elsewhere (58). After incubation at 4°C for 2 h, the HA microtiter plates were shifted to 37°C for 1 h, leading to activation of the enzyme activity and elution of the viral particles from the surface of the erythrocytes (64). The RDE activity was expressed as the ratio of the HA titer at 4°C to that obtained at 37°C.

The Acetyl-esterase activities (AE) associated with the HE glycoprotein of both HEV viruses were determined by incubating aliquots (15 µl) of purified viral preparations, in the presence of 1mM p-nitrophenyl acetate (PNPA). Hydrolysis of the substrate, following an incubation of 5 min at room T°, was monitored by determining the optical density at a wavelength of 405 nm (44).

The seroneutralisation (SN) test were considered as positive when the highest hybridoma supernatant dilution that inhibits viral infection of 100 TCID₅₀ of HEV IAF-404 was higher or equal to 1/32.

Protein extraction for SDS-PAGE and Western blot analyses. Triton X-100 (0.1%) treated viral proteins from concentrated and semi-purified extracellular virions obtained following ultracentrifugation through a 30% sucrose cushion were separated by SDS-PAGE in non-reducing conditions as described (7). The electrophoretic transfer of proteins onto nitrocellulose sheets (0.45µm) was done overnight at 80 mA. The membranes were saturated with the SuperBlock® (PBS) Blocking Buffer (Pierce, Rockford, IL) for 40 min and incubated in clarified supernatant fluid of secreting anti-HEV hybridoma cells (1/25 dilution for 3D8-2J and 1/1000 for 6F9-D6) or 1/5000 for 4E11-3 ascitic fluid for 1 h at room temperature. The second antibody was HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (1/50,000 dilution). The immune complexes were revealed by the SuperSignal® Western Blotting reagent (Pierce, Rockford, IL).

RESULTS

Clinical and pathological findings. Two clinical manifestations of HEV infection were observed in a farming unit of 650 sows farrow-to-finish operation with a postweaning unit of 2000 piglets on the same farm in Southern Quebec, Canada. Some of the newborn piglets showed the vomiting and wasting form of the disease, but in all cases early weaned pigs (2 to 5%) manifested clinical signs of CNS involvement, mainly a posterior paralysis, with mortality that averaged 100 %. Two paretic weaned piglets were submitted for necropsy. Bacteriological cultures of the brain, lungs, liver, kidneys and spleen of the two pigs were unremarkable. Polymerase chain reaction for PRRS virus detection, using 1008-1009 primers (35), was performed on brain tissues and repeated on a pool of lungs and spleen tissues from both piglets; the results were negative. However, antibody titers that varied between 1/80 and 1/320 against HEV were obtained by HAI tests in the two necropsied piglets' sera. Anti-HEV antibody titers of 1/320 were obtained for the same sera by IIF test using HEV-67N-infected HRT-18 cells.

At histopathology, perivascular mononuclear cell cuffs, and focal gliosis were observed in the brain and spinal cord neuropil with minimal occasional malacia and spongiosis.

Cell culture isolation and virological findings. A cytopathogenic coronavirus, IAF-404, was isolated on HRT-18 cells from brain homogenate of a paretic weaned piglet. The Québec recent HEV field isolate, as well as the reference strain HEV-67N (ATCC VR741) could be serially propagated on this permissive cell line in the presence and in the absence of bovine pancreatic trypsin (10U/ml). The IAF-404 isolate induced a recognizable CPE on the HRT-18G cells characterized by the appearance of multinucleated giant cells (syncytia) (Fig. 2a), as observed also with the reference HEV-67N strain (not shown). The syncytia were usually apparent within the first 24-h post-infection (pi) with maximal CPE being reached by 96-h pi. The CPE usually progressed until complete destruction of the cell monolayers. Viral antigens in the cytoplasm of infected cells could be demonstrated by IIF following incubation with a rabbit hyperimmune anti-HEV serum prepared against the prototype 67N strain of HEV (not shown). A similar fluorescent-labeling pattern was also observed by IIF using a pool of ascitic fluids containing anti-HEV MAbs (Fig. 2b). Most of these MAbs, which appeared to be directed against the N protein of HEV-67N by western blotting, were obtained from previous fusion experiments. Enveloped viral particles, mostly spherical in shape, surrounded by a double fringe of surface projections, with a total diameter ranging from 68 to 160 nm were observed by negatively-stained electron microscopy of supernatant fluids of HRT-18G cells infected by the HEV-IAF-404 virus (Fig. 2c). Most particles were centrally depressed (dark staining center) and displayed two types of surface projections, a characteristic of hemagglutinating coronaviruses (56). The large bulbous or club-shape surface projections, 12-20 nm long and which were larger in diameter in their distal end than at the site of attachment to the virion, could easily be defined. The additional shorter granular projections made of the HE glycoprotein could also be distinguished, particularly on those viral particles that had lost their more typical corona radiations during processing of the specimens.

Biological activities of isolate IAF-404. The Quebec IAF-404 strain of HEV displayed HA, AE and RDE activities. This latter activity could not be demonstrated with the reference HEV-67N strain. Data relative to these activities have been summarized in Tables 1 and 2. The HA activity of the IAF-404 strain decreased with the number of passages in cell cultures. From 4 to 6 passages, it became equivalent to the HA activity of the prototype strain HEV-67N. This decrease in the HA activity of the HEV-IAF-404 isolate could be related to viral adaptation in cell cultures. Although its RDE activity also decreased, it was still present after 8 passages in cell cultures. There was no significant difference between the AE activity of the two HEV isolates.

Antigenic relationship to other hemagglutinating coronaviruses. Hybridoma cell lines producing MAbs to the N, HE, and peplomeric glycoprotein (S) of HEV were obtained and cloned following fusion experiments with spleen cells from Balb/c mice as described in materials and methods. The polypeptide specificity of these MAbs was determined by Western blotting using Triton X-100 treated concentrated and semi-purified extracellular virions obtained following ultracentrifugation through a 30% sucrose cushion (Fig. 3). These MAbs were also tested by IIF using HRT-18 or HRT18G cells infected with six different hemagglutinating coronaviruses. The results of these analyses are showed in Table 3. Eleven anti-N, twelve anti-S and three anti-HE MAbs, of the IgG1 and IgG2a or IgG2b isotype, appeared to be directed against either species-specific or group-antigenic determinants. Species-specific anti-N (1), anti-S (9) and anti-HE (2) MAbs failed to cross-react with BCoV, either enteropathogenic or respiratory strains, and HCoV-OC43 (Table 3). Furthermore, three MAbs demonstrated a particular reactivity. The anti-N 4D6-3, the anti-S 8D8-4B and the anti-HE 8D8-4A recognized all the coronaviruses tested except HCoV OC43. Only two of the anti-S MAbs, 6F9D6 and 7C8E12 recognized the S glycoproteins of HEV and BCoV isolates, associated either with enteric or respiratory pathologies, and the respiratory HCoV-OC43. As expected, all the anti-N MAbs were negative for seroneutralisation activity. Five of the twelve anti-S were clearly positive and one of them has a weak effect of seroneutralisation. Inhibition of HA was observed only with one anti-HE and one anti-S MAb.

Discussion

HEV infection is known to be endemic in the swine industry worldwide. In Canada, particularly in the provinces of Quebec and Ontario, the seroprevalence for HEV indicates that the majority of pigs in commercial herds have been exposed to the virus. Unfortunately, information on the genetic and antigenic stability of this hemagglutinating coronavirus is missing, contrary to those of the three other pig coronaviruses. Indeed, such information is available in the majority of pig producing countries for transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus (PRCV), and in Europe for porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) (23, 25, 59, 67).

Particularly, data are available on the comparison of the nucleotide sequences of the genes encoding for the peplomeric S glycoprotein from field strains of TGEV and PRCV isolated during the last decade (25, 27, 43, 66). Such comparative studies indicate that these two pig coronaviruses have been subjected to genetic and antigenic variations since their first isolation. The most drastic modification that TGEV underwent is certainly deletions of aa residues in the S glycoprotein that have resulted in the emergence of TGEV strains with a respiratory tropism and subsequently referred to as PRCV strains (9, 27, 43, 66).

Although porcine HEV was described several years before the first reports on BCoV and HCoV-OC43 isolation, only a few investigators have studied its molecular characteristics (6, 20, 62, 63), probably because of the asymptomatic aspect of the HEV infection, compared to the acute HCoV, BCoV and TCoV infections which are more fulminant and have more important economic impacts. Therefore, only partial sequencing data were available for the HEV genome, whereas the genome of the other hemagglutinating coronaviruses have been entirely sequenced, or at least the 3' terminal end (approximately 9 kb) encoding the structural proteins. Previous studies have revealed the existence of a very close genomic relationship amongst hemagglutinating viruses classified within the second subgroup of the *coronaviridae* family, mainly between BCoV and HCoV-OC43, and between BCoV and some North American isolates of TCoV (15,

33, 40-42, 54, 55, 62, 63, 70). Therefore by selecting oligonucleotide primers in genomic regions apparently highly conserved in the three other coronaviruses, we have been able to amplify cDNA fragments corresponding to the genomic regions encoding for the N, M, S and HE proteins of the prototype porcine HEV-67N strain and of Quebec strain HEV-IAF-404 (53). Sequencing analysis of the 3' terminal end of the genome of both HEV isolates and deduced aa sequences of their HE, S, M, E and N proteins demonstrated that both strains were very similar, with percentages of 97 to 100% identity. Therefore, this analysis revealed that genomic regions encoding structural genes of this porcine coronavirus remained genetically stable since its first isolation in North American pig herds in the early 1970's(36).

Comparison of deduced aa sequences of both HEV strains with those of BCoV (Mebus strain) and HCoV-OC43, showed that these four hemagglutinating coronaviruses are genetically closely related with identities of over 93% in their E, M and N structural proteins. These genomic comparisons are illustrated in figure 1. On the other hand, deduced aa sequences of both HEV strains revealed 90/88% and 81/81%, identities with structural proteins HE and S of BCoV and HCoV-OC43, respectively.

Major variations involved mainly two regions of the viral genome. First, as previously described (40, 63), the region between the M and S genes of both porcine HEV isolates appeared highly similar to that of HCV-OC43 with complete deletion of the ORF4 genomic region encoding for the ns 4,8 protein. As mentioned above, genomic regions encoding for the S glycoprotein also showed a greater variability, particularly in the S1 portion of the peplomeric glycoprotein (53). Indeed, this genomic region of both HEV strains was found to display only 73/71% aa identities with that of the two other hemagglutinating coronaviruses, most aa changes (insertions, deletions, substitutions) being concentrated in the region corresponding to the hypervariable region of BCoV, between aa 452 and 593 (8, 45, 50, 53, 69).

The HEV infection is usually silent due to the immunological status of adult animals, mainly weaning sows that transmit an efficient local protection via their

colostrum. However, omission of suckling, at least during the first week following their birth, may predispose piglets to HEV infection. Indeed, it is probably one of the major cause for occasional outbreaks of vomiting and wasting disease. Also, the case of concomitant infections with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) or porcine circovirus type 2 (PCV-2), both actually considered as widely distributed viral infections responsible for a transitory immunodepression of the respiratory system, should be considered as facilitating factors for normally silent virus infections such as HEV and cytomegalovirus in pigs (2, 10, 39, 51, 61).

The present paper describes the characteristics of an HEV field strain isolated from clinical specimens, notably brain tissues, received from a Quebec pig farm that has recently experienced acute outbreaks of a wasting syndrome affecting newborn and unweaned piglets, with concomitant or non-concomitant neurologic problems. The recent Quebec HEV isolate was found to be closely related to the HEV-67N reference strain by investigating its reactivity by IIF to a set of anti-N MAbs directed to the prototype 67N strain and that of anti-S and anti-HE MAbs produced against that recent isolate IAF-404. This investigation confirmed the close genomic relatedness showed by the sequencing analysis of the recent HEV-IAF-404 to the HEV-67N strain isolated in Iowa more than 40 years ago (53). These data demonstrated an unusually high stability for an RNA virus contrarily to the commonly high mutation rates for viral RNA genomes (18, 22). This stability was also demonstrated for biological properties such as hemagglutination and acetyl-esterase activities, as well as cytopathogenicity and fusion activity. The HA activity of the IAF-404 strain became equivalent to the HA activity of the prototype strain HEV-67N after few passages into cells. However, the HEV-IAF-404 isolate has an RDE activity that is not observed with the prototype HEV-67N.

Noteworthy that the genomic region coding for the structural proteins does not represent more than 30-40% of the complete genome, 60 to 70% being represented by sequences encoding for the RNA-dependent RNA-polymerase and other non-structural proteins associated with replication of the virus, which may also be subjected to genetic variations. In the last two decades, it has been confirmed by several investigators that

homologous RNA recombination is a common mechanism involved in the evolution of coronaviruses (28-30). Among the first evidence of such phenomenon occurring in coronaviruses, was the demonstration that during a mixed infection of two MHV strains, RNA recombination occurs at high frequencies, not only in vitro but also in infected mouse brains (28, 34). Based on the analysis of a set of temperature sensitive (ts) mutants, the frequency of recombination for the entire MHV genome has been estimated to be close to 25% (5). At present, it is not known how widespread homologous RNA recombination is among other coronaviruses, except for infectious bronchitis virus (IBV) in avian species (26). Moreover, even if coronavirus RNA recombination was first thought to take place at certain "hot spots" (4), it was later recognized that recombination is almost random and that these previously identified "hot spots" resulted from selection of recombinant viruses by a copy-choice mechanism (32).

The specificities of the MAbs for the N, HE and S polypeptides of HEV were demonstrated by western blotting analysis, whereas their reactivities to the homologous or heterologous hemagglutinating coronaviruses were better defined by IIF using fixed monolayers of a human rectal tumor (HRT-18G) cell line known to be permissive to several coronaviruses (31, 57). The ability of these hemagglutinating coronaviruses specific to different mammalian hosts, to propagate in the same cell line of human origin constitutes a preliminary evidence that they may cross the host barrier. This suggests that heterologous recombinations may occur and give rise to viral mutants causing unpredictable pathogenesis for human or farm animals. As predicted by sequencing analysis, nine of the anti-N MAbs demonstrated a clear reactivity against both HEV strains, enteropathogenic and respiratory BCoV, and strain OC43 of respiratory HCoV. The MAb 4D6-3 failed to recognize HCoV-OC43 and the MAb 2D5-1 was specific to the HEV isolates. The data obtained with anti-N MAbs raised against HEV are in agreement with those previously obtained with anti-BCoV and anti-TCoV MAbs confirming that antigenic determinants of the nucleocapsid protein are mainly group-specific determinants (15, 38). None of the anti-N MAbs had a SN activity. On the other hand, MAbs directed to the HEV S peplomeric protein appeared to be rather specific to HEV, reacting to both strains, but two of the anti-S MAbs (6F9D6, 7C8E12) were rather

directed toward group-specific determinants. Interestingly, as with the 4D6-3 anti-N MAb, one of the MAbs directed to the HEV S peplomeric protein (8D8-4B) and one anti-HE MAb (8D8-4A) failed to recognize HCoV-OC43, but reacted against BCoV isolates associated with either enteric or respiratory disorders, thus permitting discrimination of HEV and BCoV from the human coronavirus, these two latter, BCoV and HCoV-OC43, are genetically closely related to each other (62, 63). None of the anti-HE MAbs has a SN activity but 6 out of 12 anti-S MAbs were able to neutralize virus infection of HEV IAF-404. Only one of the anti-S (11H9-2B) and one of the anti-HE (4E10-1A) MAbs recognized epitopes implicated in hemagglutination. The anti-HE MAbs 3D8-2J and 4E10-1A seem to be specific for HEV IAF-404 (did not react or weakly reacted with HEV 67N). Overall, data obtained with anti-HEV MAbs confirmed sequence analysis results that demonstrated that viruses classified within the second genomic or serologic subgroup of the *Coronaviridae* family share most antigenic determinants of their N, M, E and HE proteins, most of the nucleotidic changes or variations, as well as specific antigenic determinants, being clustered or randomly distributed on their S genes or S glycoproteins (8, 45, 69). The peplomeric glycoprotein was previously reported to be associated to virulence or diverse biological functions, including tropism and pathogenicity (48, 49, 52, 65). Data obtained in the present study further substantiate these notions.

With the potential risk of recombination between members of the subgroup of hemagglutinating coronaviruses, notably at the level of subgenomic mRNAs synthesized in the infected cells during the replication cycle, specific and group-specific immunologic or genomic probes are required for a definitive diagnosis or confirmation of heterologous recombination, and control of possible interspecies infections.

Acknowledgments

The authors greatly acknowledge the technical assistance of N. Sawyer, L. Cousineau and R. Jetté from the INRS-IAF animal virology diagnostic laboratory, and C. Faubert from the diagnostic laboratory of the Quebec Ministry of Agriculture, Fisheries

and Food, Sainte-Foy, Qc, Canada for the clinical samples. The authors also thank J. Storz, Veterinary School of Medicine, Louisiana's State University, for providing HRT-18G cells.

This research was sponsored by an operating grant received from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (Grant # OGPOO46412) and the Québec Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAPAQ). A. M.-J. Sasseville was a recipient of a post-doctoral fellowship from the Fondation Armand-Frappier.

References

1. Abraham, S., T. E. Kienzle, W. Lapps, and D. A. Brian. 1990. Deduced sequence of the bovine coronavirus spike protein and identification of the internal proteolytic cleavage site. *Virology* 176:296-301.
2. Allan, G. M., and J. A. Ellis. 2000. Porcine circoviruses: a review. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12:3-14.
3. Andries, K., and M. B. Pensaert. 1980. Virus isolated and immunofluorescence in different organs of pigs infected with hemagglutinating encephalomyelitis virus. *Am. J. Vet. Res.* 41:215-8.
4. Banner, L. R., J. G. Keck, and M. M. Lai. 1990. A clustering of RNA recombination sites adjacent to a hypervariable region of the peplomer gene of murine coronavirus. *Virology* 175:548-55.
5. Baric, R. S., K. Fu, M. C. Schaad, and S. A. Stohlman. 1990. Establishing a genetic recombination map for murine coronavirus strain A59 complementation groups. *Virology* 177:646-56.
6. Callebaut, P. E., and M. B. Pensaert. 1980. Characterization and isolation of structural polypeptides in haemagglutinating encephalomyelitis virus. *J. Gen. Virol.* 48:193-204.
7. Cartwright, S. F., and M. Lucas. 1970. Vomiting and wasting disease in piglets. *Virological and epidemiological studies. Vet. Rec.* 86:278-80.
8. Chouljenko, V. N., K. G. Kousoulas, X. Lin, and J. Storz. 1998. Nucleotide and predicted amino acid sequences of all genes encoded by the 3' genomic

- portion (9.5 kb) of respiratory bovine coronaviruses and comparisons among respiratory and enteric coronaviruses. *Virus Genes* 17:33-42.
9. Cornaglia, E., N. Chretien, S. Charara, and Y. Elazhary. 1994. Detection of porcine respiratory coronavirus and transmissible gastroenteritis virus by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Microbiol.* 42:349-59.
 10. Darwich, L., J. Segales, M. Domingo, and E. Mateu. 2002. Changes in CD4(+), CD8(+), CD4(+) CD8(+), and immunoglobulin M-positive peripheral blood mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs and age-matched uninfected wasted and healthy pigs correlate with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9:236-42.
 11. Dea, S., S. Garzon, and P. Tijssen. 1989. Isolation and trypsin-enhanced propagation of turkey enteric (bluecomb) coronaviruses in a continuous human rectal adenocarcinoma cell line. *Am. J. Vet. Res.* 50:1310-8.
 12. Dea, S., L. Michaud, and G. Milane. 1995. Comparison of bovine coronavirus isolates associated with neonatal calf diarrhoea and winter dysentery in adult dairy cattle in Quebec. *J. Gen. Virol.* 76 (Pt 5):1263-70.
 13. Dea, S., R. S. Roy, and M. E. Begin. 1980. Bovine coronavirus isolation and cultivation in continuous cell lines. *Am. J. Vet. Res.* 41:30-8.
 14. Dea, S., and P. Tijssen. 1989. Antigenic and polypeptide structure of turkey enteric coronaviruses as defined by monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* 70 (Pt 7):1725-41.

15. Dea, S., A. J. Verbeek, and P. Tijssen. 1990. Antigenic and genomic relationships among turkey and bovine enteric coronaviruses. *J. Virol.* 64:3112-8.
16. Deregt, D., and L. A. Babiuk. 1987. Monoclonal antibodies to bovine coronavirus: characteristics and topographical mapping of neutralizing epitopes on the E2 and E3 glycoproteins. *Virology* 161:410-20.
17. Deregt, D., G. A. Gifford, M. K. Ijaz, T. C. Watts, J. E. Gilchrist, D. M. Haines, and L. A. Babiuk. 1989. Monoclonal antibodies to bovine coronavirus glycoproteins E2 and E3: demonstration of in vivo virus-neutralizing activity. *J Gen Virol* 70:993-8.
18. Domingo, E. 2000. Viruses at the edge of adaptation. *Virology* 270:251-3.
19. Greig, A. S., D. Mitchell, A. H. Corner, G. L. Bannister, E. B. Meads, and R. J. Julian. 1962. A haemagglutinating virus producing encephalomyelitis in baby pigs. *Can. J. Comp. Med.* 26:49-56.
20. Herrler, G., I. Durkop, H. Becht, and H. D. Klenk. 1988. The glycoprotein of influenza C virus is the haemagglutinin, esterase and fusion factor. *J. Gen. Virol.* 69 (Pt 4):839-46.
21. Hogue, B. G., and D. A. Brian. 1986. Structural proteins of human respiratory coronavirus OC43. *Virus Res.* 5:131-44.
22. Holmes, K. V. a. L. M. M. C. 1996. Coronaviridae: The viruses and their replication, p. 541-559. *In* D. M. K. B.N. Fields, P.M. Howley, et al. (ed.), *Fundamental virology, Third Edition.* Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia.

23. Kim, O., C. Choi, B. Kim, and C. Chae. 2000. Detection and differentiation of porcine epidemic diarrhoea virus and transmissible gastroenteritis virus in clinical samples by multiplex RT-PCR. *Vet. Rec.* 146:637-40.
24. King, B., B. J. Potts, and D. A. Brian. 1985. Bovine coronavirus hemagglutinin protein. *Virus Res.* 2:53-9.
25. Kocherhans, R., A. Bridgen, M. Ackermann, and K. Tobler. 2001. Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence. *Virus Genes* 23:137-44.
26. Kusters, J. G., E. J. Jager, H. G. Niesters, and B. A. van der Zeijst. 1990. Sequence evidence for RNA recombination in field isolates of avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Vaccine* 8:605-8.
27. Lai, C. H., M. W. Welter, and L. M. Welter. 1995. The use of arms PCR and RFLP analysis in identifying genetic profiles of virulent, attenuated or vaccine strains of TGEV and PRCV. *Adv. Exp. Med. Biol.* 380:243-50.
28. Lai, M. M., R. S. Baric, S. Makino, J. G. Keck, J. Egbert, J. L. Leibowitz, and S. A. Stohlman. 1985. Recombination between nonsegmented RNA genomes of murine coronaviruses. *J. Virol.* 56:449-56.
29. Lai, M. M., and D. Cavanagh. 1997. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res* 48:1-100.
30. Lai, M. M., C. L. Liao, Y. J. Lin, and X. Zhang. 1994. Coronavirus: how a large RNA viral genome is replicated and transcribed. *Infect Agents Dis* 3:98-105.

31. Laporte, J., P. Bobulesco, and F. Rossi. 1980. [A cell line particularly susceptible to bovine enteric Coronavirus replication: HRT 18 cells]. *C R Seances Acad Sci D* 290:623-6.
32. Liao, C. L., and M. M. Lai. 1992. RNA recombination in a coronavirus: recombination between viral genomic RNA and transfected RNA fragments. *J. Virol.* 66:6117-24.
33. Lin, T. I., S. C. Tsai, C. C. Wu, T. A. Bryan, H. L. Thaker, T. Hooper, and D. Schrader. 2002. Characterization of turkey coronaviruses from turkey poults with acute enteritis. *Vet. Microbiol.* 84:179-86.
34. Makino, S., J. G. Keck, S. A. Stohlman, and M. M. Lai. 1986. High-frequency RNA recombination of murine coronaviruses. *J. Virol.* 57:729-37.
35. Mardassi, H., L. Wilson, S. Mounir, and S. Dea. 1994. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and efficient differentiation between Canadian and European strains by reverse transcription and PCR amplification. *J. Clin. Microbiol.* 32:2197-203.
36. Mengeling, W. L., A. D. Boothe, and A. E. Ritchie. 1972. Characteristics of a coronavirus (strain 67N) of pigs. *Am. J. Vet. Res.* 33:297-308.
37. Michaud, L., and S. Dea. 1993. Characterization of monoclonal antibodies to bovine enteric coronavirus and antigenic variability among Quebec isolates. *Arch. Virol.* 131:455-65.
38. Milane, G., A. B. Kourtesis, and S. Dea. 1997. Characterization of monoclonal antibodies to the hemagglutinin-esterase glycoprotein of a bovine coronavirus associated with winter dysentery and cross-reactivity to field isolates. *J. Clin. Microbiol.* 35:33-40.

39. Molitor, T. W., E. M. Bautista, and C. S. Choi. 1997. Immunity to PRRSV: double-edged sword. *Vet. Microbiol.* 55:265-76.
40. Mounir, S., and P. J. Talbot. 1993. Human coronavirus OC43 RNA 4 lacks two open reading frames located downstream of the S gene of bovine coronavirus. *Virology* 192:355-60.
41. Mounir, S., and P. J. Talbot. 1993. Molecular characterization of the S protein gene of human coronavirus OC43. *J. Gen. Virol.* 74 (Pt 9):1981-7.
42. Mounir, S., and P. J. Talbot. 1992. Sequence analysis of the membrane protein gene of human coronavirus OC43 and evidence for O-glycosylation. *J. Gen. Virol.* 73 (Pt 10):2731-6.
43. Page, K. W., K. L. Mawditt, and P. Britton. 1991. Sequence comparison of the 5' end of mRNA 3 from transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus. *J. Gen. Virol.* 72 (Pt 3):579-87.
44. Parker, M. D., D. Yoo, and L. A. Babiuk. 1990. Expression and secretion of the bovine coronavirus hemagglutinin-esterase glycoprotein by insect cells infected with recombinant baculoviruses. *J. Virol.* 64:1625-9.
45. Parker, M. D., D. Yoo, G. J. Cox, and L. A. Babiuk. 1990. Primary Structure of the S peplomer gene of bovine coronavirus and surface expression in insect cells. *J Gen Virol* 71:1885.
46. Pensaert, M. B., and K. Andries. 1993. Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus, p. 268-73. *In* I. S. U. Press (ed.), *Diseases of Swine*, section 2 *Viral Diseases*, 7 ed, Ames, Iowa.

47. Phillip, J. I. H., S. F. Cartwright, and A. C. Scott. 1971. The size and morphology of T.G.E. and vomiting and wasting disease viruses of pigs. *Vet. Rec.* 88:311-312.
48. Phillips, J. J., M. Chua, S. H. Seo, and S. R. Weiss. 2001. Multiple regions of the murine coronavirus spike glycoprotein influence neurovirulence. *J Neurovirol* 7:421-31.
49. Phillips, J. J., M. M. Chua, G. F. Rall, and S. R. Weiss. 2002. Murine coronavirus spike glycoprotein mediates degree of viral spread, inflammation, and virus-induced immunopathology in the central nervous system. *Virology* 301:109-20.
50. Rekik, M. R., and S. Dea. 1994. Comparative sequence analysis of a polymorphic region of the spike glycoprotein S1 subunit of enteric bovine coronavirus isolates. *Arch. Virol.* 135:319-31.
51. Samsom, J. N., T. G. de Bruin, J. J. Voermans, J. J. Meulenbergh, J. M. Pol, and A. T. Bianchi. 2000. Changes of leukocyte phenotype and function in the broncho-alveolar lavage fluid of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a role for CD8(+) cells. *J. Gen. Virol.* 81:497-505.
52. Sanchez, C. M., A. Izeta, J. M. Sanchez-Morgado, S. Alonso, I. Sola, M. Balasch, J. Plana-Duran, and L. Enjuanes. 1999. Targeted recombination demonstrates that the spike gene of transmissible gastroenteritis coronavirus is a determinant of its enteric tropism and virulence. *J Virol* 73:7607-18.
53. Sasseville, A. M.-J., M. Boutin, N. Sawyer, A. M. Gélinas, and S. Dea. 2002. Sequence of 3'-terminal end (8.1 kb) of the genome of porcine

- haemagglutinating encephalomyelitis virus: comparison with other haemagglutinating coronaviruses. J. Gen. Virol. 83:in press.**
- 54. Schultze, B., K. Wahn, H. D. Klenk, and G. Herrler. 1991. Isolated HE-protein from hemagglutinating encephalomyelitis virus and bovine coronavirus has receptor-destroying and receptor-binding activity. Virology 180:221-8.**
 - 55. Shockley, L. J., P. A. Kapke, W. Lapps, D. A. Brian, L. N. Potgieter, and R. Woods. 1987. Diagnosis of porcine and bovine enteric coronavirus infections using cloned cDNA probes. J. Clin. Microbiol. 25:1591-6.**
 - 56. Spaan, W., D. Cavanagh, and M. C. Horzinek. 1988. Coronaviruses: structure and genome expression. J. Gen. Virol. 69 (Pt 12):2939-52.**
 - 57. Storz, J., L. Stine, A. Liem, and G. A. Anderson. 1996. Coronavirus isolation from nasal swap samples in cattle with signs of respiratory tract disease after shipping. J. Am. Vet. Med. Assoc. 208:1452-5.**
 - 58. Storz, J., X. M. Zhang, and R. Rott. 1992. Comparison of hemagglutinating, receptor-destroying, and acetyesterase activities of avirulent and virulent bovine coronavirus strains. Arch. Virol. 125:193-204.**
 - 59. Van Reeth, K., and M. Pensaert. 1994. Prevalence of infections with enzootic respiratory and enteric viruses in feeder pigs entering fattening herds. Vet. Rec. 135:594-7.**
 - 60. Vautherot, J. F., M. F. Madelaine, P. Boireau, and J. Laporte. 1992. Bovine coronavirus peplomer glycoproteins: detailed antigenic analyses of S1, S2 and HE. J. Gen. Virol. 73 (Pt 7):1725-37.**

61. **Vezina, S. A., H. Loemba, M. Fournier, S. Dea, and D. Archambault. 1996. Antibody production and blastogenic response in pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can. J. Vet. Res.* 60:94-9.**
62. **Vieler, E., T. Schlapp, C. Anders, and W. Herbst. 1995. Genomic relationship of porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus to bovine coronavirus and human coronavirus OC43 as studied by the use of bovine coronavirus S gene-specific probes. *Arch. Virol.* 140:1215-23.**
63. **Vieler, E., T. Schlapp, and W. Herbst. 1996. The region between the M and S genes of porcine haemagglutinating encephalomyelitis virus is highly similar to human coronavirus OC43. *J. Gen. Virol.* 77 (Pt 7):1443-7.**
64. **Vlasak, R., W. Luytjes, J. Leider, W. Spaan, and P. Palese. 1988. The E3 protein of bovine coronavirus is a receptor-destroying enzyme with acetylsterase activity. *J. Virol.* 62:4686-90.**
65. **Wang, F. I., J. O. Fleming, and M. M. Lai. 1992. Sequence analysis of the spike protein gene of murine coronavirus variants: study of genetic sites affecting neuropathogenicity. *Virology* 186:742-9.**
66. **Wesley, R. D., R. D. Woods, and A. K. Cheung. 1991. Genetic analysis of porcine respiratory coronavirus, an attenuated variant of transmissible gastroenteritis virus. *J. Virol.* 65:3369-73.**
67. **Wesley, R. D., R. D. Woods, J. D. McKean, M. K. Senn, and Y. Elazhary. 1997. Prevalence of coronavirus antibodies in Iowa swine. *Can. J. Vet. Res.* 61:305-8.**

68. **Yagami, K., K. Hirai, and N. Hirano. 1986. Pathogenesis of haemagglutinating encephalomyelitis virus (HEV) in mice experimentally infected by different routes. J. Comp. Pathol. 96:645-57.**
69. **Yoo, D. W., M. D. Parker, J. Song, G. J. Cox, D. Deregt, and L. A. Babiuk. 1991. Structural analysis of the conformational domains involved in neutralization of bovine coronavirus using deletion mutants of the spike glycoprotein S1 subunit expressed by recombinant baculoviruses. Virology 183:91-8.**
70. **Zhang, X. M., K. G. Kousoulas, and J. Storz. 1992. The hemagglutinin/esterase gene of human coronavirus strain OC43: phylogenetic relationships to bovine and murine coronaviruses and influenza C virus. Virology 186:318-23.**

Table. 1. Hemagglutination titers of HEV-infected HRT-18G supernatant fluids

Viral isolate	Number of passages on HRT18G cells	HA Titers 4°C	HA Titers 37°C	RDE activity	Infectivity Titers (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)
HEV 67N	2	< 20	< 20	1	N/D
	3	40	80	≤ 1	N/D
	4	320	640	≤ 1	7.125
HEV IAF-404	1	1280	< 20	≥ 64	8.625
	2	640	< 20	≥ 32	8.000
	3	640	< 20	≥ 32	7.875
	4	320	< 20	≥ 16	7.875
	5	640	< 20	≥ 32	8.000
	6	320	< 20	≥ 16	8.500
	7	320	< 20	≥ 16	7.875
	8	320	< 20	≥ 16	8.750

The HA titers were determined as the reciprocal of highest dilutions of clarified supernatant fluids showing complete agglutination of rat erythrocytes (0.4% suspension). The receptor-destroying enzyme (RDE) activity was determined as follow: after incubation at 4°C for 2 h, the HA microtiter plates were shifted to 37°C for 1 h, leading to activation of the enzyme activity and elution of the viral particles from the surface of the erythrocytes. The RDE activity was evaluated as the ratio of the HA titer at 4°C to that obtained at 37°C

Table 2. Acetyl Esterase Activity (AE) of two porcine HEV isolates

Viral isolate	# passages on HRT18G cells	Infectivity titers ($\log_{10}\text{TCID}_{50}/.1\text{ml}$)	AE activity
HEV 67N	4	9.25	2.46
IAF-404	3	9.00	2.09

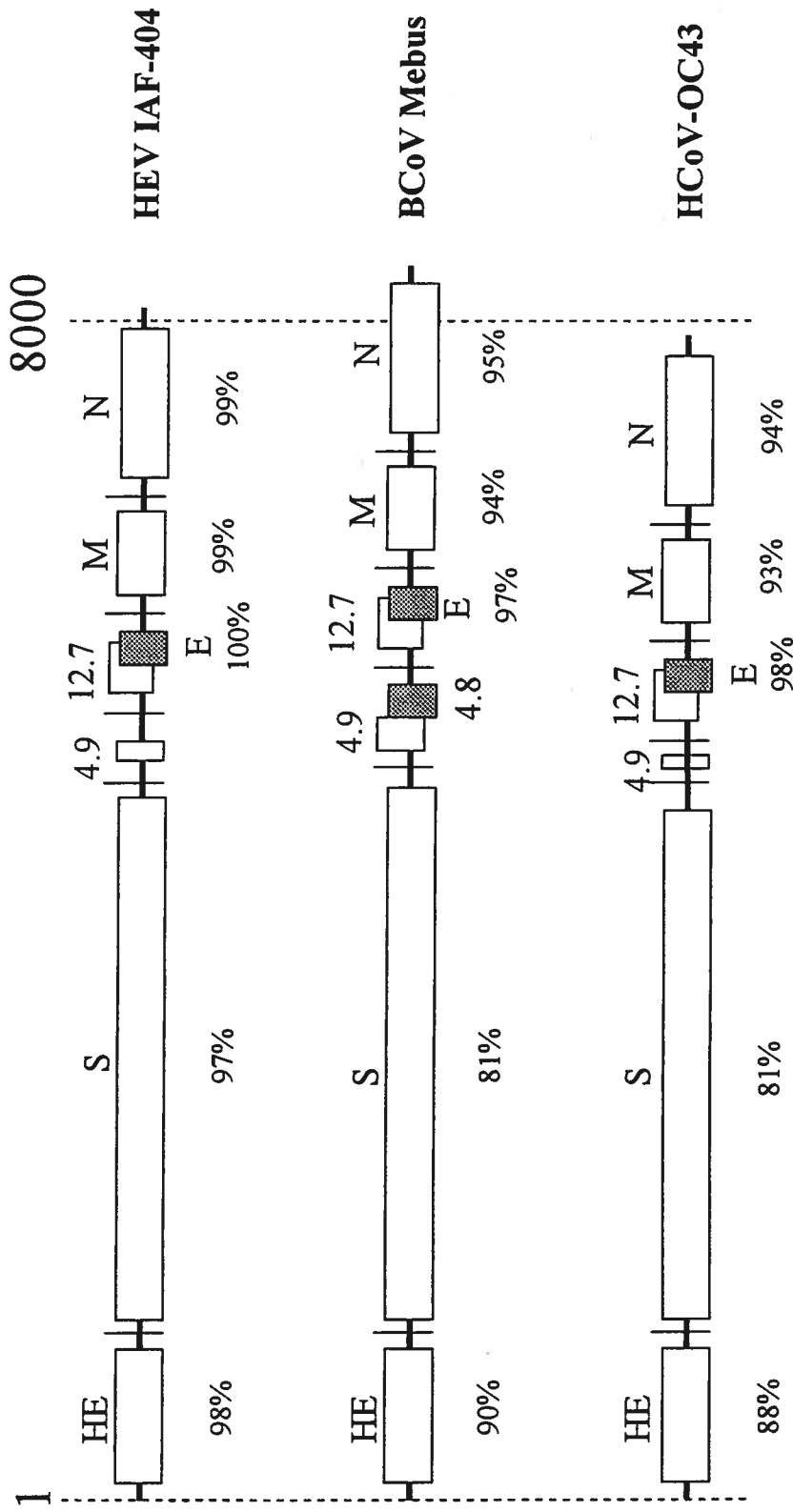
The AE activity was determined by incubating aliquots of sucrose-gradient purified virus in the presence of 1 mM p-nitrophenyl acetate (PNPA). The optical density (OD) of the reaction mixture was read at 405nm after 5 min at room temperature.

Table 3. Reactivity of anti-HEV MAbs in seroneutralisation (SN), inhibition of hemagglutination (IHA) and indirect immunofluorescence (IIF) towards homologous virus (67N and IAF-404), enteropathogenic and respiratory strains of BCoV, and human respiratory coronavirus HCoV-OC43

MAbs designation	Peptide Specificity	Ig Isotype	SN Activity	IHA Activity	IIF reactivity to					
					Autologous			Enteric		
					HEV 67N	HEV IAF-404	EBCoV VR-874	EBCoV D2590	RBCoV OK514	HCoV OC43
1A1-2	N	G1, 2a	-	N/D	+	+	+	+	+	+
1E11-1	N	G1	-	N/D	+	+	+	+	+	+
2B6-4	N	G1-2ab	-	N/D	+	+	+	+	+	+
2D5-1	N	G2a	-	N/D	+	+	-	-	-	-
3B6-1	N	G1	-	N/D	+	+	+	+	+	+
4D6-3	N	G2a	-	N/D	+	+	+	+	+	-
4D9-3	N	G1	-	N/D	+	+	+	+	+	+
4E11-3	N	G1	-	N/D	+	+	+	+	+	+
4G4-4	N	G1	-	N/D	+	+	+	+	+	+
5A1-3	N	G1	-	N/D	+	+	+	+	+	+
5B7-3	N	G1	-	N/D	+	+	+	+	+	+
2E6G10	S	G1	+	-	+	+	-	-	-	-
2E9E5	S	G1	+	-	+	+	-	-	-	-
3D6E2	S	G1	+	-	+	+	-	-	-	-
4D10G9	S	G2a	+	-	+	+	-	-	-	-
5E3D9	S	G1	-	-	+	+	-	-	-	-
6F9D6	S	G1	-	-	+	+	-	-	-	-
7C8E12	S	G1	-	-	+	+	-	-	-	-
7D6A4	S	G1	±	-	+	+	-	-	-	-
8D7C6	S	G2a	+	-	+	+	-	-	-	-
11H9-2B	S	G1	-	+	+	+	-	-	-	-
8D8-4B	S	G1	-	-	+	+	-	-	-	-
3F9-1G	S	G1	-	-	+	+	-	-	-	-
8D8-4A	HE	G1	-	-	+	+	-	-	-	-
3D8-2J	HE	G1	-	-	±	±	-	-	-	-
4E10-1A	HE	G1	-	+	-	-	-	-	-	-

HCoV-OC43: Respiratory Human coronavirus (OC43)
 VR874: Enteric Bovine coronavirus (Neonatal calf diarrhea, Mebus strain)
 D2590: Enteric Bovine coronavirus (Winter dysentery)
 OK-514: Respiratory Bovine coronavirus

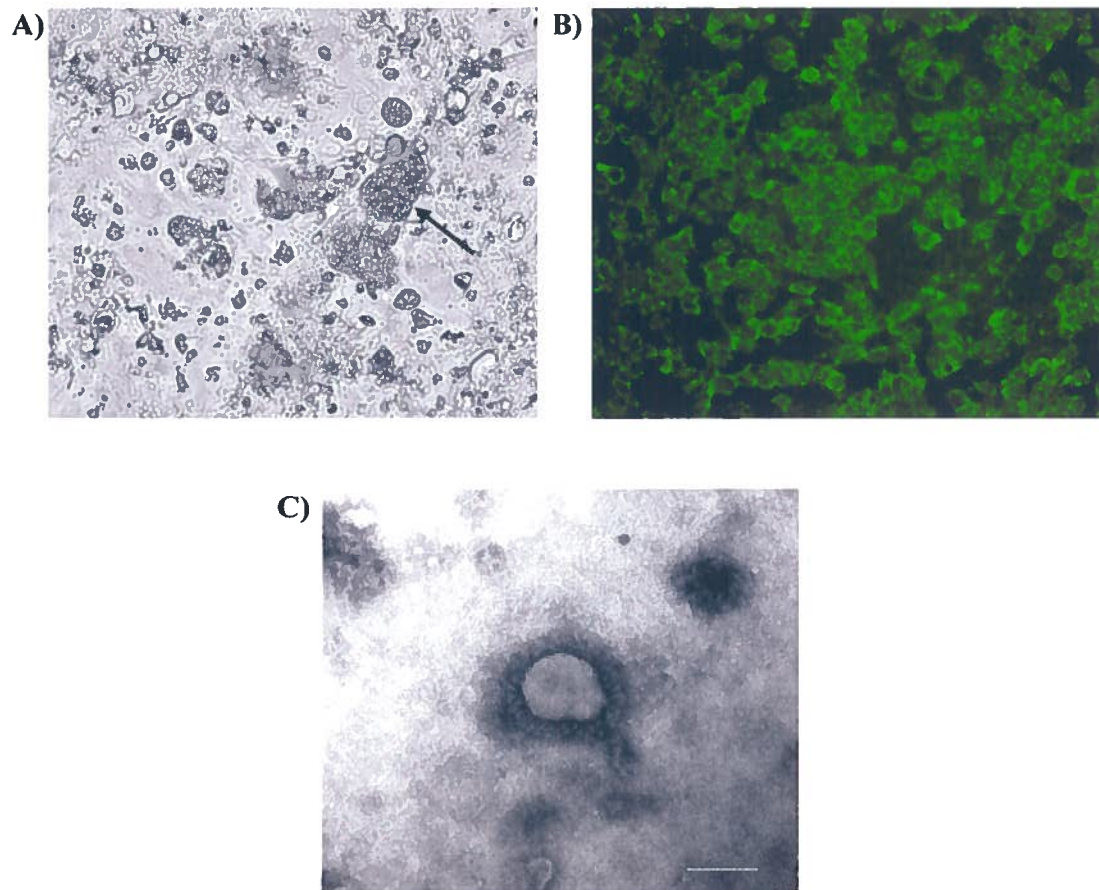
Figure 1. Schematic representation of the 3' end of coronavirus genome.



HEV, BCoV and HCoV-OC43 hemagglutinating coronavirus genomes are presented with % aa identities of encoding proteins relative to those of the HEV-67N strain.

% aa identities from Sasseville *et al.*, 2002

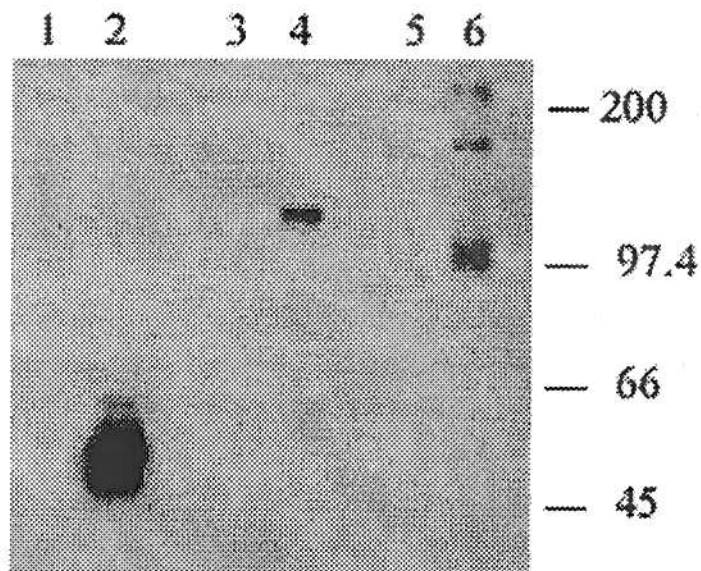
Fig. 2. Isolation in HRT-18G cells of the porcine HEV-IAF-404.



A) Cytopathic effect observed on HRT-18G cells infected by the fourth passage of HEV-IAF-404 (72h post-infection (pi)) was characterized by the appearance of large syncytia (arrow) usually apparent within the first 24 h pi.

B) Virus identification was confirmed by the observation of a cytoplasmic fluorescence following incubation in the presence of a 1:100 dilution of a pool of ascitic fluids, anti-N MAbs, and FITC-labeled goat anti-mouse IgG.

C) Negatively stained electron micrograph of extracellular viral particles observed in the supernatant fluid of HRT-18 G cells infected by the IAF-404 field strain of HEV. Bar = 100 nm

Fig. 3. Immunoblots of anti-HEV MAbs

1 μ g per well of proteins extracted from HEV-IAF-404 infected HRT-18 cells (2, 4 and 6) or non-infected HRT-18 cells (1, 3 and 5) were separated on 8 % SDS-PAGE in non-reducing conditions. Reactivity of anti-N 4E11-3 (1 and 2) anti-HE 3D8-2J (3 and 4) and anti-S 6F9D6 (5 and 6) are shown. MAb 6F9D6 recognized the entire S protein with different degrees of glycosylation (180 to 220 kDa) and the cleaved protein (100 kDa).

DISCUSSION GÉNÉRALE

Depuis la découverte du premier coronavirus en 1937 par Beaudette et Hudson (Beaudette, F. R. et Hudson, C. B., 1937), la recherche sur les coronavirus a beaucoup évolué, notamment sur ceux responsables de pathologies diverses chez les mammifères dont l'homme. Depuis les 60 dernières années, l'acquisition de connaissances fondamentales s'est montrée essentielle pour une compréhension plus complète des coronavirus.

La création de l'ordre *Nidovirales* en 1996 est un exemple de l'accroissement des connaissances sur les *Coronaviridae* et les *Arteriviridae* (Pringle, C. R., 1996). Ce sont des virus qui possèdent une enveloppe acquise des membranes intracellulaires lors du bourgeonnement des particules matures. Bien que la forme de leur nucléocapside soit différente, ce sont tous des virus à ARN, simple brin, de polarité positive avec la même organisation génomique. Ils utilisent, comme tous les autres virus à ARN, une ARN polymérase, moins fiable que les ADN polymérases cellulaires, qui incorpore un grand nombre de mutations ponctuelles au cours de la transcription. Les mutations peuvent être silencieuses ou donner naissance à un virion défectif, mais on ne sait toujours pas s'il est aussi possible que les mutations leurs donnent un avantage sélectif. La glycoprotéine S impliquée dans des activités biologiques importantes pour le virus possède des régions dites hypervariables où l'on retrouve un plus grand nombre de mutations. Des mutations dans la protéine S peuvent résulter en des modifications dans le tropisme, incluant l'attachement du virus à la cellule-hôte (Gallagher, T. M. et Buchmeier, M. J., 2001), et dans la virulence (Fleming, J. O. *et al.*, 1987; Zhang, X. M. *et al.*, 1991; Fazakerley, J. K. *et al.*, 1992; Hingley, S. T. *et al.*, 1994; Rekik, M. R. et Dea, S., 1994).

Les ARNm des Nidovirus possèdent tous la même séquence de tête en 5' et la même extrémité 3'. La transcription de ces ARNm sous-génomiques est encore controversée mais il est certain qu'elle implique une synthèse discontinue par la juxtaposition de copies des séquences de tête aux ARNm sous-génomiques aux séquences intergénomiques (SI) présentes entre chacun des ORF du génome virale (Baric, R. S. *et al.*, 1987; Shieh, C.-K. *et al.*, 1987). Chez les coronavirus, il a été démontré par une expérience de co-infection virale par deux souches différentes de MHV que près de 50%

des ARNm d'une souche donnée pouvaient posséder la séquence de tête de l'autre souche (Makino, S. *et al.*, 1986). Ceci pourrait laisser croire que des phénomènes de recombinaison génétique pourraient survenir aux SI au cours de la synthèse de l'ARN génomique.

Les coronavirus ont été divisés en trois sous-groupes selon leur réactivité à des tests sérologiques (IHA, SN, IFI et l'ELISA) de même que par des études de relation génomique par des tests d'hybridation. (Shockley, L. J. *et al.*, 1987; Verbeek, A. *et al.*, 1991). Il a été démontré par des analyses de séquences que les pourcentages d'homologie sont très élevés entre les membres des sous-groupes distincts de coronavirus, mais encore plus lorsque les virus d'un même sous-groupe sont comparés entre eux. Le pourcentage d'homologie, pour les différentes protéines structurales, entre le BCoV et le HCoV-OC43 est de 95% pour la HE, 91% pour la S, 94% pour la M et de 96% pour la N (Mounir, S. et Talbot, P. J., 1992; Mounir, S. *et al.*, 1993; Mounir, S. et Talbot, P. J., 1993).

En ce qui concerne le virus hémagglutinant de l'encéphalomyélite porcine, l'un des virus les moins étudié, nous savons qu'il est antigéniquement lié aux coronavirus bovins et humains (OC-43). Il existe des réactions croisées entre ces virus lors des tests sérologiques ce qui rend la tâche plus difficile au niveau de l'identification virale lors du diagnostic sérologique, tant pour les vétérinaires que les scientifiques qui désirent étudier les barrières inter-espèces de ces virus de même que les risques de recombinaison génétique entre ces virus si apparentés pouvant résulter en l'apparition de variants de pathogénèse inconnue pour ces différentes espèces.

C'est suite à obtention récente d'un isolat clinique, que nous suspicions être un HEV, que nous avons choisi de bâtir ce projet qui avait pour but de permettre la différenciation génomique des coronavirus hémagglutinants et de faire la topographie des déterminants antigéniques de la glycoprotéine S du virus HEV porcin. Les objectifs que nous avons fixés étaient : 1) le séquençage de l'ORF codant pour la glycoprotéine S du HEV porcin; 2) le développement d'un test diagnostic moléculaire pour la détection universelle ou spécifique de même que la différenciation des coronavirus

hémagglutinants; 3) la production d'anticorps monoclonaux (AcMo) dirigés contre des épitopes spécifiques de la glycoprotéine de surface du virus HEV, pour permettre l'établissement de tests sérologiques ou de détection plus spécifiques.

Nous avons débuté par le séquençage. Puisque les génomes des coronavirus varient entre 27 et 31 kb, nous avons choisi de nous limiter à l'extrémité 3' du génome comportant les protéines structurales dont notre protéine d'intérêt, la S. Les seules séquences connues pour le HEV remontaient à 1996 (Vieler, E. *et al.*, 1996). Il est donc évident que l'article 1 présenté dans ce mémoire constitue un avancement scientifique important en permettant d'ajouter nos séquences à celles des autres coronavirus mais surtout en permettant de démystifier certaines questions laissées en suspend par Vieler et ses collaborateurs. Leurs travaux portaient sur l'utilisation de sondes moléculaires spécifique à l'ORF de la glycoprotéine S. Ils ont démontré qu'une sonde spécifique à la portion S1 de BCoV pouvait s'hybrider à l'ARN viral de HCoV-OC43 mais pas à l'ARN viral de HEV. Il en allait de même pour l'utilisation des amorces spécifiques à la sonde S1 qui ne permettaient aucune amplification en présence de l'ARN de HEV. La présence de mésappariements dans la séquence des deux amorces que ces chercheurs ont utilisé pour faire l'amplification de la sonde, serait l'explication la plus probable. Ce même phénomène qui pourrait expliquer la non-hybridation de la sonde BCoV-S1 à HEV puisqu'il y a seulement 82 % d'homologie entre les séquences de cette région entre HEV et BCoV alors qu'il y a 93,5% d'homologie entre HCoV-OC43 et BCoV.

Grâce à ces séquences, il devient possible d'exprimer les protéines séparément dans des vecteurs procaryotiques ou eucaryotiques pour pouvoir étudier plus en détail le rôle de chacune. Une autre possibilité qu'offre la mise à jour de la séquence du HEV est la possibilité de mettre au point des sondes moléculaires pour l'hybridation. Il y a l'hybridation *in situ* qui permettrait la localisation précise du virus afin d'identifier le type de cellules sensibles à l'infection dans un organe ou encore des hybridations de type Northern pour l'étude des ARNm.

Le rayonnement international de nos résultats est possible puisque lors du 6^{ième} Symposium International sur les virus à ARN positif, à Paris, en mai 2001 où nous avons présenté les résultats préliminaires de notre séquençage, des chercheurs oeuvrant dans le domaine des coronavirus se sont montrés intéressés par la glycoprotéine HE. Cette nouvelle séquence leur ouvrait la voie vers l'utilisation de cet ORF dans un clone infectieux de MHV qui ne possédait pas cet ORF ou qui était non fonctionnel afin de comprendre si l'ajout de la HE du HEV amènerait des résultats différents des autres clones qu'ils possédaient déjà. Les séquences de la S ont aussi semblé intéressantes pour des chercheurs qui travaillent sur le site de clivage à la trypsine et d'autres motifs présents dans la S2 puisque nos séquences permettraient de confirmer ou d'infirmer leurs résultats. Ces séquences ont été utiles évidemment pour la suite du projet puisqu'elles ont permis l'obtention des amorces spécifiques nécessaires à l'élaboration du test de multiplex RT-PCR.

Le multiplex RT-PCR pour la détection et la différenciation des coronavirus hémagglutinants est présenté dans l'article 2 de ce mémoire. Il constitue sans contredit un test intéressant pour la détection de ces derniers, à tous le moins au niveau académique. Il est possible de répertorier quelques publications sur la détection des coronavirus à l'aide du PCR dans les dernières années mais notre test est tout à fait unique. Pour preuve, il existe des tests de multiplex RT-PCR pour la différenciation de coronavirus mais ils ciblent la différenciation entre des sérotypes différents du même virus. C'est le cas d'un test pour la différenciation des sérotypes porcins, TGEV et PRCoV (Kim, S. Y. *et al.*, 2001), et de celui pour les sérotypes aviaires (Wang, X. et Khan, M. I., 1999). Généralement, les tests de détection connus se limitent à la détection d'un seul coronavirus à la fois. On retrouve parmi ceux-ci, le test de détection du coronavirus bovin (Cho, K. O. *et al.*, 2001), des coronavirus humains 229E et OC-43 (Vabret, A. *et al.*, 2001), du coronavirus canin (Naylor, M. J. *et al.*, 2001), du coronavirus félin (Kennedy, M. *et al.*, 2002) et du virus porcine de la diarrhée épidémique (PEDV) (Kubota, S. *et al.*, 1999). Il existe une autre catégorie de tests RT-PCR dans laquelle nous retrouvons des tests dont la détection est moins spécifique ou qui entraînent des réactions croisées. C'est le cas du test pour la détection des coronavirus de rongeur qui reconnaît le MHV et le

RCoV (Besselsen, D. G. *et al.*, 2002) et pour le test de détection du coronavirus canin, reconnaissant le TGEV (Naylor, M. J. *et al.*, 2001). C'est aussi le cas pour celui de la détection du coronavirus bovin (Tsunemitsu, H. *et al.*, 1999), dont nous avons montré qu'il reconnaissait les autres coronavirus du deuxième groupe antigénique.

Il reste la mise au point de notre test sur des échantillons cliniques mais l'originalité de ce dernier porte sur différents points. Premièrement, il permet la détection de virus différents et permet dans le même temps leur différenciation. Cette particularité de notre test contribuerait à la diminution du nombre de tests nécessaires pour l'identification des coronavirus de la ferme. Deuxièmement, l'utilisation d'une paire d'amorces dites universelle est importante puisque le test préserve son utilité advenant le cas de l'émergence des souches possédant de grandes variations génétiques qui échapperaient à la détection par les amorces spécifique d'espèces. Cette paire d'amorces permet, dans tous les cas, la détection d'un ARN viral de coronavirus hémagglutinant jusqu'à 0.06 TCID₅₀.

En ce qui concerne les anticorps monoclonaux contre la S qui ont été produits dans le cadre de ce projet et qui sont présentés dans l'article 3 de ce mémoire, ils constituent, avec les autres anticorps de cet article, les premiers anticorps dirigés contre le HEV et spécifiques à celui-ci. Les anticorps obtenus possèdent des réactions différentes notamment en séroneutralisation. Il sera possible de faire des études sur la localisation et la caractérisation des ces épitopes enfin de fournir des indices sur les mécanismes de la liaison du virus au récepteur de la cellule-hôte.

Les anticorps monoclonaux spécifiques qui ont été produits pourraient servir à la détection du virus, suite à une infection expérimentale, par des techniques d'immunohistochimie ou d'immunofluorescence sur les différents tissus et organes d'animaux. Le but de ce genre d'expérience pourrait être de répondre à une des grandes questions qui restent toujours à élucider soit la compréhension de la ou des voies qu'emprunteraient le HEV pour se rendre jusqu'au système nerveux central et pourrait par le fait même servir de modèle au HCoV-OC43 qui lui aussi a été retrouvé chez des patients atteints de

maladie neurologique. L'importance d'avoir des anticorps spécifiques contre des protéines virales différentes est indéniable puisque ces anticorps pourraient être utilisés pour le criblage de clones infectieux du virus qui auraient reçu un ou plusieurs ORFs du HEV ou pour la confirmation du respect de la structure secondaire et tertiaire de protéines recombinantes ou tronquées.

En résumé, ce projet de maîtrise était somme toute ambitieux et comportait beaucoup d'éléments intéressants. Il apporte sans nul doute des réponses sur la différenciation génomique des coronavirus hémagglutinants par le PCR multiplex et le séquençage. Il n'a pas été possible de réaliser la topographie des déterminants antigéniques de la glycoprotéine S du virus HEV porcin dans le cadre de ce projet comme prévu initialement mais les anticorps monoclonaux dirigés contre cette glycoprotéine qui ont été produits au cours du projet serviront d'outils à cet effet et il est fort probable que les résultats recueillis au cours du projet ouvrent la porte à d'autres projets sur le HEV.

REMERCIEMENTS

Comment faire des remerciements sans oublier personne? C'est très difficile. Je commencerai donc par remercier tous ceux que je ne nommerai pas car chaque personne que l'on croise dans notre vie a quelque chose à nous apprendre. J'ai appris beaucoup, autant au niveau professionnel que personnel aux cours des années passées.

Je veux remercier ceux que je ne peux pas oublier. Premièrement, le Dr. Serge Dea pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je dois beaucoup à cet homme généreux. Merci pour tout. Il y a les collègues de projet, Dr Marie-Josée Sasseville, Mme Anne-Marie Gélinas et Mme Sylvie Chabot qui sont devenues des amies avec qui il était facile de discuter de choses scientifiques et d'autres. Merci au Dr Carl Gagnon et le Dr Ali Kheyar pour leur aide, leur temps et leurs conseils Je voudrais dire merci au technicien et aux techniciennes de l'édifice 27, en particulier à Mme Louise Wilson qui a toujours été disponible pour me fournir des explications sur les expériences se rapportant à mon projet et pour partager ma passion des chats. Tous les autres étudiants du laboratoire du Dr. Dea que j'ai côtoyés au cours de ma maîtrise autant pour les conseils et confidences que pour les moments plus mouvementés.

Merci à mes parents, Guy et Justine, et à mes soeurs, Marie-Hélène et Marie-Christine que j'aime énormément.

Il y a beaucoup d'ami(e)s qui étaient de passage mais d'autres sont restés. Merci à Gabriel Giguère, Patrick Lebrun, Patrick Lévesque, Nadine Allain-Boulé, Martin Roberge, Louis de Léséleuc, Steve Forest, Manon Girard, Marie-Claude Lacoste, Jean-François Michaud, Annie Boisvert, Jean-François Harbour et Jacinthe Brouillette.

Merci à Mme Nicole Sawyer qui restera pour moi un modèle de femme accomplie et heureuse. J'ai appris beaucoup en sa présence et je la remercie d'avoir pris le temps d'être une amie pour moi.

C'est une nouvelle étape qui commence pour moi maintenant et vous formez tous le tremplin qui va me permettre de sauter dans ma nouvelle vie avec beaucoup de confiance.

MERCI!

BIBLIOGRAPHIE

Abraham, S., T. E. Kienzle, W. Lapps et D. A. Brian. 1991. «Deduced sequence of the bovine coronavirus spike protein and identification of internal proteolytic cleavage site.». Virology, vol. 176, p. 296-301.

Alexander, T. J. L. 1962. «Viral encephalomyelitis of swine in Ontario. Experimental and natural transmission.». American Journal of Veterinary Research, vol. 32, p. 756-762.

Alexander, T. J. L., W. P. C. Richards et C. K. Roe. 1959. «An encephalomyelitis of sucking pigs in Ontario». Canadian Journal of Comparative Medicine, vol. 23, p. 316-319.

Allan, G. M. et J. A. Ellis. 2000. «Porcine circoviruses: a review». Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, vol. 12, no. 1, p. 3-14.

Allende, R., G. F. Kutish, W. Laegreid, Z. Lu, T. L. Lewis, D. L. Rock, J. Friesen, J. A. Galeota, A. R. Doster et F. A. Osorio. 2000. «Mutations in the genome of porcine reproductive and respiratory syndrome virus responsible for the attenuation phenotype». Archives of Virology, vol. 145, no. 6, p. 1149-1161.

Allende, R., T. L. Lewis, Z. Lu, D. L. Rock, G. F. Kutish, A. Ali, A. R. Doster et F. A. Osorio. 1999. «North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions». Journal of General Virology, vol. 80 (Pt 2), p. 307-315.

Almeida, J. D., D. M. Berry, C. H. Cunningham, D. Hamre, M. S. Hofstad, L. Malluci, K. McIntosh et D. A. J. Tyrrell. 1968. «Coronaviruses». Nature, vol. 220, p. 650.

Almeida, J. D. et D. A. Tyrrell. 1967. «The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture». Journal of General Virology, vol. 1, no. 2, p. 175-178.

An, S., C. J. Chen, X. Yu, J. L. Leibowitz et S. Makino. 1999. «Induction of apoptosis in murine coronavirus-infected cultured cells and demonstration of E protein as an apoptosis inducer». Journal of Virology, vol. 73, no. 9, p. 7853-7859.

An, S., A. Maeda et S. Makino. 1998. «Coronavirus transcription early in infection». Journal of Virology, vol. 72, no. 11, p. 8517-8524.

Anderson, R. et F. Wong. 1993. «Membrane and phospholipids binding by murine coronaviral nucleocapsid N protein.». Virology, vol. 194, p. 224-232.

Andries, K. et M. B. Pensaert. 1980. «Virus isolated and immunofluorescence in different organs of pigs infected with hemagglutinating encephalomyelitis virus». American Journal of Veterinary Research, vol. 41, no. 2, p. 215-218.

Appel, M., A. S. Greig et A. H. Corner. 1965. «Encephalomyelitis os swine caused by hemagglutinating virus. IV. Transmission studies.». Research in Veterinary Science, vol. 6, p. 482-489.

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, vol. 308, no. 5961, p. 751-752.

Asanaka, M. et M. M. C. Lai. 1993. «Cell fusion studies identified multiple cellular factors involved in mouse hepatitis virus entry». Virology, vol. 197, p. 732-741.

Ballesteros, M. L., C. M. Sanchez et L. Enjuanes. 1997. «Two amino acid changes at the N-terminus of transmissible gastroenteritis coronavirus spike protein result in the loss of enteric tropism». Virology, vol. 227, no. 2, p. 378-388.

Banner, L. R., J. G. Keck et M. M. Lai. 1990. «A clustering of RNA recombination sites adjacent to a hypervariable region of the peplomer gene of murine coronavirus». Virology, vol. 175, no. 2, p. 548-555.

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, vol. 177, no. 2, p. 646-656.

Baric, R. S., C.-K. Shieh, S. A. Stohlman et M. M. C. Lai. 1987. «Analysis of intracellular small RNAs of mouse hepatitis virus: evidence for discontinuous transcription». Virology, vol. 156, no. 2, p. 342-354.

Beaudette, F. R. et C. B. Hudson. 1937. «Cultivation of the virus of infectious bronchitis». Journal of the American Veterinary Medical Association, vol. 90, p. 51-60.

Benbacer, L., E. Kut, L. Besnardeau et coll. 1997. «Interspecies aminopeptidase-N chimera reveal species-specific receptor recognition by canine coronavirus, feline infectious peritonitis virus, and transmissible gastroenteritis virus». Journal of Virology, vol. 71, p. 734-737.

Benfield, D. A. et L. J. Saif. 1990. «Cell culture propagation of a coronavirus isolated from cows with winter dysentery». Journal of Clinical Microbiology, vol. 28, no. 6, p. 1454-1457.

Berry, D. M., J. G. Cruickshank, H. P. Chu et coll. 1964. «The structure of infectious bronchitis virus». Virology, vol. 23, p. 403-407.

Besselsen, D. G., A. M. Wagner et J. K. Loganbill. 2002. «Detection of rodent coronaviruses by use of fluorogenic reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis». Comparative Medicine, vol. 52, no. 2, p. 111-116.

Boireau, P., C. Cruciere et J. Laporte. 1990. «Nucleotide sequence of the glycoprotein S gene of bovine enteric coronavirus and comparison with the S proteins of two mouse hepatitis virus strains». Journal of General Virology, vol. 71 (Pt 2), p. 487-492.

Bos, E. C. W., W. Luytjes, H. van der Meulen et coll. 1996. «The production of recombinant infectious DI-particles of murine coronavirus in the absence of helper virus». Virology, vol. 218, p. 52-60.

Boursnell, M. E., T. D. 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». Journal of General Virology, vol. 68, no. 1, p. 57-77.

Boutin, M., A. M. Sasseville et S. Dea 2001. «Detection and identification of hemagglutinating coronaviruses using group-specific or species-specific single and multiplex RT-PCR». the X international Symposium of veterinary Laboratory Diagnostics, (Salsomaggiore, Parma, Italy, July 4-7), p. 391-392.

Breslin, J. J., L. G. Smith, F. G. Fuller et J. S. Guy. 1999. «Sequences analysis of the turkey coronavirus nucleocapsid gene and 3' untranslated region identifies the virus as a close relative of infectious bronchitis virus.». Virus Research, vol. 65, p. 187-198.

Brian, D. A., B. G. Hogue et T. E. Kienzle. (1995). «The Coronavirus Hemagglutinin Esterase Glycoprotein». S. G. Siddell, (éd.). Dans The Coronaviridae. New-York: Plenum Press, p. 165-179.

Bridger, J. C., E. O. Caul et S. I. Egglestone. 1978. «Replication of an enteric bovine coronavirus in intestinal organ cultures». Archives of Virology, vol. 57, no. 1, p. 43-51.

Callebaut, P. E. et M. B. Pensaert. 1980. «Characterization and isolation of structural polypeptides in haemagglutinating encephalomyelitis virus». Journal of General Virology, vol. 48, no. 1, p. 193-204.

Caron, J., M. Ouardani et S. Dea. 2000. «Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes». Journal of Clinical Microbiology, vol. 38, no. 4, p. 1390-1396.

Cartwright, S. F. et M. Lucas. 1970. «Vomiting and wasting disease in piglets. Virological and epidemiological studies». Veterinary Record, vol. 86, no. 10, p. 278-280.

Cartwright, S. F., M. Lucas, J. P. Cavill, A. F. Gush et T. B. Blandford. 1969. «Vomiting and wasting disease of piglets». Veterinary Record, vol. 84, p. 175-176.

Cavanagh, D. (1995). «Coronavirus Surface Glycoproteins». S. G. Siddell, (éd.). Dans The Coronaviridae. New-York: Plenum Press, p. 73-113.

Cavanagh, D. 1997. «*Nidovirales*: A new order comprising *Coronaviridae* and *Arteriviridae*». Archives of Virology, vol. 142, no. 3, p. 629-633.

Cavanagh, D., D. A. Brian, M. A. Brinton et coll. (1995). «Coronaviridae». F. A. Murphy, F. C. M., D. H. L. Bishop et coll., (éd.). Dans Virus Taxonomy. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Vienna: Springer-Verlag, p. 407-411.

- Cavanagh, D., D. A. Brian, M. A. Brinton, L. Enjuanes, K. V. Holmes, M. C. Horzinek, M. M. C. Lai, H. Laude, P. G. W. Plagemann, S. G. Siddell, W. J. M. Spaan, F. Taguchi et P. J. Talbot. 1994. «Revision of the taxonomy of the coronavirus, torovirus and artirivirus genera.». Archives of Virology, vol. 135, p. 227-237.
- Cavanagh, D., D. A. Brian, L. Enjuanes et coll. 1990. «Recommendation of the Coronavirus Study Group for the nomenclature of the structural proteins, mRNA, and genes of coronaviruses.». Virology, vol. 176, p. 306-307.
- Cavanagh, D., P. J. Davis, D. J. Pappin, M. M. Binns, M. E. Bournsnel et T. D. Brown. 1986. «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 Research, vol. 4, no. 2, p. 133-143.
- Cavanagh, D. et M. C. Horzinek. 1993. «Genus Torovirus assigned to the Coronaviridae». Archives of Virology, vol. 128, p. 395-396.
- Cavanagh, D., K. Mawdiit, M. Sharma, S. E. Drury, H. L. Ainsworth, P. Britton et R. E. Gouch. 2001. «Detection of a coronavirus from turkey poults in Europe genetically related to infectious bronchitis virus of chickens.». Avian Pathol, vol. 30, p. 365-378.
- Chang, R. Y., R. Krishnan et D. A. Brian. 1996. «The UCUAAAC promoter motif is not required for high-frequency leader recombination in bovine coronavirus defective interfering RNA». Journal of Virology, vol. 70, no. 5, p. 2720-2729.
- Chappuis, G., J. Tektouff et Y. Leturdu. 1975. «Isolement en France et identification de la maladie du vomissement et du dépérissement des porcelets (coronalike virus)». recueil de médecine vétérinaire, vol. 151, p. 557-566.
- Cho, K. O., M. Hasoksuz, P. R. Nielsen, K. O. Chang, S. Lathrop et L. J. Saif. 2001. «Cross-protection studies between respiratory and calf diarrhea and winter dysentery coronavirus strains in calves and RT-PCR and nested PCR for their detection». Archives of Virology, vol. 146, no. 12, p. 2401-2419.
- Choi, Y. K., S. M. Goyal, S. W. Kang, M. W. Farnham et H. S. Joo. 2002. «Detection and subtyping of swine influenza H1N1, H1N2 and H3N2 viruses in clinical samples using two multiplex RT-PCR assays». Journal of Virological Methods, vol. 102, no. 1-2, p. 53-59.
- Chomczynski, P. et N. Sacchi. 1987. «Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction». Analytical Biochemistry, vol. 162, no. 1, p. 156-159.
- Chouljenko, V. N., K. G. Kousoulas, X. Lin et J. Storz. 1998. «Nucleotide and predicted amino acid sequences of all genes encoded by the 3' genomic portion (9.5 kb) of respiratory bovine coronaviruses and comparisons among respiratory and enteric coronaviruses». Virus Genes, vol. 17, no. 1, p. 33-42.

- Christopher-Hennings, J., E. A. Nelson, J. K. Nelson, R. J. Hines, S. L. Swenson, H. T. Hill, J. J. Zimmerman, J. B. Katz, M. J. Yaeger, C. C. L. Chase et D. A. Benfield. 1995. «Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR.». Journal of Clinical Microbiology, vol. 33, p. 1730-1734.
- 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, vol. 119, no. 2, p. 358-371.
- Compton, S. R., D. B. Rogers, K. V. Holmes et coll. 1987. «In vitro replication of mouse hepatitis virus strain A 59». Journal of Virology, vol. 61, p. 1814-1820.
- Cornaglia, E., N. Chretien, S. Charara et Y. Elazhary. 1994. «Detection of porcine respiratory coronavirus and transmissible gastroenteritis virus by an enzyme-linked immunosorbent assay». Veterinary Microbiology, vol. 42, no. 4, p. 349-359.
- Coutelier, J. P., C. Godfraind, G. S. Dveksler et coll. 1994. «B lymphocyte and macrophage expression of carcinoembryonal antigen-related adhesion molecules that serve as receptor for murine coronavirus.». European Journal of Immunology, vol. 24, p. 1383-1890.
- Cox, E., M. B. Pensaert et P. Callebaut. 1993. «Intestinal protection against challenge with transmissible gastroenteritis virus of pigs immune after infection with the porcine respiratory coronavirus». Vaccine, vol. 11, no. 2, p. 267-272.
- Cox, G. J., M. D. Parker et L. A. Babiuk. 1989. «The sequence of cDNA of bovine coronavirus 32K nonstructural gene». Nucleic Acids Research, vol. 17, no. 14, p. 5847.
- Cox, G. J., M. D. Parker et L. A. Babiuk. 1991. «Bovine coronavirus nonstructural protein ns2 is a phosphoprotein». Virology, vol. 185, no. 1, p. 509-512.
- Crouch, C. F., H. Bielefeldt Ohmann, T. C. Watts et L. A. Babiuk. 1985. «Chronic shedding of bovine enteric coronavirus antigen-antibody complexes by clinically normal cows». Journal of General Virology, vol. 66 (Pt 7), p. 1489-1500.
- Darwich, L., J. Segales, M. Domingo et E. Mateu. 2002. «Changes in CD4(+), CD8(+), CD4(+) CD8(+), and immunoglobulin M-positive peripheral blood mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs and age-matched uninfected wasted and healthy pigs correlate with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues». Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, vol. 9, no. 2, p. 236-242.
- de Groot, R. J., W. Luytjes, M. C. Horzinek, B. A. van der Zeijst, W. J. Spaan et J. A. Lenstra. 1987. «Evidence for a coiled-coil structure in the spike proteins of coronaviruses». Journal of Molecular Biology, vol. 196, no. 4, p. 963-966.
- de Groot, R. J., J. Maduro, J. A. Lenstra, M. C. Horzinek, B. A. van der Zeijst et W. J. Spaan. 1987. «cDNA cloning and sequence analysis of the gene encoding the peplomer

protein of feline infectious peritonitis virus». Journal of General Virology, vol. 68, no. 10, p. 2639-2646.

de Haan, C. A., M. Smeets, F. Vernooij, H. Vennema et P. J. Rottier. 1999. «Mapping of the coronavirus membrane protein domains involved in interaction with the spike protein». Journal of Virology, vol. 73, no. 9, p. 7441-7452.

de Vries, A. A. F., M. C. Horzinek, P. J. M. Rottier et R. J. De Groot. 1997. «The genome organization of the *Nidovirales*: Similarities and differences between Arteri-, Toro-, and Coronaviruses.». Seminars in Virology, vol. 8, p. 33-47.

Dea, S., R. Bilodeau, R. Sauvageau et G. P. Martineau. 1991. «Outbreaks in Quebec pig farms of respiratory and reproductive problems associated with encephalomyocarditis virus». Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, vol. 3, no. 4, p. 275-282.

Dea, S. et S. Garzon. 1991. «Identification of coronaviruses by the use of indirect protein A-gold immunoelectron microscopy». Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, vol. 3, no. 4, p. 297-305.

Dea, S., S. Garzon, H. Strykowski et P. Tijssen. 1989. «Ultrastructure and protein A-gold immunolabelling of HRT-18 cells infected with turkey enteric coronavirus». Veterinary Microbiology, vol. 20, no. 1, p. 21-33.

Dea, S., S. Garzon et P. Tijssen. 1989. «Identification and location of the structural glycoproteins of a tissue culture-adapted turkey enteric coronavirus». Archives of Virology, vol. 106, no. 3-4, p. 221-237.

Dea, S., S. Garzon et P. Tijssen. 1989. «Intracellular synthesis and processing of the structural glycoproteins of turkey enteric coronavirus». Archives of Virology, vol. 106, no. 3-4, p. 239-259.

Dea, S., S. Garzon et P. Tijssen. 1989. «Isolation and trypsin-enhanced propagation of turkey enteric (bluecomb) coronaviruses in a continuous human rectal adenocarcinoma cell line». American Journal of Veterinary Research, vol. 50, no. 8, p. 1310-1318.

Dea, S., L. Michaud et G. Milane. 1995. «Comparison of bovine coronavirus isolates associated with neonatal calf diarrhoea and winter dysentery in adult dairy cattle in Quebec». Journal of General Virology, vol. 76 (Pt 5), p. 1263-1270.

Dea, S., R. S. Roy et M. E. Begin. 1980. «Bovine coronavirus isolation and cultivation in continuous cell lines». American Journal of Veterinary Research, vol. 41, no. 1, p. 30-38.

Dea, S. et P. Tijssen. 1988. «Identification of the structural proteins of turkey enteric coronavirus». Archives of Virology, vol. 99, no. 3-4, p. 173-186.

Dea, S. et P. Tijssen. 1989. «Antigenic and polypeptide structure of turkey enteric coronaviruses as defined by monoclonal antibodies». Journal of General Virology, vol. 70 (Pt 7), p. 1725-1741.

Dea, S. et P. Tijssen. 1989. «Detection of turkey enteric coronavirus by enzyme-linked immunosorbent assay and differentiation from other coronaviruses». American Journal of Veterinary Research, vol. 50, no. 2, p. 226-231.

Dea, S., A. J. Verbeek et P. Tijssen. 1990. «Antigenic and genomic relationships among turkey and bovine enteric coronaviruses». Journal of Virology, vol. 64, no. 6, p. 3112-3118.

Delmas, B., J. Gelfi et H. Laude. 1986. «Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus. II. Domains in the peplomer glycoprotein». Journal of General Virology, vol. 67, no. 7, p. 1405-1418.

Delmas, B., J. Gelfi, R. L'Haridon, L. K. Vogel, H. Sjostrom, O. Noren et H. Laude. 1992. «Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV». Nature, vol. 357, no. 6377, p. 417-420.

Delmas, B. et H. Laude. 1990. «Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression». Journal of Virology, vol. 64, no. 11, p. 5367-5375.

Dension, M. R., W. J. M. Spaan, Y. van der Meer et coll. 1999. «The putative helicase of the coronavirus mouse hepatitis virus is processed from replicase gene polyprotein and localizes in complexes that are active in viral RNA synthesis.». Journal of Virology, vol. 73, p. 6862-6871.

Deregt, D. et L. A. Babiuk. 1987. «Monoclonal antibodies to bovine coronavirus: characteristics and topographical mapping of neutralizing epitopes on the E2 and E3 glycoproteins». Virology, vol. 161, no. 2, p. 410-420.

Deregt, D., G. A. Gifford, M. K. Ijaz, T. C. Watts, J. E. Gilchrist, D. M. Haines et L. A. Babiuk. 1989. «Monoclonal antibodies to bovine coronavirus glycoproteins E2 and E3: demonstration of in vivo virus-neutralizing activity». Journal of General Virology, vol. 70, no. Pt 4, p. 993-998.

Deregt, D., G. A. Gifford, M. Khalid Ijaz et coll. 1989. «Monoclonal antibodies to bovine coronavirus glycoproteins E2 and E3: Demonstration of in vivo neutralizing activity.». Journal of General Virology, vol. 70, p. 993-998.

Deregt, D., M. Sabara et L. A. Babiuk. 1987. «Structural proteins of bovine coronavirus and their intracellular processing». Journal of General Virology, vol. 68, no. 11, p. 2863-2877.

Domingo, E. 2000. «Viruses at the edge of adaptation». Virology, vol. 270, no. 2, p. 251-253.

Dubois-Dalcq, M. E., E. W. Doller, M. V. Haspel et K. V. Holmes. 1982. «Cell tropism and expression of mouse hepatitis viruses (MHV) in mouse spinal cord cultures». Virology, vol. 119, no. 2, p. 317-331.

- 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». Journal of Virology, vol. 65, no. 12, p. 6881-6891.
- Elazhary, M. A., A. Silim et S. Dea. 1984. «Prevalence of antibodies to bovine respiratory syncytial virus, bovine viral diarrhoea virus, bovine herpesvirus-1, and bovine parainfluenza-3 virus in sheep and goats in Quebec». American Journal of Veterinary Research, vol. 45, no. 8, p. 1660-1662.
- El-Ghorr, A. A., D. R. Snodgrass, F. M. Scott et I. Campbell. 1989. «A serological comparison of bovine coronavirus strains». Archives of Virology, vol. 104, no. 3-4, p. 241-248.
- Fazakerley, J. K., S. E. Parker, F. Bloom et M. J. Buchmeier. 1992. «The V5A13.1 envelope glycoprotein deletion mutant of mouse hepatitis virus type-4 is neuroattenuated by its reduced rate of spread in the central nervous system.». Virology, vol. 187, p. 178-188.
- Fischer, F., C. F. Stegen, P. S. Masters et W. A. Samsonoff. 1998. «Analysis of constructed E gene mutants of mouse hepatitis virus confirms a pivotal role for E protein in coronavirus assembly». Journal of Virology, vol. 72, no. 10, p. 7885-7894.
- Fleming, J. O., R. A. Shubin, M. A. Sussman, N. Casteel et S. A. Stohlman. 1989. «Monoclonal antibodies to the matrix (E1) glycoprotein of mouse hepatitis virus protect mice from encephalitis». Virology, vol. 168, no. 1, p. 162-167.
- Fleming, J. O., M. D. Trousdale, J. Bradbury, S. A. Stohlman et L. P. Weiner. 1987. «Experimental demyelination induced by coronavirus JHM (MHV-4): molecular identification of a viral determinant of paralytic disease». Microbial Pathogenesis, vol. 3, no. 1, p. 9-20.
- Fosmire, J. A., K. Hwang et S. Makino. 1992. «Identification and characterization of a coronavirus packaging signal». Journal of Virology, vol. 66, no. 6, p. 3522-3530.
- Fukutomi, T., H. Tsunemitsu et H. Akashi. 1999. «Detection of bovine coronaviruses from adult cows with epizootic diarrhoea and their antigenic and biological diversities». Archives of Virology, vol. 144, no. 5, p. 997-1006.
- Gallagher, T. M. et M. J. Buchmeier. 2001. «Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis». Virology, vol. 279, no. 2, p. 371-374.
- Gallagher, T. M., C. Escarmis et M. J. Buchmeier. 1991. «Alteration of the pH dependence of coronavirus-induced cell fusion: effect of mutations in the spike glycoprotein». Journal of Virology, vol. 65, no. 4, p. 1916-1928.
- Garwes, D. J. (1995). «Pathogenesis of the porcine coronaviruses». S. G. Siddell, (éd.). Dans The Coronaviridae. New-York: Plenum Press, p. 384-388.

Gélinas, A. M., M. Boutin, A. M. Sasseville et S. Dea. 2001. «Bovine coronaviruses associated with enteric and respiratory diseases in Canadian dairy cattle display different reactivities to anti-HE monoclonal antibodies and distinct amino acid changes in their HE, S and ns4.9 protein». Virus Research, vol. 76, no. 1, p. 43-57.

Gilbert, S. A., R. Larochelle, R. Magar, H. G. Cho et D. Deregt. 1997. «Typing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by multiplex PCR assay.». Journal of Clinical Microbiology, vol. 35, p. 264-267.

Gilmore, W., J. O. Fleming, S. A. Stohlman et L. P. Weiner. 1987. «Characterization of the structural proteins of the murine coronavirus strain A59 using monoclonal antibodies». Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, vol. 185, no. 2, p. 177-186.

Godet, M., J. Grosclaude, B. Delmas et H. Laude. 1994. «Major receptor-binding and neutralization determinants are located within the same domain of the transmissible gastroenteritis virus (coronavirus) spike protein». Journal of Virology, vol. 68, no. 12, p. 8008-8016.

Godet, M., R. L'Haridon, J. F. Vautherot et H. Laude. 1992. «TGEV corona virus ORF4 encodes a membrane protein that is incorporated into virions». Virology, vol. 188, no. 2, p. 666-675.

Godfraind, C., S. G. Langreth, C. B. Cardellicchio et coll. 1995. «Tissue and cellular distribution of an adhesion molecule in the carcinoembryonic antigen family that serve as a receptor for mouse hepatitis virus.». Laboratory Investigation, vol. 73, p. 615-627.

Gorbalenya, A. E., E. V. Koonin, A. P. Donchenco et V. M. Blinov. 1989. «Prediction of putative functional domains in the non-structural polyprotein by comparative amino acid sequence analysis.». Nucleic Acids Research, vol. 17, p. 4847-4861.

Greig, A. S. et A. M. Bouillant. 1972. «Studies on the hemagglutination phenomenon of hemagglutinating encephalomyelitis virus (HEV) of pigs». Canadian Journal of Comparative Medicine, vol. 36, no. 4, p. 366-370.

Greig, A. S., C. M. Johnson et A. M. P. Bouillant. 1971. «Encephalomyelitis of swine caused by a hemagglutinating virus. VI. Morphology of the virus.». Research in Veterinary Science, vol. 12, p. 305-307.

Greig, A. S., D. Mitchell, A. H. Corner, G. L. Bannister, E. B. Meads et R. J. Julian. 1962. «A hemagglutinating virus producing encephalomyelitis in baby pigs». Canadian Journal of Comparative Medicine, vol. 26, p. 49-56.

Griffiths, G. et P. Rottier. 1992. «Cell biology of viruses that assemble along the biosynthetic pathway». Seminars in Cell Biology, vol. 3, no. 5, p. 367-381.

Grotzinger, C., G. Heusipp, J. Ziebuhr et coll. 1996. «Characterization of a 105-kDa polypeptide encoded in gene 1 of the human coronavirus HCV 229E». Virology, vol. 222, p. 227-235.

Hasoksuz, M., S. Lathrop, M. A. Al-dubaib, P. Lewis et L. J. Saif. 1999. «Antigenic variation among bovine enteric coronaviruses (BECV) and bovine respiratory coronaviruses (BRCV) detected using monoclonal antibodies». Archives of Virology, vol. 144, no. 12, p. 2441-2447.

Herrler, G., I. Durkop, H. Becht et H. D. Klenk. 1988. «The glycoprotein of influenza C virus is the haemagglutinin, esterase and fusion factor». Journal of General Virology, vol. 69 (Pt 4), p. 839-846.

Hingley, S. T., J. L. Gombold, E. Lavi et S. R. Weiss. 1994. «MHV-A59 fusion mutants are attenuated and display altered hepatotropism.». Virology, vol. 200, p. 1-10.

Hofmann, M. A., S. D. Senanayake et D. A. Brian. 1993. «An intraleader open reading frame is selected from a hypervariable 5' terminus during persistent infection by the bovine coronavirus». Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 342, p. 105-109.

Hofmann, M. A., P. B. Sethna et D. A. Brian. 1990. «Bovine coronavirus mRNA replication continues throughout persistent infection in cell culture.». Journal of Virology, vol. 64, p. 4108-4114.

Hogue, B. G. et D. A. Brian. 1986. «Structural proteins of human respiratory coronavirus OC43». Virus Research, vol. 5, no. 2-3, p. 131-144.

Hogue, B. G., T. E. Kienzle et D. A. Brian. 1989. «Synthesis and processing of the bovine enteric coronavirus haemagglutinin protein». Journal of General Virology, vol. 70, no. 2, p. 345-352.

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». Journal of Virology, vol. 51, no. 2, p. 384-388.

Holmes, K. V., E. W. Doller et L. S. Sturman. 1981. «Tunicamycin resistant glycosylation of coronavirus glycoprotein: demonstration of a novel type of viral glycoprotein». Virology, vol. 115, no. 2, p. 334-344.

Holmes, K. V. et M. M. C. Lai. (1996). «Coronaviridae: The viruses and their replication». B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et *e. al.*, (éd.). Dans Fields Virology. Philadelphia: Liipincott-Raven, p. 1075-1093.

Holmes, K. V. a. L. M. M. C. (1996). «Coronaviridae: The viruses and their replication». D. M. K. B.N. Fields, P.M. Howley, et al., (éd.). Dans Fundamental virology, Third Edition. Philadelphia: Lippincott - Raven Publishers, p. 541-559.

- Horzinek, M. C., H. Lutz et N. C. Pedersen. 1982. «Antigenic relationships among homologous structural polypeptides of porcine, feline, and canine coronaviruses». Infection and Immunity, vol. 37, no. 3, p. 1148-1155.
- Hussain, K. A., J. Storz et K. G. Kousoulas. 1991. «Comparison of bovine coronavirus (BCV) antigens: monoclonal antibodies to the spike glycoprotein distinguish between vaccine and wild-type strains». Virology, vol. 183, no. 1, p. 442-445.
- Ismail, M. M., K. O. Cho, M. Hasoksuz, L. J. Saif et Y. M. Saif. 2001. «Antigenic and genomic relatedness of turkey-origin coronaviruses, bovine coronaviruses, and infectious bronchitis virus of chickens». Avian Diseases, vol. 45, no. 4, p. 978-984.
- Jacobs, L., W. J. Spaan, M. C. Horzinek et B. A. van der Zeijst. 1981. «Synthesis of subgenomic mRNA's of mouse hepatitis virus is initiated independently: evidence from UV transcription mapping». Journal of Virology, vol. 39, no. 2, p. 401-406.
- Kamahora, T., L. H. Soe et M. M. Lai. 1989. «Sequence analysis of nucleocapsid gene and leader RNA of human coronavirus OC43». Virus Research, vol. 12, no. 1, p. 1-9.
- Kaye, H. S., W. B. Yarbrough, C. J. Reed et A. K. Harrison. 1977. «Antigenic relationship between human coronavirus strain OC 43 and hemagglutinating encephalomyelitis virus strain 67N of swine: antibody responses in human and animal sera». Journal of Infectious Diseases, vol. 135, no. 2, p. 201-209.
- Keck, J. G., S. Makino, L. H. Soe, J. O. Fleming, S. A. Stohlman et M. M. Lai. 1987. «RNA recombination of coronavirus». Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 218, p. 99-107.
- Keck, J. G., S. A. Stohlman, L. H. Soe et coll. 1987. «multiple recombinaison site at the 5'-end of murine coronavirus RNA». Virology, vol. 156, p. 331-341.
- Kennedy, M., S. Citino, A. H. McNabb, A. S. Moffatt, K. Gertz et S. Kania. 2002. «Detection of feline coronavirus in captive Felidae in the USA». Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, vol. 14, no. 6, p. 520-522.
- Kienzle, T. E., S. Abraham, B. G. Hogue et D. A. Brian. 1990. «Structure and expression of the bovine coronavirus hemagglutinin protein». Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 276, p. 95-102.
- Kienzle, T. E., S. Abraham, B. G. Hogue et D. A. Brian. 1990. «Structure and orientation of expressed bovine coronavirus hemagglutinin- esterase protein». Journal of Virology, vol. 64, no. 4, p. 1834-1838.
- Kim, L., K. O. Chang, K. Sestak, A. Parwani et L. J. Saif. 2000. «Development of a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay for differential diagnosis of transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus from feces and nasal swabs of infected pigs». Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, vol. 12, no. 4, p. 385-388.

- Kim, O., C. Choi, B. Kim et C. Chae. 2000. «Detection and differentiation of porcine epidemic diarrhoea virus and transmissible gastroenteritis virus in clinical samples by multiplex RT-PCR». Veterinary Record, vol. 146, no. 22, p. 637-640.
- Kim, S. Y., D. S. Song et B. K. Park. 2001. «Differential detection of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus by duplex RT-PCR». Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, vol. 13, no. 6, p. 516-520.
- King, B. et D. A. Brian. 1982. «Bovine coronavirus structural proteins». Journal of Virology, vol. 42, no. 2, p. 700-707.
- King, B., B. J. Potts et D. A. Brian. 1985. «Bovine coronavirus hemagglutinin protein». Virus Research, vol. 2, no. 1, p. 53-59.
- Klumperman, J., J. K. Locker, A. Meijer et coll. 1994. «Coronavirus M proteins accumulate in the Golgi complex beyond the site of virion budding». Journal of Virology, vol. 68, p. 6523-6534.
- Koch, G., L. Hartog, A. Kant et D. J. van Roozelaar. 1990. «Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: correlation with biological functions». Journal of General Virology, vol. 71, no. 9, p. 1929-1935.
- Kocherhans, R., A. Bridgen, M. Ackermann et K. Tobler. 2001. «Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence». Virus Genes, vol. 23, no. 2, p. 137-144.
- Kooi, C., M. Cervin et R. Anderson. 1991. «Differentiation of acid-pH-dependent and -nondependent entry pathways for mouse hepatitis virus». Virology, vol. 180, no. 1, p. 108-119.
- Kourtesis, A. B., A. M. Gelinis et S. Dea. 2001. «Genomic and antigenic variations of the HE glycoprotein of bovine coronaviruses associated with neonatal calf diarrhea and winter dysentery». Archives of Virology, vol. 146, no. 6, p. 1219-1230.
- Kubo, H., Y. K. Yamada et F. Taguchi. 1994. «Localization of neutralizing epitopes and the receptor-binding site within the amino-terminal 330 amino acids of the murine coronavirus spike protein». Journal of Virology, vol. 68, p. 5403-5410.
- Kubota, S., O. Sasaki, K. Amimoto, N. Okada, T. Kitazima et H. Yasuhara. 1999. «Detection of porcine epidemic diarrhea virus using polymerase chain reaction and comparison of the nucleocapsid protein genes among strains of the virus». Journal of Veterinary Medical Science, vol. 61, no. 7, p. 827-830.
- Kusters, J. G., E. J. Jager, H. G. Niesters et B. A. van der Zeijst. 1990. «Sequence evidence for RNA recombination in field isolates of avian coronavirus infectious bronchitis virus». Vaccine, vol. 8, no. 6, p. 605-608.

- Labonté, P., S. Mounir et P. J. Talbot. 1995. «Sequence and expression of the ns2 protein gene of human coronavirus OC43». Journal of General Virology, vol. 76, no. 2, p. 431-435.
- Laemmli, U. K. 1970. «Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4». Nature, vol. 227, no. 259, p. 680-685.
- Lai, C. H., M. W. Welter et L. M. Welter. 1995. «The use of arms PCR and RFLP analysis in identifying genetic profiles of virulent, attenuated or vaccine strains of TGEV and PRCV». Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 380, p. 243-250.
- Lai, M. M. 1986. «Coronavirus leader-RNA-primed transcription: an alternative mechanism to RNA splicing». Bioessays, vol. 5, no. 6, p. 257-260.
- Lai, M. M. 1990. «Coronavirus: organization, replication and expression of genome». Annual Review of Microbiology, vol. 44, p. 303-333.
- Lai, M. M., R. S. Baric, S. Makino, J. G. Keck, J. Egbert, J. L. Leibowitz et S. A. Stohman. 1985. «Recombination between nonsegmented RNA genomes of murine coronaviruses». Journal of Virology, vol. 56, no. 2, p. 449-456.
- Lai, M. M. et D. Cavanagh. 1997. «The molecular biology of coronaviruses». Advances in Virus Research, vol. 48, p. 1-100.
- Lai, M. M., C. L. Liao, Y. J. Lin et X. Zhang. 1994. «Coronavirus: how a large RNA viral genome is replicated and transcribed». Infectious Agents and Disease, vol. 3, no. 2-3, p. 98-105.
- Lai, M. M., C. D. Patton, R. S. Baric et S. A. Stohman. 1983. «Presence of leader sequences in the mRNA of mouse hepatitis virus». Journal of Virology, vol. 46, no. 3, p. 1027-1033.
- Lai, M. M. C. et K. V. Holmes. (2001). «*Coronaviridae*: The viruses and their replication». D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman et S. E. Straus, (éd.). Dans Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 1163-1185.
- Laporte, J., P. Bobulesco et F. Rossi. 1980. «Une lignée particulièrement sensible à la réplication du coronavirus entérique bovin: les cellules HRT-18». Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences. Serie D, Sciences Naturelles, vol. 290, no. 9, p. 623-626.
- Lapps, W., B. G. Hogue et D. A. Brian. 1987. «Deduced amino acid sequence and potential O-glycosylation sites for the bovine coronavirus matrix protein». Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 218, p. 123-129.
- Lapps, W., B. G. Hogue et D. A. Brian. 1987. «Sequence analysis of the bovine coronavirus nucleocapsid and matrix protein genes». Virology, vol. 157, no. 1, p. 47-57.

Larochelle, R., M. Antaya, M. Morin et R. Magar. 1999. «Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR». Journal of Virological Methods, vol. 80, no. 1, p. 69-75.

Laude, H., J. M. Chapsal, J. Gelfi, S. Labiau et J. Grosclaude. 1986. «Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus. I. Properties of monoclonal antibodies directed against virion proteins». Journal of General Virology, vol. 67, no. 1, p. 119-130.

Laude, H., J. Gelfi, L. Lavenant et B. Charley. 1992. «Single amino acid changes in the viral glycoprotein M affect induction of alpha interferon by the coronavirus transmissible gastroenteritis virus». Journal of Virology, vol. 66, no. 2, p. 743-749.

Laude, H. et P. S. Masters. (1995). «The coronavirus surface glycoproteins». S. G. Siddell, (éd.) Dans The Coronaviridae. New-York: Plenum Press, p. 73-113.

Lecomte, J., V. Cainelli-Gebara, G. Mercier, S. Mansour, P. J. Talbot, G. Lussier et D. Oth. 1987. «Protection from mouse hepatitis virus type 3-induced acute disease by an anti-nucleoprotein monoclonal antibody. Brief report». Archives of Virology, vol. 97, no. 1-2, p. 123-130.

Lee, H. J., C. K. Shieh, A. E. Gorbalenya, E. V. Koonin, N. La Monica, J. Tuler, A. Bagdzhadzhyan et M. M. Lai. 1991. «The complete sequence (22 kilobases) of murine coronavirus gene 1 encoding the putative proteases and RNA polymerase». Virology, vol. 180, no. 2, p. 567-582.

Li, H.-P., P. Huang, S. Park et M. M. C. Lai. 1999. «Polypyrimidine tract-binding protein binds to the leader RNA of mouse hepatitis virus and serves as a regulator of viral transcription». Journal of Virology, vol. 73, p. 772-777.

Li, H.-P., X. Zhang, R. Duncan et coll. 1997. «Heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1 binds to the transcription-regulatory region of mouse hepatitis virus RNA.». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 94, p. 9544-9549.

Liao, C. L. et M. M. Lai. 1992. «RNA recombination in a coronavirus: recombination between viral genomic RNA and transfected RNA fragments». Journal of Virology, vol. 66, no. 10, p. 6117-6124.

Lin, T. I., S. C. Tsai, C. C. Wu, T. A. Bryan, H. L. Thaker, T. Hooper et D. Schrader. 2002. «Characterization of turkey coronaviruses from turkey poults with acute enteritis.». Veterinary Microbiology, vol. 84, p. 179-186.

Lin, X., K. L. O'Reilly et J. Storz. 1997. «Infection of polarized epithelial cells with enteric and respiratory tract bovine coronaviruses and release of virus progeny». American Journal of Veterinary Research, vol. 58, no. 10, p. 1120-1124.

Liu, D. X., I. Brierley, K. W. Tibbles et T. D. K. Brown. 1994. «A 100-kilodalton polypeptide encoded by open reading frame (ORF) 1b of the coronavirus infectious

- bronchitis virus is processed by ORF1a products». Journal of Virology, vol. 68, p. 5772-5780.
- Liu, D. X. et T. D. K. Brown. 1995. «Characterisation and mutational analysis of an ORF 1a-encoding proteinase domain responsible for proteolytic processing of the infectious bronchitis virus 1a/1b polyprotein.». Journal of Virology, vol. 209, p. 420-427.
- Liu, D. X. et S. C. Inglis. 1991. «Association of the infectious bronchitis virus 3c protein with the virion envelope». Virology, vol. 185, no. 2, p. 911-917.
- Liu, D. X., S. Shen, H. Y. Xu et S. F. Wang. 1998. «Proteolytic mapping of the coronavirus infectious bronchitis virus 1b polyprotein: Evidence for the presence of four cleavage sites of the 3C-like proteinase and identification of two novel cleavage products.». Virology, vol. 246, p. 288-299.
- Loa, C. C., T. I. Lin, C. C. Wu, T. A. Bryan, H. L. Thaker, T. Hooper et D. Schrader. 2000. «detection of antibody, to turkey coronavirus by antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay utilizing infectious bronchitis virus». Avian Diseases, vol. 44, p. 498-506.
- Locker, J. K., J. K. Rose, M. C. Horzinek et P. J. Rottier. 1992. «Membrane assembly of the triple-spanning coronavirus M protein. Individual transmembrane domains show preferred orientation». Journal of Biological Chemistry, vol. 267, no. 30, p. 21911-21918.
- Lu, X. T., Y. Q. Lu et M. R. Denson. 1996. «Intracellular and in vitro-translated 27-kDa proteins contain the 3C-like proteinase activity of the coronavirus MHV-A59.». Virology, vol. 222, p. 375-382.
- Lu, Y. Q., X. T. Lu et M. R. Denson. 1995. «Identification and characterization of a serine-like proteinase of the murine coronavirus MHV-A59». Journal of Virology, vol. 69, p. 3554-3559.
- Luo, Z. et S. Weiss. 1998. «Roles in the cell-to-cell fusion of two conserved hydrophobic regions in the murine coronavirus spike protein.». Virology, vol. 244, p. 483-494.
- Luytjes, W., P. J. Bredenbeek, A. F. Noten, M. C. Horzinek et W. J. Spaan. 1988. «Sequence of mouse hepatitis virus A59 mRNA 2: indications for RNA recombination between coronaviruses and influenza C virus». Virology, vol. 166, no. 2, p. 415-422.
- Luytjes, W., L. S. Sturman, P. J. Bredenbeek, J. Charite, B. A. van der Zeijst, M. C. Horzinek et W. J. Spaan. 1987. «Primary structure of the glycoprotein E2 of coronavirus MHV-A59 and identification of the trypsin cleavage site». Virology, vol. 161, no. 2, p. 479-487.
- Machamer, C. E., M. G. Grim, A. Esquela, S. W. Chung, M. Rolls, K. Ryan et A. M. Swift. 1993. «Retention of a cis Golgi protein requires polar residues on one face of a predicted alpha-helix in the transmembrane domain». Molecular Biology of the Cell, vol. 4, no. 7, p. 695-704.

- Macnaughton, M. R., H. A. Davies et M. V. Nermut. 1978. «Ribonucleoprotein-like structures from coronavirus particules». Journal of General Virology, vol. 39, p. 545-549.
- Maeda, A., S. An et S. Makino. 1998. «Importance of coronavirus negative-strand genomic RNA synthesis prior to subgenomic RNA transcription». Virus Research, vol. 57, no. 1, p. 35-42.
- Makino, S., J. G. Keck, S. A. Stohlman et M. M. Lai. 1986. «High-frequency RNA recombination of murine coronaviruses». Journal of Virology, vol. 57, no. 3, p. 729-737.
- Makino, S., S. A. Stohlman et M. M. Lai. 1986. «Leader sequences of murine coronavirus mRNAs can be freely reassorted: evidence for the role of free leader RNA in transcription». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 83, no. 12, p. 4204-4208.
- Mardassi, H., R. Athanassious, S. Mounir et S. Dea. 1994. «Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: morphological, biochemical and serological characteristics of Quebec isolates associated with acute and chronic outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome». Canadian Journal of Veterinary Research, vol. 58, no. 1, p. 55-64.
- Mardassi, H., L. Wilson, S. Mounir et S. Dea. 1994. «Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and efficient differentiation between Canadian and European strains by reverse transcription and PCR amplification». Journal of Clinical Microbiology, vol. 32, no. 9, p. 2197-2203.
- Masters, P. S. 1992. «Localization of an RNA-binding domain in the nucleocapsid protein of the coronavirus mouse hepatitis virus». Archives of Virology, vol. 125, no. 1-4, p. 141-160.
- Masters, P. S., C. A. Koetzner, C. A. Kerr et Y. Heo. 1994. «Optimization of targeted RNA recombination and mapping of a novel nucleocapsid gene mutation in coronavirus mouse hepatitis virus.». Journal of Virology, vol. 68, p. 328-337.
- McIntosh, K. 1974. «Coronaviruses. A comparative review.». Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 63, p. 85-129.
- McIntosh, K., J. H. Dees, W. B. Becker, A. Z. Kapikian et R. M. Chanock. 1967. «Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 57, no. 4, p. 933-940.
- 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». American Journal of Veterinary Research, vol. 34, no. 2, p. 145-150.
- Mengeling, W. L., A. D. Boothe et A. E. Ritchie. 1972. «Characteristics of a coronavirus (strain 67N) of pigs». American Journal of Veterinary Research, vol. 33, no. 2, p. 297-308.

- Mengeling, W. L. et R. C. Cutlip. 1976. «Pathogenicity of field isolants of hemagglutinating encephalomyelitis virus for neonatal pigs.». Journal of the American Veterinary Medical Association, vol. 168, p. 236-239.
- Michaud, L. et S. Dea. 1993. «Characterization of monoclonal antibodies to bovine enteric coronavirus and antigenic variability among Quebec isolates». Archives of Virology, vol. 131, no. 3-4, p. 455-465.
- Milane, G., A. B. Kourtesis et S. Dea. 1997. «Characterization of monoclonal antibodies to the hemagglutinin-esterase glycoprotein of a bovine coronavirus associated with winter dysentery and cross-reactivity to field isolates». Journal of Clinical Microbiology, vol. 35, no. 1, p. 33-40.
- Molitor, T. W., E. M. Bautista et C. S. Choi. 1997. «Immunity to PRRSV: double-edged sword». Veterinary Microbiology, vol. 55, no. 1-4, p. 265-276.
- Molitor, T. W., K. Oraveerakul, Q. Q. Zhang, C. S. Choi et L. R. Ludemann. 1991. «Polymerase chain reaction (PCR) amplification for the detection of porcine parvovirus». Journal of Virological Methods, vol. 32, no. 2-3, p. 201-211.
- Mounir, S., P. Labonte et P. J. Talbot. 1993. «Characterization of the nonstructural and spike proteins of the human respiratory coronavirus OC43: comparison with bovine enteric coronavirus». Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 342, p. 61-67.
- Mounir, S. et P. J. Talbot. 1992. «Sequence analysis of the membrane protein gene of human coronavirus OC43 and evidence for O-glycosylation». Journal of General Virology, vol. 73 (Pt 10), p. 2731-2736.
- Mounir, S. et P. J. Talbot. 1993. «Human coronavirus OC43 RNA 4 lacks two open reading frames located downstream of the S gene of bovine coronavirus». Virology, vol. 192, no. 1, p. 355-360.
- Mounir, S. et P. J. Talbot. 1993. «Molecular characterization of the S protein gene of human coronavirus OC43». Journal of General Virology, vol. 74 (Pt 9), p. 1981-1987.
- Naylor, M. J., G. A. Harrison, R. P. Monckton, S. McOrist, P. R. Lehrbach et E. M. Deane. 2001. «Identification of canine coronavirus strains from feces by S gene nested PCR and molecular characterization of a new Australian isolate». Journal of Clinical Microbiology, vol. 39, no. 3, p. 1036-1041.
- Nguyen, V.-P. et B. G. Hogue. 1997. «Protein interactions during coronavirus assembly.». Journal of Virology, vol. 71, p. 9278-9284.
- 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 Journal, vol. 1, no. 12, p. 1499-1504.

- Niemann, H., R. Geyer, H. D. Klenk, D. Linder, S. Stirm et M. Wirth. 1984. «The carbohydrates of mouse hepatitis virus (MHV) A59: structures of the O-glycosidically linked oligosaccharides of glycoprotein E1». EMBO Journal, vol. 3, p. 665-670.
- Ollis, D. L. et S. W. White. 1987. «Structural basis of protein-nucleic interactions». Chemical Reviews, vol. 87, p. 981.
- Opstelten, D. J. E., M. J. B. Raamsman, K. Wolfs et coll. 1995. «Envelope glycoprotein interactions in coronavirus assembly». Journal of Cell Biology, vol. 131, p. 339-349.
- Oshiro, L. S. (1973). «Coronaviruses». A. J. Dalton et F. Haguenu, (éd.). Dans Ultrastructure of animal viruses and bacteriophages: An atlas. New-York: Academic Press, p. 331-343.
- Ouardani, M., L. Wilson, R. Jette, C. Montpetit et S. Dea. 1999. «Multiplex PCR for detection and typing of porcine circoviruses». Journal of Clinical Microbiology, vol. 37, no. 12, p. 3917-3924.
- Pachuk, C. J., P. J. Bredenbeek, P. W. Zoltick, W. J. Spaan et S. R. Weiss. 1989. «Molecular cloning of the gene encoding the putative polymerase of mouse hepatitis coronavirus, strain A59». Virology, vol. 171, no. 1, p. 141-148.
- Page, K. W., K. L. Mawditt et P. Britton. 1991. «Sequence comparison of the 5' end of mRNA 3 from transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus». Journal of General Virology, vol. 72 (Pt 3), p. 579-587.
- 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». Journal of General Virology, vol. 70, no. 1, p. 155-164.
- Parker, M. D., D. Yoo et L. A. Babiuk. 1990. «Expression and secretion of the bovine coronavirus hemagglutinin-esterase glycoprotein by insect cells infected with recombinant baculoviruses». Journal of Virology, vol. 64, no. 4, p. 1625-1629.
- Parker, M. D., D. Yoo, G. J. Cox et L. A. Babiuk. 1990. «Primary Structure of the S peplomer gene of bovine coronavirus and surface expression in insect cells». Journal of General Virology, vol. 71, no. Pt 8, p. 1885.
- Parker, S. E. et M. J. Buchmeier. 1990. «RNA sequence analysis of the E2 genes of wildtype and neuroattenuated mutants of MHV-4 reveals a hypervariable domain». Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 276, p. 395-402.
- Pedersen, N. C., J. Ward et W. L. Mengeling. 1978. «Antigenic relationship of the feline infections peritonitis virus to coronaviruses of other species». Archives of Virology, vol. 58, no. 1, p. 45-53.
- Pensaert, M. B. et K. Andries. (1993). «Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus». I. S. U. Press, (éd.). Dans Diseases of Swine, section 2 Viral Diseases. Ames, Iowa p. 268-273.

- Pensaert, M. B. et P. E. Callebaut. 1974. «Characteristic of a coronavirus causing vomiting and wasting in pigs.». Archiv fur Die Gesamte Virusforschung, vol. 44, p. 35-50.
- Phillip, J. I. H., S. F. Cartwright et A. C. Scott. 1971. «The size and morphology of T.G.E. and vomiting and wasting disease viruses of pigs.». Veterinary Record, vol. 88, p. 311-312.
- Phillips, J. J., M. Chua, S. H. Seo et S. R. Weiss. 2001. «Multiple regions of the murine coronavirus spike glycoprotein influence neurovirulence». Journal of Neurovirology, vol. 7, no. 5, p. 421-431.
- Phillips, J. J., M. M. Chua, G. F. Rall et S. R. Weiss. 2002. «Murine coronavirus spike glycoprotein mediates degree of viral spread, inflammation, and virus-induced immunopathology in the central nervous system». Virology, vol. 301, no. 1, p. 109-120.
- Pringle, C. R. 1996. «Virus taxonomy 1996 - a bulletin from the Xth International Congress of Virology in Jerusalem.». Archives of Virology, vol. 141, p. 2251-2256.
- Rasschaert, D. et H. Laude. 1987. «The predicted primary structure of the peplomer protein E2 of the porcine coronavirus transmissible gastroenteritis virus». Journal of General Virology, vol. 68, no. 7, p. 1883-1890.
- Rekik, M. R. et S. Dea. 1994. «Comparative sequence analysis of a polymorphic region of the spike glycoprotein S1 subunit of enteric bovine coronavirus isolates». Archives of Virology, vol. 135, no. 3-4, p. 319-331.
- 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». Archives of Virology, vol. 85, no. 1-2, p. 71-83.
- Risco, C., I. M. Anton, L. Enjuanes et J. L. Carrasco. 1996. «The transmissible gastroenteritis coronavirus contains a spherical core shell consisting of M and N proteins.». Journal of Virology, vol. 70, p. 4773-4777.
- Risco, C., M. Muntion, L. Enjuanes et J. L. Carrasco. 1998. «Two types of virus-related particules are founds during transmissible gastroenteritis virus morphogenesis». Journal of Virology, vol. 72, p. 4022-4031.
- Robb, J. A. et C. W. Bond. (1979). «Coronaviridae». H. Fraenkel-Conrat et R. R. Wagner, (éd.). Dans Comprehensive virology. New York: Plenum Press, p. 193-247.
- Roe, C. K. et T. J. L. Alexander. 1958. «A disease of nursing pigs previously unreported in Ontario». Canadian Journal of Comparative Medicine, vol. 22, p. 305-307.
- Rossmann, W., S. Vilcek, H. Wenzl, E. Rossmann, A. Loitsch, B. Durkovic, L. Strojny et D. J. Paton. 2001. «Improved antigen and nucleic acid detection in a bovine virus diarrhoea eradication program». Veterinary Microbiology, vol. 81, no. 3, p. 207-218.

Rottier, P. J., W. J. Spaan, M. C. Horzinek et B. A. van der Zeijst. 1981. «Translation of three mouse hepatitis virus strain A59 subgenomic RNAs in *Xenopus laevis* oocytes». Journal of Virology, vol. 38, no. 1, p. 20-26.

Rottier, P. J. M. (1995). «Coronavirus membrane protein». S. G. Siddell, (éd.). Dans The Coronaviridae. New-York: Plenum Press, p. 115-139.

Routledge, E., R. Stauber, M. Pfeleiderer et S. G. Siddell. 1991. «Analysis of murine coronavirus surface glycoprotein functions by using monoclonal antibodies». Journal of Virology, vol. 65, no. 1, p. 254-262.

Sansom, J. N., T. G. de Bruin, J. J. Voermans, J. J. Meulenber, J. M. Pol et A. T. Bianchi. 2000. «Changes of leukocyte phenotype and function in the broncho-alveolar lavage fluid of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a role for CD8(+) cells». Journal of General Virology, vol. 81, no. Pt 2, p. 497-505.

Sanchez, C. M., A. Izeta, J. M. Sanchez-Morgado, S. Alonso, I. Sola, M. Balasch, J. Plana-Duran et L. Enjuanes. 1999. «Targeted recombination demonstrates that the spike gene of transmissible gastroenteritis coronavirus is a determinant of its enteric tropism and virulence». Journal of Virology, vol. 73, no. 9, p. 7607-7618.

Sasseville, A. M.-J., M. Boutin, N. Sawyer, A. M. Gélinas et S. Dea. 2002. «Sequence of 3'-terminal end (8.1 kb) of the genome of porcine haemagglutinating encephalomyelitis virus: comparison with other haemagglutinating coronaviruses». Journal of General Virology, vol. 83, p. 2411-2416.

Sawicki, S. G. et D. L. Sawicki. 1990. «Coronavirus transcription: subgenomic mouse hepatitis virus replicative intermediates function in RNA synthesis». Journal of Virology, vol. 64, no. 3, p. 1050-1056.

Schmidt, I., M. Skinner et S. Siddell. 1987. «Nucleotide sequence of the gene encoding the surface projection glycoprotein of coronavirus MHV-JHM». Journal of General Virology, vol. 68, no. 1, p. 47-56.

Schultze, B., D. Cavanagh et G. Herrler. 1992. «Neuraminidase treatment of avian infectious bronchitis coronavirus reveals a hemagglutinating activity that is dependent on sialic acid-containing receptors on erythrocytes». Virology, vol. 189, p. 792-794.

Schultze, B., H. J. Gross, R. Brossmer et G. Herrler. 1991. «The S protein of bovine coronavirus is a hemagglutinin recognizing 9-O-acetylated sialic acid as a receptor determinant». Journal of Virology, vol. 65, no. 11, p. 6232-6237.

Schultze, B. et G. Herrler. 1992. «Bovine coronavirus uses N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid as a receptor determinant to initiate the infection of cultured cells». Journal of General Virology, vol. 73, no. 4, p. 901-906.

Schultze, B., K. Wahn, H. D. Klenk et G. Herrler. 1991. «Isolated HE-protein from hemagglutinating encephalomyelitis virus and bovine coronavirus has receptor-destroying and receptor-binding activity». Virology, vol. 180, no. 1, p. 221-228.

Schwarz, B., E. Routledge et S. G. Siddell. 1990. «Murine coronavirus nonstructural protein ns2 is not essential for virus replication in transformed cells». Journal of Virology, vol. 64, no. 10, p. 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». Journal of Virology, vol. 66, no. 9, p. 5277-5283.

Sethna, P. B., S. L. Hung et D. A. Brian. 1989. «Coronavirus subgenomic minus-strand RNAs and the potential for mRNA replicons». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 86, p. 5626-5630.

Shieh, C.-K., L. H. Soe, S. Makino et coll. 1987. «the 5'-end sequence of the murine coronavirus genome: implications for multiple fusion sites in leader-primed transcription.». Virology, vol. 156, p. 321-330.

Shin, J., J. Torrison, C. S. Choi, S. M. Gonzalez, B. G. Crabo et T. W. Molitor. 1997. «Monitoring of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in boars». Veterinary Microbiology, vol. 55, no. 1-4, p. 337-346.

Shockley, L. J., P. A. Kapke, W. Lapps, D. A. Brian, L. N. Potgieter et R. Woods. 1987. «Diagnosis of porcine and bovine enteric coronavirus infections using cloned cDNA probes». Journal of Clinical Microbiology, vol. 25, no. 9, p. 1591-1596.

Siddell, S. 1983. «Coronavirus JHM: coding assignments of subgenomic mRNAs». Journal of General Virology, vol. 64, no. 1, p. 113-125.

Siddell, S., H. Wege et V. ter Meulen. 1982. «The structure and replication of coronaviruses». Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 99, p. 131-163.

Siddell, S. G. (1995). «The Coronaviridae: an introduction». S. G. Siddell, (éd.). Dans The Coronaviridae. New-York: Plenum Press, p. 1-10.

Siddell, S. G., R. Anderson, D. Cavanagh et coll. 1983. «Coronaviridae». Intervirology, vol. 20, p. 181-189.

Siddell, S. G., A. Barthel et V. ter Meulen. 1981. «Coronavirus JHM: a virion-associated protein kinase». Journal of General Virology, vol. 52, no. 2, p. 235-243.

Spaan, W., D. Cavanagh et M. C. Horzinek. 1988. «Coronaviruses: structure and genome expression». Journal of General Virology, vol. 69 (Pt 12), p. 2939-2952.

- Spaan, W., H. Delius, M. Skinner, J. Armstrong, P. Rottier, S. Smeekens, B. A. van der Zeijst et S. G. Siddell. 1983. «Coronavirus mRNA synthesis involves fusion of non-contiguous sequences». EMBO Journal, vol. 2, no. 10, p. 1839-1844.
- Spaan, W. J., P. J. Rottier, M. C. Horzinek et B. A. van der Zeijst. 1981. «Isolation and identification of virus-specific mRNAs in cells infected with mouse hepatitis virus (MHV-A59)». Virology, vol. 108, no. 2, p. 424-434.
- Spaan, W. J. M., D. Cavanagh et M. C. Horzinek. (1990). «Coronaviruses». M. H. V. Regenmortel et A. R. Neurath, (éd.). Dans Immunochemistry of viruses. Amsterdam: Elsevier, p. 359-379.
- Stern, D. F. et B. M. Sefton. 1982. «Coronavirus proteins: structure and function of the oligosaccharides of the avian infectious bronchitis virus glycoproteins». Journal of Virology, vol. 44, no. 3, p. 804-812.
- Stern, D. F. et B. M. Sefton. 1982. «Synthesis of coronavirus mRNAs: kinetics of inactivation of infectious bronchitis virus RNA synthesis by UV light». Journal of Virology, vol. 42, no. 2, p. 755-759.
- 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». Journal of Virology, vol. 62, no. 11, p. 4288-4295.
- Stohlman, S. A. et M. M. Lai. 1979. «Phosphoproteins of murine hepatitis viruses». Journal of Virology, vol. 32, no. 2, p. 672-675.
- Storz, J., X. Lin, C. W. Purdy, V. N. Chouljenko, K. G. Kousoulas, F. M. Enright, W. C. Gilmore, R. E. Briggs et R. W. Loan. 2000. «Coronavirus and Pasteurella infections in bovine shipping fever pneumonia and Evans' criteria for causation». Journal of Clinical Microbiology, vol. 38, no. 9, p. 3291-3298.
- Storz, J., R. Rott et G. Kaluza. 1981. «Enhancement of plaque formation and cell fusion of an enteropathogenic coronavirus by trypsin treatment». Infection and Immunity, vol. 31, no. 3, p. 1214-1222.
- Storz, J., L. Stine, A. Liem et G. A. Anderson. 1996. «Coronavirus isolation from nasal swap samples in cattle with signs of respiratory tract disease after shipping». Journal of the American Veterinary Medical Association, vol. 208, no. 9, p. 1452-1455.
- Storz, J., X. M. Zhang et R. Rott. 1992. «Comparison of hemagglutinating, receptor-destroying, and acetylase activities of avirulent and virulent bovine coronavirus strains». Archives of Virology, vol. 125, no. 1-4, p. 193-204.
- Sturman, L. S. et K. V. Holmes. 1983. «The molecular biology of coronaviruses». Advances in Virus Research, vol. 28, p. 35-112.

- Sturman, L. S., K. V. Holmes et J. Behnke. 1980. «Isolation of coronavirus envelope glycoprotein and interaction with the nucleocapsid.». Journal of Virology, vol. 33, p. 449-462.
- 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». Journal of Virology, vol. 56, no. 3, p. 904-911.
- Sturman, L. S., C. S. Ricard et K. V. Holmes. 1990. «Conformation change of the coronavirus peplomer glycoprotein at pH 8.0 and 37°C correlates with virus aggregation and virus induced cell fusion.». Journal of Virology, vol. 64, p. 3042-3050.
- Sugiyama, K. et Y. Amano. 1981. «Morphological and biological properties of a new coronavirus associated with diarrhea in infant mice». Archives of Virology, vol. 67, no. 3, p. 241-251.
- Suzuki, H. et F. Taguchi. 1996. «Analysis of receptor-binding site of murine coronavirus spike protein». Journal of Virology, vol. 70, p. 2632-2636.
- Talbot, P. J. et M. J. Buchmeier. 1985. «Antigenic variation among murine coronaviruses: evidence for polymorphism on the peplomer glycoprotein, E2». Virus Research, vol. 2, no. 4, p. 317-328.
- Talbot, P. J., A. A. Salmi, R. L. Knobler et M. J. Buchmeier. 1984. «Topographical mapping of epitopes on the glycoproteins of murine hepatitis virus-4 (strain JHM): correlation with biological activities». Virology, vol. 132, no. 2, p. 250-260.
- 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». European Journal of Cell Biology, vol. 33, no. 2, p. 281-293.
- Tooze, J. et S. A. Tooze. 1985. «Infection of AtT20 murine pituitary tumour cells by mouse hepatitis virus strain A59: virus budding is restricted to the Golgi region». European Journal of Cell Biology, vol. 37, p. 203-212.
- Tooze, J., S. A. Tooze et S. D. Fuller. 1987. «Sorting of progeny coronavirus from condensed secretory proteins at the exit from the trans-Golgi network of AtT20 cells.». Journal of Cell Biology, vol. 105, p. 1215-1226.
- Tooze, S. A., J. Tooze et G. Warren. 1988. «Site of addition of N-acetyl-galactosamine to the E1 glycoprotein of mouse hepatitis virus-A59 infection.». Journal of Cell Biology, vol. 106, p. 1475-1487.
- Truyen, U., J. F. Evermann, E. Vieler et C. R. Parrish. 1996. «Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range». Virology, vol. 215, no. 2, p. 186-189.

- Tsunemitsu, H. et L. J. Saif. 1995. «Antigenic and biological comparisons of bovine coronaviruses derived from neonatal calf diarrhea and winter dysentery of adult cattle». Archives of Virology, vol. 140, no. 7, p. 1303-1311.
- Tsunemitsu, H., D. R. Smith et L. J. Saif. 1999. «Experimental inoculation of adult dairy cows with bovine coronavirus and detection of coronavirus in feces by RT-PCR». Archives of Virology, vol. 144, no. 1, p. 167-175.
- Tyrrell, D. A. J., J. D. Almeida, C. H. Cunningham, W. R. Dowdle, M. S. Hofstad, K. McIntosh, M. Tajima, L. Y. Zakstelskays, B. C. Easterday, A. Kapikian et R. W. Bingham. 1975. «*Coronaviridae*». Intervirology, vol. 5, p. 76-82.
- Tyrrell, D. A. J., J. D. Almeida, C. H. Cunningham, B. C. Easterday, D. J. Garwes, J. C. Hierholzer, A. Kapikian, M. R. Macnaughton et K. McIntosh. 1978. «*Coronaviridae*: second report.». Intervirology, vol. 10, p. 321-328.
- Vabret, A., F. Mouthon, T. Mourez, S. Gouarin, J. Petitjean et F. Freymuth. 2001. «Direct diagnosis of human respiratory coronaviruses 229E and OC43 by the polymerase chain reaction». Journal of Virological Methods, vol. 97, no. 1-2, p. 59-66.
- van der Most, R. G., P. J. Bredenbeek et W. J. Spaan. 1991. «A domain at the 3' end of the polymerase gene is essential for encapsidation of coronavirus defective interfering RNAs». Journal of Virology, vol. 65, no. 6, p. 3219-3226.
- Van Reeth, K. et M. Pensaert. 1994. «Prevalence of infections with enzootic respiratory and enteric viruses in feeder pigs entering fattening herds». Veterinary Record, vol. 135, no. 25, p. 594-597.
- Vaughn, E. M., P. G. Halbur et P. S. Paul. 1995. «Sequence comparison of porcine respiratory coronavirus isolates reveals heterogeneity in the S, 3, and 3-1 genes». Journal of Virology, vol. 69, no. 5, p. 3176-3184.
- Vautherot, J. F., J. Laporte et P. Boireau. 1992. «Bovine coronavirus spike glycoprotein: localization of an immunodominant region at the amino-terminal end of S2». Journal of General Virology, vol. 73, no. 12, p. 3289-3294.
- Vautherot, J. F., J. Laporte, M. F. Madelaine, P. Bobulesco et A. Roseto. 1984. «Antigenic and polypeptide structure of bovine enteric coronavirus as defined by monoclonal antibodies». Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 173, p. 117-132.
- Vautherot, J. F., M. F. Madelaine, P. Boireau et J. Laporte. 1992. «Bovine coronavirus peplomer glycoproteins: detailed antigenic analyses of S1, S2 and HE». Journal of General Virology, vol. 73 (Pt 7), p. 1725-1737.
- Vautherot, J. F., M. F. Madelaine et J. Laporte. 1990. «Topological and functional analysis of epitopes on the S(E2) and HE(E3) glycoproteins of bovine enteric coronavirus». Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 276, p. 173-179.

- Vennema, H., G. J. Godeke, J. W. Rossen, W. F. Voorhout, M. C. Horzinek, D. J. Opstelten et P. J. Rottier. 1996. «Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes». EMBO Journal, vol. 15, no. 8, p. 2020-2028.
- Verbeek, A., S. Dea et P. Tijssen. 1991. «Genomic relationship between turkey and bovine enteric coronaviruses identified by hybridization with BCV or TCV specific cDNA probes». Archives of Virology, vol. 121, no. 1-4, p. 199-211.
- Verbeek, A. et P. Tijssen. 1991. «Sequence analysis of the turkey enteric coronavirus nucleocapsid and membrane protein genes: a close genomic relationship with bovine coronavirus». Journal of General Virology, vol. 72, no. Pt 7, p. 1659-1666.
- Verbeek, A. J., S. Dea et P. Tijssen. 1990. «Bovine enteric coronavirus detection by molecular probes». Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 276, p. 467-472.
- Vezina, S. A., H. Loemba, M. Fournier, S. Dea et D. Archambault. 1996. «Antibody production and blastogenic response in pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus». Canadian Journal of Veterinary Research, vol. 60, no. 2, p. 94-99.
- Vezina, S. A., D. Roberge, M. Fournier, S. Dea, D. Oth et D. Archambault. 1995. «Cloning of porcine cytokine-specific cDNAs and detection of porcine tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 (IL-6), and IL-1 beta gene expression by reverse transcription PCR and chemiluminescence hybridization». Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, vol. 2, no. 6, p. 665-671.
- Vieler, E. et W. Herbst. 1995. «[Electron microscopic demonstration of viruses in feces of dogs with diarrhea]». Tierärztliche Praxis, vol. 23, no. 1, p. 66-69.
- Vieler, E., W. Herbst, W. Baumgartner et S. Breuker. 1994. «Isolation of a parainfluenzavirus type 2 from the prostatic fluid of a dog». Veterinary Record, vol. 135, no. 16, p. 384-385.
- Vieler, E., T. Schlapp, C. Anders et W. Herbst. 1995. «Genomic relationship of porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus to bovine coronavirus and human coronavirus OC43 as studied by the use of bovine coronavirus S gene-specific probes». Archives of Virology, vol. 140, no. 7, p. 1215-1223.
- Vieler, E., T. Schlapp et W. Herbst. 1996. «The region between the M and S genes of porcine haemagglutinating encephalomyelitis virus is highly similar to human coronavirus OC43». Journal of General Virology, vol. 77 (Pt 7), p. 1443-1447.
- Vlasak, R., W. Luytjes, J. Leider, W. Spaan et P. Palese. 1988. «The E3 protein of bovine coronavirus is a receptor-destroying enzyme with acetylase activity». Journal of Virology, vol. 62, no. 12, p. 4686-4690.

- Vlasak, R., W. Luytjes, W. Spaan et P. Palese. 1988. «Human and bovine coronaviruses recognize sialic acid-containing receptors similar to those of influenza C viruses». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 85, no. 12, p. 4526-4529.
- von Heijne, G. 1986. «A new method for predicting signal sequence cleavage sites». Nucleic Acids Research, vol. 14, no. 11, p. 4683-4690.
- Wang, F. I., J. O. Fleming et M. M. Lai. 1992. «Sequence analysis of the spike protein gene of murine coronavirus variants: study of genetic sites affecting neuropathogenicity». Virology, vol. 186, no. 2, p. 742-749.
- Wang, X. et M. I. Khan. 1999. «A multiplex PCR for Massachusetts and Arkansas serotypes of infectious bronchitis virus». Molecular and Cellular Probes, vol. 13, no. 1, p. 1-7.
- Wege, H. et R. Dorries. 1984. «Hybridoma antibodies to the murine coronavirus JHM: characterization of epitopes on the peplomer protein (E2)». Journal of General Virology, vol. 65, no. 11, p. 1931-1942.
- Wesley, R. D., R. D. Woods et A. K. Cheung. 1991. «Genetic analysis of porcine respiratory coronavirus, an attenuated variant of transmissible gastroenteritis virus». Journal of Virology, vol. 65, no. 6, p. 3369-3373.
- Wesley, R. D., R. D. Woods, J. D. McKean, M. K. Senn et Y. Elazhary. 1997. «Prevalence of coronavirus antibodies in Iowa swine». Canadian Journal of Veterinary Research, vol. 61, no. 4, p. 305-308.
- Wieler, L. H., A. Ilieff, W. Herbst, C. Bauer, E. Vieler, R. Bauerfeind, K. Failing, H. Klos, D. Wengert, G. Baljer et H. Zahner. 2001. «Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in southern Germany». J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, vol. 48, no. 2, p. 151-159.
- 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». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 88, no. 13, p. 5533-5536.
- Williams, R. K., G. S. Jiang, S. W. Snyder, M. F. Frana et K. V. Holmes. 1990. «Purification of the 110-kilodalton glycoprotein receptor for mouse hepatitis virus (MHV)-A59 from mouse liver and identification of a nonfunctional, homologous protein in MHV-resistant SJL/J mice». Journal of Virology, vol. 64, no. 8, p. 3817-3823.
- Woo, K., M. Joo, K. Narayanan et coll. 1997. «Murine coronavirus packaging signal confers packaging to nonviral RNA.». Journal of Virology, vol. 71, p. 824-827.

- Woods, R. D. et N. C. Pedersen. 1979. «Cross-protection studies between feline infectious peritonitis and porcine transmissible gastroenteritis viruses». Veterinary Microbiology, vol. 4, p. 11-16.
- Yagami, K., K. Hirai et N. Hirano. 1986. «Pathogenesis of haemagglutinating encephalomyelitis virus (HEV) in mice experimentally infected by different routes». Journal of Comparative Pathology, vol. 96, no. 6, p. 645-657.
- Yassen, S. A. et C. M. Johnson-Lussenburg. 1978. «Comparative antigenic studies on coronaviruses». Int Virol, vol. 4, p. 451.
- 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, vol. 357, no. 6377, p. 420-422.
- Yokomori, K., S. C. Baker, S. A. Stohlman et M. M. C. Lai. 1992. «Hemagglutinin-esterase-specific monoclonal antibodies alter the neuropathogenicity of mouse hepatitis virus». Journal of Virology, vol. 66, p. 2865-2874.
- Yokomori, K., L. R. Banner et M. M. Lai. 1991. «Heterogeneity of gene expression of the hemagglutinin-esterase (HE) protein of murine coronaviruses». Virology, vol. 183, no. 2, p. 647-657.
- Yokomori, K., L. R. Banner et M. M. Lai. 1992. «Coronavirus mRNA transcription: UV light transcriptional mapping studies suggest an early requirement for a genomic-length template». Journal of Virology, vol. 66, no. 8, p. 4671-4678.
- Yokomori, K., L. R. Banner et M. M. C. Lai. 1991. «Heterogeneity of gene expression of hemagglutinin-esterase (HE) protein of murine coronaviruses». Virology, vol. 183, p. 647-657.
- Yokomori, K. et M. M. C. Lai. 1992. «Mouse hepatitis virus utilizes two carcinoembryonic antigens as alternative receptors». Journal of Virology, vol. 66, p. 6194-6199.
- Yoo, D. W., M. D. Parker, J. Song, G. J. Cox, D. Deregt et L. A. Babiuk. 1991. «Structural analysis of the conformational domains involved in neutralization of bovine coronavirus using deletion mutants of the spike glycoprotein S1 subunit expressed by recombinant baculoviruses». Virology, vol. 183, no. 1, p. 91-98.
- Yu, X., W. Bi, S. R. Weiss et J. L. Leibowitz. 1994. «Mouse hepatitis virus gene 5b protein is a new virion envelope protein». Virology, vol. 202, no. 2, p. 1018-1023.
- Zhang, X. et M. M. C. Lai. 1996. «A 5'-proximal RNA sequence of murine coronavirus as a potential initiation site for genomic-length mRNA transcription». Journal of Virology, vol. 70, p. 705-711.

Zhang, X. M., K. G. Kousoulas et J. Storz. 1991. «Comparison of the nucleotide and deduced amino acid sequences of the S genes specified by virulent and avirulent strains of bovine coronaviruses». Virology, vol. 183, no. 1, p. 397-404.

Zhang, X. M., K. G. Kousoulas et J. Storz. 1991. «The hemagglutinin/esterase glycoprotein of bovine coronaviruses: sequence and functional comparisons between virulent and avirulent strains». Virology, vol. 185, no. 2, p. 847-852.

Zhang, X. M., 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, vol. 186, no. 1, p. 318-323.

Zhao, X., K. Shaw et D. Cavanagh. 1993. «Presence of subgenomic mRNAs in the virions of coronavirus IBV.». Virology, vol. 196, p. 172-178.

Ziebuhr, J., J. Herold et S. G. Siddell. 1995. «Characterization of a human coronavirus (strain 229E) 3C-like proteinase activity.». Journal of Virology, vol. 69, p. 4331-4338.

Ziebuhr, J. et S. G. Siddell. 1999. «Processing of human coronavirus 229E replicase polyproteins by the virus-encoded 3C-like proteinase: Identification of proteolytic products and cleavage sites common to pp 1a and pp 1ab.». Journal of Virology, vol. 73, p. 177-185.

Appendice A
Quatrième Article

Bovine coronaviruses associated with enteric and respiratory diseases in Canadian dairy cattle display different reactivities to anti-HE monoclonal antibodies and distinct amino acid changes in their HE, S and ns4.9 protein

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Gélinas AM, Boutin M, Sasseville AM, Dea S.
Bovine coronaviruses associated with enteric and respiratory diseases in Canadian dairy cattle display different reactivities to anti-HE monoclonal antibodies and distinct amino acid changes in their HE, S and ns4.9 protein.

Virus research 2001 Jul;76(1):43-57.
PubMed PMID: 11376845.

Appendice B

Liste des présentations et séances d'affiche

Publications

- A.-M. Gélinas, M. Boutin, A. M.-J. Sasseville and S. Dea (2001) Bovine coronaviruses associated with enteric and respiratory diseases in Canadian dairy cattle display different reactivities to anti-HE monoclonal antibodies and distinct amino acid changes in their HE, S and ns4.9 protein. *Virus Research* 76: 43-57
- M.-J. Sasseville, A.-M. Gélinas, N. Sawyer, M. Boutin and S. Dea (2001) Biological and molecular characteristics of an HEV isolate cultivated from a recent outbreak of encephalomyelitis in a Quebec pig farm. *Adv Exp Med Biol.* 494:57-62
- A. M.-J. Sasseville, M. Boutin, N. Sawyer, A. M. Gélinas et S. Dea. (2002) Sequence of the 3'-terminal end (8.1 kb) of the genome of porcine haemagglutinating encephalomyelitis virus: comparison with other haemagglutinating coronaviruses. *J Gen Virol.* 2002 83:2411-6.

Communications

- D. Therrien, M. Boutin, Y. St-Pierre and S. Dea. Heparin interferes with attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) on permissive cells. 18th Annual meeting of the American Society for Virology (ASV) University of Massachusetts, Amherst, MA. July 10-14 1999.
- A. M.-J. Sasseville, N. Sawyer, M. Boutin et S. Dea. Épisodes d'encéphalite chez des porcelets nouveaux-nés associés à une infection par le virus HEV. 1^{er} congrès interne de l'INRS-Institut-Armand-Frappier à Magog, 5 au 7 novembre 1999.
- M. Boutin, A. M.-J. Sasseville, S. Dea. Multiplex PCR pour la détection et la différenciation des coronavirus hémagglutinants humains, bovins et porcins. Journées de recherche et colloque en productions animales. Hôtel des Gouverneurs de Sainte-Foy. 31 mai et 1^{er} juin 2000.
- M.-J. Sasseville, N. Sawyer, M. Boutin and S. Dea. Biological and molecular characteristics of an HEV isolate cultivated from a recent outbreak of encephalomyelitis in a Quebec pig farm. The 8th international symposium on nidoviruses (coronaviruses and arteriviruses). University of Pennsylvania, Philadelphia PA. May 20-25 2000
- S. Dea, M.-J. Sasseville, M. Boutin, A.-M. Gélinas and S. Chabot. Nucleotide and predicted amino acid sequences of all genes encoded by the 3' genomic portion (9.5kb) of porcine HEV coronavirus. 6th International Symposium on Positive Strand RNA Viruses. May 28 to June 2, 2001
- M. Boutin, A. M.-J. Sasseville, S. Dea. Detection and identification of hemagglutinating coronaviruses using group-specific or species-specific single and multiplex RT-PCR. X international Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on biotechnology. Salsomaggio-Parma, Italy, July 4-7 2001
- M. Boutin, A. M.-J. Sasseville, A. Kheyar, S. Dea. Nucleotide sequence variations of the structural genes of porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus (HEV) and comparison with other hemagglutinating coronaviruses. 2002 CRWAD Meeting, Millennium Hotel, St. Louis, Missouri, USA. November 10 – 12.

Appendice C

Confirmation de la spécificité des amorces du multiplex RT-PCR.

Amplicon obtenu par multiplex RT-PCR pour le virus HEV IAF-404 avec les amorces 5'S1.HEV.S et 3'S1.HEV.AS comparé à la séquence connue de IAF 404.

(genbank AF481863 - région de l'ORF de la S = 1305 à 5354)

Quality: 6370 Length: 8123
 Ratio: 9.953 Gaps: 0
 Percent Similarity: 99.531 Percent Identity: 99.531

```

2351 acgtaaaaatttttctaatgttaattttaacatgggcaggctgatgtctt 2400
      |
1 .....TTTTTCTAATTGTAATTTAACATGGGCAGGCTGATGTCTT 42
2401 ttattcaggctgactccttttggttgaacaatattgatgcttctcgctta 2450
      |
43 TTATTCAGGCTGACTCTTTTGGTTGTAACAATATTGATGCTTCTCGCTTA 92
2451 tatggtatgtgttttggttagcattactattgacaagtttgctatacccaa 2500
      |
93 TATGGTATGTGTTTTGGTAGCATTACTATTGACAAGTTTGCATACCCAA 142
2501 tagtagaaaaggttgatctgcaagtggttaaactctggttattacaactctt 2550
      |
143 TAGTAGAAAAGGTTGATCTGCAAGTGGGTAAATCTGGTTATTACAACTCT 192
2551 ttaattataagattgacactgctgttagcagttgtcaactctattatagt 2600
      |
193 TTAATTATAAGATTGACACTGCTGTAGCAGTTGTCAACTCTATTATAGT 242
2601 ttgctgcagcaaacgtatctgtcactcattataatccttcatcttgcaa 2650
      |
243 TTGCCTGCAGCAAACGTATTTGTCACTCATTATAATCCTTCATCTTGAA 292
2651 cagaaggatgggtttattaatcagagtttgggtccagaggccttcatg 2700
      |
293 CAGAAGGTATGGGTTTATTAATCAGAGTTTGGTCCAGAGGCCCTTCATG 342
2701 atgctgtatattcacagcaatgttttaatacacctaatacatattgtcct 2750
      |
343 ATGCTGTATATTCACAGCAATGTTTAAATACACCTAATACATATTGTCTT 392
2751 ttagaacaagtcaatgcataggtggtgctggcacaggaacttgcctgt 2800
      |
393 TGTAGAACAAGTCAATGCATAGGTGGTGTGGCACAGGAAC TTGCCTGT 442
2801 aggcaccactgtgcgcaagtgttttgcagttacaaacgctactaagt 2850
      |
443 AGGCACCCTGTGCGCAAGTGT TTTGCTGCAGTTACAAACGCTACTAAGT 492
2851 gtacttgcctggtgtcaaccagatccttccacatataaagggtgaaatgcc 2900
      |
493 GTACTTGTGCTGGTGTCAACCAGATCCTTCCACATATAAAGGTGTAATGCC 542
2901 tggacttgcgcaatctaaagtttctatacaaccaggtcagcattgccc 2950
      |
543 TGGACTTGTCCGCAATCTAAAGTTTCTATACAACCAGGTCAGCATTGCCC 592
2951 tggcttgggtccttggaggatgattgctctggtaatccttgcacttgta 3000
      |
593 TGGCTTGGGTCTTGTGGAGGATGATTGCTCTGGTAATCCTTGCCTGT.. 640

```

