

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

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

PAR

LAYLA MICHAUD

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DES DÉTERMINANTS VIRAUX
INFLUENÇANT LA PATHOGÉNÉCITÉ DES CORONAVIRUS BOVINS

MAI 1995

À MES CHERS PARENTS,
À MON AMI RICHARD,
À MA FILLE VANESSA.

TABLES DES MATIÈRES

TABLES DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES.....	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xv
LISTE DES PUBLICATIONS.....	xvii
LISTE DES COMMUNICATIONS.....	xviii
SOMMAIRE.....	xx
INTRODUCTION.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
1. CORONAVIRUS ANIMAUX ET HUMAINS.....	5
1.1 HISTORIQUE.....	5
1.2 TAXONOMIE.....	6
1.3 CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES.....	10
1.3.1 Morphologie.....	10
1.3.2 Culture in vitro.....	10
1.3.3 Propriétés physico-chimiques.....	15
1.4 MEMBRANE LIPIDIQUE.....	16
1.5 LE GÉNOME.....	16
1.6 PROTÉINES VIRALES ET PRÉCURSEURS.....	17
1.6.1 Protéine N de la nucléocapside....	17
1.6.2 Protéine M de la matrice.....	19
1.6.3 Protéine S des péplomères.....	21

1.6.4	Protéine HE de l'hémagglutinine- estérase.....	24
1.6.5	Autres protéines.....	26
1.7	STRUCTURE ANTIGÉNIQUE.....	27
1.8	CYCLE DE MULTIPLICATION VIRAL.....	29
1.8.1	Généralités.....	29
1.8.2	Attachement et pénétration.....	30
1.8.3	Réplication et Transcription de l'ARN viral.....	31
1.8.4	Assemblage des virions et matura- tion.....	32
2.	CORONAVIRUS BOVINS.....	33
2.1	INTRODUCTION.....	33
2.2	PATHOLOGIE.....	33
2.2.1	diarrhée néonatale du veau.....	33
2.2.2	dysenterie d'hiver.....	34
2.3	VARIABILITÉ ANTIGÉNIQUE ET GÉNOMIQUE PARMI LES ISOLATS DE CORONAVIRUS BOVINS.	35
2.4	DIAGNOSTIC.....	36
	MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	38
1.	ORIGINE ET IDENTIFICATION DES VIRUS.....	39
2.	CULTURES CELLULAIRES.....	40
2.1	Origine des cellules.....	40
2.2	Culture des cellules.....	40
3.	PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS CLINIQUES..	41
4.	PROPAGATION DES VIRUS.....	42
4.1	Infection des feuillets cellulaires	42

5. CONCENTRATION ET PURIFICATION DES VIRUS.	43
5.1 Suspensions virales clarifiées....	43
5.2 Suspensions virales concentrées...	43
5.3 Suspensions virales purifiées.....	44
5.4 Suspensions virales purifiées.....	44
6. DÉTERMINATION DU TITRE INFECTIEUX.....	45
7. MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE.....	45
7.1 Imprégnation négative.....	45
8. ANTISÉRUMS.....	46
8.1 Sérums de référence anti-BCV.....	46
8.2 Autres antisérums.....	49
9. IMMUNOMARQUAGE À LA PROTÉINE A-OR COLLOIDAL.....	49
10. TEST D'HÉMAGGLUTINATION ET D'INHIBITION DE L'HÉMAGGLUTINATION.....	50
10.1 Test d'hémagglutination.....	50
10.2 Test d'inhibition de l'hémagglu- tation.....	51
11. MESURE DES ACTIVITÉS ACÉTYL ESTÉrase ET DESTRUCTRICE DE RÉCEPTEURS.....	51
11.1 Activité acétyl-estérase.....	51
11.2 Activité enzyme destructrice de récepteurs.....	52
12. ANALYSE DES PROTÉINES STRUCTURALES SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRÉSENCE DE SDS (SDS- PAGE.....	53
12.1 Migration sur gels de polyacryla- mide.....	53
12.2 Révélation des protéines virales...	54

13. IMMUNOBUVARDAGE.....	54
13.1 Préparation des suspensions d'anti- gènes viraux.....	54
13.2 Réaction immunologique.....	55
14. PRÉPARATION D'ANTICORPS MONOCLONAUX.....	56
14.1 Origine des AcMo.....	56
14.2 Production et purification.....	57
14.3 Couplage à la biotine de l'anticorps.....	57
15. IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE.....	58
15.1 Préparation des échantillons.....	58
15.2 Réaction immunologique.....	58
16. SÉRONEUTRALISATION.....	59
17. IMMUNOPEROXYDASE.....	60
18. ELISA.....	61
18.1 Préparation du matériel.....	60
18.2 ELISA indirecte.....	61
18.3 ELISA compétitive.....	63
19. AMPLIFICATION DU GÈNE HE	63
19.1 Préparation du matériel.....	63
19.2 Isolement de l'ARN génomique.....	64
19.3 Choix des amorces pour l' amplifi- cation du gène HE.....	65
19.4 Réaction de transcription inverse..	66
19.5 Réaction en chaine de la polymérase	68
20. STRATÉGIE DE CLONAGE.....	70
20.1 Technique de clonage.....	70
20.2 Sélection des clones.....	71
20.3 Préparation des clones pour le séquençage.....	71

21. SÉQUENÇAGE.....	73
22. HYBRIDATION MOLÉCULAIRE.....	73
22.1 Préparation des sondes moléculaires	73
22.2 Marquage des sondes moléculaires..	75
22.2.1 Marquage radioactif.....	75
22.2.2 Marquage non-radioactif.....	76
22.3 Préparation des échantillons.....	76
22.4 Adsorption des échantillons viraux sur membrane de nylon par micro- filtration (Slot Blot).....	77
22.5 Réaction hybridation.....	77
22.6 Détection des signaux d'hybridation	78
22.6.1 Détection radioactive.....	78
22.6.2 Détection immunologique.....	78
RÉSULTATS.....	79
1. IDENTIFICATION DES ISOLATS DE CORONAVIRUS BOVIN.....	80
2. ÉTUDE DE LA CROISSANCE VIRALE.....	80
2.1 CYTOPATHOGENICITÉ SUR CELLULES HRT-18..	83
3. ÉTUDE DES ACTIVITÉS BIOLOGIQUES ET ENZYMATI- QUE ASSOCIÉES À LA GLYCOPROTÉINE HE.....	90
3.1 ACTIVITÉ HÉMAGGLUTINANTE À DIFFÉRENTES TEMPÉRATURE D'INCUBATION.....	90
3.2 ACTIVITÉ ACÉTYL-ESTÉrase	92
3.3 ACTIVITÉ ENZYME DESTRUCTRICE DE RÉCEPTEURS.....	94
4. ÉTUDE COMPARATIVE DES PROTÉINES STRUCTURALES	95

5. PROPRIÉTÉS DES ANTICORPS MONOCLONAUX (AcMo).	95
5.1 PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DES ANTICORPS MONOCLONAUX.....	95
5.2 COURBES D'AVIDITÉ.....	98
6. TOPOGRAPHIE DES DÉTERMINANTS ANTIGÉNIQUES LOCALISÉS SUR LA GLYCOPROTÉINE DES PÉPLOMÈRES	101
7. ÉTUDE DES RELATIONS ANTIGÉNIQUES CROISÉES...	108
7.1 ÉPREUVE DE SÉRONEUTRALISATION.....	108
7.2 ÉPREUVE D'INHIBITION DE L'HÉMAPGLUTINA- TION (IHA).....	110
7.3 ÉPREUVE D'IMMUNOBUVARDAGE.....	111
7.4 IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE.....	116
8. COMPARAISON AU NIVEAU MOLÉCULAIRE DES ISOLATS DE CORONAVIRUS BOVIN.....	119
8.1 CHOIX DES ISOLATS.....	120
8.2 AMPLIFICATION PAR LA TECHNIQUE DE LA POLYMERASE EN CHAÎNE DU GÈNE HE CODANT POUR LA GLYCOPROTÉINE DE L'HÉMAPGLU- TININE.....	120
8.3 ANALYSE DES SÉQUENCES NUCLÉOTIDIQUES DU GÈNE HE DE TROIS ISOLATS QUÉBÉCOIS DE CORONAVIRUS BOVIN COMPARATIVEMENT À LA SOUCHE MEBUS DU BCV.....	123
8.4 ANALYSE DES SÉQUENCES D'ACIDES AMINÉS DE LA GLYCOPROTÉINE HE DE TROIS ISOLATS QUÉ- BÉCOIS DE CORONAVIRUS BOVIN COMPARATIVE- MENT À LA SOUCHE MEBUS DU BCV.....	124
9. ÉTUDE DES RÉACTIONS D'HYBRIDATION.....	125

DISCUSSION.....	134
CONCLUSION.....	148
REMERCIEMENTS.....	153
BIBLIOGRAPHIE.....	156

LISTE DES TABLEAUX

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau I:	Groupes antigéniques, hôtes naturels et pathologies des coronavirus.	8
------------	--	---

RÉSULTATS

Tableau II:	Caractéristiques biologiques et sérologiques d'isolats québécois de coronavirus bovins comparativement à d'autres coronavirus hémagglutinants.	81
Tableau III:	Caractéristiques des effets cytopathiques provoqués par des isolats de coronavirus bovins comparativement à d'autres coronavirus hémagglutinants.	84
Tableau IV:	Différentiation des isolats de coronavirus bovins selon leur activité hémagglutinante ainsi que leurs activités enzymatiques acétyl estérase (AE) et enzyme destructrice de récepteurs (RDE).	93
Tableau V:	Propriétés des anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines structurales de la souche Mebus du coronavirus bovin.	97
Tableau VI:	Résultats des tests d'ELISA compétitive entre différents anticorps monoclonaux dirigés contre la glycoprotéine des péplomères de la souche Mebus du coronavirus bovin.	103

Tableau VII: Réactivité croisée des anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre la souche Mebus du coronavirus bovin envers différents isolats de BCV ainsi que des souches hétérologues de coronavirus hémagglutinants telle que démontré par séroneutralisation.

LISTE DES FIGURES

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure 1:	Sommaire des relations antigéniques croisées observées entre les coronavirus de différentes espèces animales.	9
Figure 1:	Représentation schématique du coronavirus bovin.	11
Figure 3:	Micrographie électronique à imprégnation négative des particules virales de coronavirus.	12

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Figure 4a):	Profil de purification de la souche Mebus du coronavirus bovin.	47
Figure 4b):	Immuno-électromicroscopie de particules de coronavirus, purifiées sur gradient de densité de saccharose.	47
Figure 5:	Représentation schématique du génome du coronavirus bovin et localisation des amorces oligonucléotidiques utilisées pour l'amplification du gène HE codant pour la glycoprotéine de l'hémagglutinine.	67
Figure 6:	Schéma de la réaction de la polymérase en chaîne utilisée pour l'amplification du gène HE des coronavirus hémagglutinants.	69
Figure 7:	Stratégie de clonage utilisée en vue du séquençage du gène HE.	72
Figure 8:	Localisation des amorces utilisées lors du séquençage des différents coronavirus.	74

RÉSULTATS

Figure 9:	Effet cytopathogène induit par des isolats de coronavirus hémagglutinants sur les cellules HRT-18, à 37°C, en présence de trypsine.	85
Figure 10:	Avidité comparative des anticorps monoclonaux dirigés contre la glycoprotéine S des péplomères du coronavirus bovin.	99
Figure 11:	Test de compétition entre les différents anticorps monoclonaux dirigés contre la glycoprotéine S des péplomères.	105
Figure 12:	Topographie des domaines antigéniques majeurs de la glycoprotéine S du BCV déduite selon les résultats des épreuves de compétition.	107
Figure 13:	Analyse par immunobuvardage des protéines structurales des coronavirus hémagglutinants.	112
Figure 14:	Analyse par immunobuvardage des réactions antigéniques croisées entre les protéines structurales des coronavirus hémagglutinants.	114
Figure 15:	Réactivité croisée entre les anticorps monoclonaux dirigés contre la glycoprotéine S du BCV et les différents isolats de coronavirus hémagglutinants tel qu'établie par ELISA.	117
Figure 16:	Amplification par la technique de la polymérase en chaîne (PCR) du gène HE des coronavirus hémagglutinants.	122
Figure 17:	Comparaison des séquences nucléotidiques du gène HE de différents isolats de coronavirus bovin.	127

- Figure 18: Comparaison des séquences d'acides aminés de la glycoprotéine HE de différents isolats de coronavirus bovin. 131
- Figure 19: Détection par hybridation moléculaire de coronavirus hémagglutinants avec une sonde HE radioactive. 133

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AcMo:	Anticorps monoclonaux
ADN:	Acide désoxyribonucléique
ADN _C :	ADN complémentaire
AE:	Acétyl-estérase
ARN:	Acide ribonucléique
BCV:	Coronavirus bovin
BCQ:	Isolat québécois de coronavirus bovin
BIV:	Virus de l'immunodéficience bovine
CCV:	Coronavirus canin
DAB:	3,3'-diamino-benzidine tetrahydrochlorure
dATP:	2'-désoxyadénosine 5'-triphosphate
dCTP:	2'-désoxycytidine 5'-triphosphate
DEPC:	Diéthylpyrocarbonate
dGTP:	2'-désoxyguanosine 5'-triphosphate
Dig:	Digoxygénine-11-dUTP
DMSO:	Diméthyl sulfoxyde
dTTP:	2'-désoxythymidine 5'-triphosphate
EDTA:	Acide éthylènediamine tétraacétique disodique
EMC:	virus de l'encéphalomyélocardite porcine
ELISA:	Enzyme-linked immunosorbant assay (épreuve immuno-enzymatique)
FECV:	Coronavirus entérique félin
FIPV:	Coronavirus de la péritonite infectieuse
FITC:	Isothiocyanate de fluorescéine
IHA:	Réaction d'inhibition de l'hémagglutination
IIF:	Immunofluorescence indirecte
HCV-OC43:	Coronavirus respiratoire humain, souche OC43
HCV 229-E:	Coronavirus humain, souche 229-E
HE:	Hémagglutinine-estérase (gène ou protéine)
HEV:	Coronavirus hémagglutinant de l'encéphalomyélite porcine
IBV:	Coronavirus de la bronchite infectieuse aviaire
M:	Matrice (gène ou protéine)
MHV:	Coronavirus de l'hépatite murine
N:	Nucléocapside (gène ou protéine)
NS:	Gène non-structural
ORF:	Open Reading Frame (cadre de lecture ouvert)
P ₃₂ :	Isotope phosphore-32
pi:	Post-infection
pb:	Paires de bases
PBS:	Phosphate buffered saline (Solution saline phosphatée)
PCR:	Réaction de la polymérase en chaîne
PM:	Poids moléculaire
RbCV:	Coronavirus du lapin
RDE:	Receptor destroying enzyme (Activité destructrice de récepteurs)
RPMI:	Milieu de culture

RT:	Transcriptase inverse
S:	Péplomères ou spicule (gène ou protéine)
SDS:	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE:	Électrophorèse en gel d'acrylamide en présence de SDS
SFB:	Sérum foetal bovin
SN:	Séroneutralisation
TBS:	Tampon tris-NaCl
TBS-T:	Tampon tris-NaCl additionné de tween 20
TCV:	Coronavirus de l'entérite des dindes
TGEV:	Coronavirus de la gastroentérite transmissible porcine
U:	Unité

LISTE DES PUBLICATIONS

Dea, S., L. Michaud, G. Milane. (1995). Comparison of bovine coronaviruses isolates associated with neonatal calf diarrhoea and winter dysentery in adult dairy cattle in Québec. *J. Gen. Virol.* 76:1263-1270.

Milane, G., L. Michaud et S. Dea. (1995). Biological and molecular differentiation between coronaviruses associated with neonatal calf diarrhea and winter dysentery in adult cattle. In: P. Talbot and G. Levy (eds). *Corona and related viruses*. New York: Plenum Publishing Corporation. Sous-Presses.

Dea S., L. Michaud, R. Rekik. (1995). Antigenic and genomic variations among cytopathic and non-cytopathic strains of bovine coronaviruses. In: P. Talbot and G. Levy (eds). *Corona and related viruses*. New York: Plenum Publishing Corporation. Sous-Presses.

Michaud, L., S. Dea. (1993). Characterization of monoclonal antibodies to bovine enteric coronavirus and antigenic variability among Quebec isolates. *Arch. Virol.* 131:455-465.

Tijssen, P., A.J. Verbeek, L. Michaud and S. Dea. (1991). Sequences of the genes for the structural proteins of TCV. *Proc. II. International Symposium on infectious Bronchitis*, Rauschholzhausen, Germany, June 3-6, 1991, pp. 289-295.

LISTE DES COMMUNICATIONS

Dea S., L. Michaud, G. Milane. (1994). Distinct bovine coronavirus isolates associated with winter dysentery in Québec dairy herds. 75rd Conference of Res. Workers animal dis. (CRWAD) Chicago Nov 14-15 (Abstract no. 76).

Michaud L., M.R. Rekik, S. Dea. (1992). Detection of hemagglutinating coronaviruses by hybridization with non radioactive cDNA probes specific for the HE gene. 73rd Conference of Res. Workers animal dis. (CRWAD) Chicago Nov. 9-10. Proceeding p.67:P62.

M.R. Rekik, L. Michaud, S. Dea. (1992). Comparison of turkey and bovine coronaviruses using restriction endonuclease analysis and nucleotide sequences of the S genes. 73rd Conference of Res. Workers animal dis. (CRWAD) Chicago Nov. 9-10. Proceeding p.67:P61.

Michaud L., M.R. Rekik, S. Dea. (1992). Clonage du gène HE des coronavirus hémagglutinants et développement d' une sonde moléculaire universelle. Journées de recherche en zootechnie, CPAQ, St-Hyacinthe, Québec, 9-10 juin. CPAQ p.112.

Michaud L., M.R. Rekik, S. Dea. (1992). Identification de variants antigéniques et génomiques du BCV associés à la diarrhée néonatale du veau au Québec. 7^{ième} Conférence annuelle en Santé animale, MAPAQ, Sherbrooke, Québec, 6-7 juin. (Proceed. p.73-74).

Michaud L. et S. Dea. (1992). Comparaison antigénique et moléculaire des coronavirus hémagglutinants. 60^{ième} Congrès de l' ACFAS, Université de Montréal, Montréal, Qué., 11-15 mai. Annales de l' ACFAS. Vol. 60:46.

Michaud L. and S. Dea. (1991). Amplification by PCR and restriction endonuclease analysis of HE gene of mammalian and avian hemagglutinating coronaviruses. 72rd Conference of Res. Workers animal dis. (CRWAD) Chicago Nov. 11-12. Proceeding p.79:P88.

Michaud L. et S. Dea. (1991). Relations antigéniques et génomiques existant entre les isolats cytopathogènes (CP) et non-cytopathogènes (NCP) du coronavirus bovin. 41st Annual Canadian Society of Microbiologists Meeting, University of Western Ontario, London, Ontario. Abstract VM3. June 2-6.

Michaud L. et S. Dea. (1991). Anticorps monoclonaux contre le coronavirus bovin et évidence de variants antigéniques au Québec. 59^{ième} Congrès de l' ACFAS, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Qué., 21-24 mai. Annales de l' ACFAS. Vol. 59:37.

Michaud L. and S. Dea. (1990). Characterization of monoclonal antibodies to bovine enteric coronavirus and antigenic variation among Quebec BCV isolates. 71rd Conference of Res. Workers animal dis. (CRWAD) Chicago Nov. 5-6. Proceeding P27.

SOMMAIRE

Depuis 1987, plusieurs isolats de coronavirus bovins ont été récupérés des contenus intestinaux de veaux diarrhéiques et de bovins adultes atteints de la dysenterie d'hiver provenant de fermes de 6 régions différentes du Québec. La présence du virus a été confirmée en microscopie électronique et par enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA). Les isolats ont été adaptés et propagés pour 3 à 5 passages sur cellules HRT-18 en présence de trypsine. Les souches de référence, ainsi que les différents isolats québécois, ont été purifiés par ultracentrifugation différentielle et isopycnique sur gradient de densité de saccharose. Les virus furent récupérés au niveau des fractions correspondant à des densités de flottation de 1.16 à 1.18 g/ml de saccharose. La présence de particules coronaviriformes a été confirmée en microscopie électronique après incubation en présence d'un antisérum dirigé contre la souche Mebus du coronavirus bovin et marquage à la protéine-A couplée à l'or colloïdal.

La propagation des virus sur les cellules HRT-18 a permis l'identification de trois groupes distincts selon le type d'effet cytopathogène (ECP) induit par ces derniers. Tous les isolats récupérés de cas de dysenterie d'hiver se

sont avérés hautement fusogéniques. Pour mieux visualiser les différents types d'ECP en microscopie photonique, nous avons utilisé la technique d'immunoperoxidase indirecte. Lors d'épreuves d'héماغglutination (HA), tous les isolats de coronavirus bovin ainsi que le coronavirus TCV de la dinde, le coronavirus HEV porcin et le coronavirus respiratoire humain HCV-OC43 se sont avérés héماغglutinants lorsque testés contre des érythrocytes de rat. Les isolats associés à la dysentérie d'hiver étaient dépourvus de cette activité lorsque testés à 37°C, mais étaient comparables aux autres coronavirus bovins lorsque testés à 4°C. Les évaluations quantitatives de l'activité destructrice de récepteurs (RDE) ont permis de classer les isolats de coronavirus bovin en deux sous-groupes différents, cette activité étant plus élevée pour les isolats associés à la dysentérie d'hiver. En ce qui a trait à l'activité acétyl-estérase, aucune variation significative n'a pu être observée. Les analyses d'électrophorèse sur gels de polyacrylamide n'ont pas permis de révéler de différences majeures entre les isolats de BCV.

Pour les fins de comparaison sérologique, un antisérum hyperimmun produit chez le lapin contre la souche Mebus du coronavirus bovin ainsi que des anticorps monoclonaux (AcMo) dirigés contre les glycoprotéines S et HE du BCV, ont été utilisés. La réactivité des AcMo envers les isolats de BCV associés aux épisodes de diarrhée néonatale du veau a été

analysée selon différentes épreuves sérologiques. Ces AcMo avaient été obtenus lors d'expériences de fusion réalisées à l'aide de splénocytes de souris immunisées contre la souche de référence du Nébraska et les cellules myélomateuses Sp2/0 non-sécrétrices. Les tests d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) ont permis l'identification de deux isolats se différenciant sérologiquement de la souche prototype. Les analyses des profils polypeptidiques par la technique d'immunobuvardage de même que les tests d'immunofluorescence et de séroneutralisation, à l'aide de l'antisérum polyclonal de référence, ont démontré que tous les isolats québécois de BCV partageaient des déterminants antigéniques au niveau de chacune de leurs protéines structurales.

Des épreuves d'ELISA compétitives réalisées entre des AcMo dirigés contre la glycoprotéine S ont permis l'identification de 4 domaines antigéniques majeurs A,B,C et D au niveau de la glycoprotéine S. Les épitopes associés à l'activité neutralisante du virus ont été localisés sur les sites A, B et C. Le domaine antigénique D de la glycoprotéine S, de même que les épitopes non-neutralisants assignés aux domaines antigéniques A et C sont apparus très conservés parmi les isolats québécois de BCV. La souche minnesota du coronavirus entérique de la dinde a pu être différenciée de la souche Mebus du BCV par les épitopes appartenant au domaine C. Le coronavirus humain HCV-OC43 se différenciait

par les épitopes appartenant au domaine antigénique A. Quant au coronavirus hémagglutinant de l'encéphalomyélite porcine (HEV), il pouvait être distingué des autres coronavirus hémagglutinants par les épitopes neutralisants localisés sur les domaines antigéniques A, B et C. Toutefois, les tests d'ELISA réalisés avec ces mêmes AcMo ont permis de reconnaître trois différents sous-groupes antigéniques parmi les isolats québécois de BCV.

Au niveau moléculaire, nous avons testé la réactivité des différents virus étudiés envers une sonde moléculaire couvrant entièrement le gène codant pour la glycoprotéine HE de la souche Mebus du BCV. De plus, nous avons procédé à l'analyse des séquences nucléotidiques de ce gène et ce, pour différents isolats de BCV. Les épreuves d'hybridation moléculaire ont permis l'identification de tous les isolats de coronavirus possédant le gène codant pour la glycoprotéine de l'hémagglutinine. Aucune réactivité de la sonde moléculaire envers des virus à ARN ou à ADN hétérologues n'a été obtenue. Selon l'analyse des séquences nucléotidiques, aucune variation significative n'a pu être observée au niveau du gène HE des isolats associés aux épisodes de diarrhée néonatale du veau. La majorité des mutations se retrouvaient au niveau des extrémité 5' et 3' du gène. Aucune délétion ou insertion n'a été observée. Lors de l'analyse de la séquence d'acides aminés, 50% des mutations nucléotidiques se sont

avérées silencieuses. Toutefois, des changements significatifs ont été observés au niveau de la séquence du gène HE de l'isolat WD.2590 associé à la dysentérie d'hiver. Au moins trois changements majeurs ayant résulté en l'apparition de trois nouveaux résidus proline ont été identifiés. Pour les isolats de BCV analysés, aucune modification n'a pu être observée au niveau du site acétyl-estérase, cependant, pour l'isolat associé à la dysenterie d'hiver, l'inclusion d'un résidu proline immédiatement en amont du site de clivage a été identifiée, ce qui pourrait expliquer les changements observés au niveau des activités HA, AE et RDE.

INTRODUCTION

On retrouve des coronavirus chez la majorité des espèces animales domestiques et chez l'homme. Ils sont associés à des pathologies diverses affectant les systèmes respiratoire, nerveux et gastrointestinal. Une diversité antigénique importante existe au sein des membres de cette famille.

Chez les bovins, le coronavirus est considéré comme l'un des agents étiologiques majeurs du syndrome diarrhéique du veau nouveau-né en Europe et en Amérique du Nord (Bridger et al., 1978; Dea et al., 1980; Langpag et al., 1979; Mebus et al., 1973). Ce virus est de plus responsable de pneumonies chez les veaux (McNulty et al., 1984; Reynolds et al., 1985; Saif et al., 1986), de diarrhées chroniques chez les adultes (Takahashi et al., 1980) et possiblement de diarrhées hémorragiques (dysenterie d'hiver) affectant les sujets de moins d'un an lors de leur entrée en stabulation à l'automne (Durham et al., 1989; Saif et al., 1988). Au Canada le syndrome diarrhéique du veau nouveau-né est responsable de pertes économiques importantes attribuables aux taux élevés de mortalité, aux coûts des traitements de support et aux retards de croissance considérables des animaux convalescents (Dea et al., 1983).

Jusqu'à présent, plusieurs prototypes de vaccins ont été mis sur le marché, mais leur efficacité demeure très

controversée. La présence de sérotypes distincts pourraient en partie expliquer les succès relatifs obtenus jusqu'à présent dans les élevages de bovins laitiers et de bovins de boucherie du Québec et d'autres provinces canadiennes.

Les objectifs de ce projet de recherche étaient: de caractériser les différents isolats québécois de coronavirus bovin (BCV) au niveau biologique et sérologique; deuxièmement, de procéder à l'identification et à la topographie des déterminants antigéniques associés aux fonctions de virulence; et troisièmement, d'effectuer la comparaison des séquences nucléotidiques du gène HE codant pour la glycoprotéine de l'hémagglutinine. Ce travail s'inscrivait dans le cadre d'un projet de recherche sur la structure antigénique et le tropisme des coronavirus hémagglutinants.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. CORONAVIRUS ANIMAUX ET HUMAIN

1.1 Historique

La première description d'infection provoquée par un coronavirus a été rapportée par Schalk et Hawn en 1931 qui différencièrent le coronavirus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV) d'autres maladies respiratoires retrouvées chez le poulet. L'agent responsable de cette maladie fut isolé en 1937 par Beaudette et Hudson. Quelques années plus tard, Cheever et al. (1949) aux États-Unis ainsi que Gledhill et Andrewes (1951) à Londres, identifièrent le coronavirus de l'hépatite murine (MHV-JHM). En 1946, J.J. Holland, identifia l'agent responsable de la gastro-entérite porcine (TGEV). Cependant, ce n'est qu'autour des années 60, plus précisément après la découverte d'isolats de coronavirus humains (Tyrrell et Bynoe, 1965; Hamre et Procknow, 1966), qu'un lien a pu être établi entre tous ces virus et que le genre des Coronavirus ainsi que la famille des Coronaviridae ont été définis (Almeida et Tyrrell, 1967; McIntosh et al., 1967; Tyrrell et al., 1975).

On retrouve des coronavirus chez la majorité des espèces animales (Tyrrell et al., 1965; Hamre et al., 1967; McIntosh et al., 1967; Kapikian et al., 1969; Mengeling et al., 1972; Mebus et al., 1973; Jacobse-Geels et al., 1980; Hoshino et

Scott, 1980; Andries et Pensaert, 1981). Ils provoquent différentes pathologies chez les rats, les souris, les poulets, les dindes, les porcs, les chiens, les chats, les bovins et autres espèces. Ils affectent autant les systèmes nerveux, respiratoire que gastrointestinal (Tableau I).

1.2 Taxonomie

Au tout début, les virus appartenant au genre des Coronavirus étaient regroupés sur la base de leurs caractéristiques morphologiques telle que définies en microscopie électronique (Almida et Tyrrell, 1967). Depuis quelques années déjà, la nature du génome ainsi que leur mode de réplication particulier sont aussi considérés comme critères essentiels à la classification. Initialement, la famille des Coronaviridae ne comptait qu'un seul genre soit celui des Coronavirus. Depuis 1992, les Torovirus possédant la même stratégie de réplication que les Coronavirus, ont été classés à l'intérieur de la famille des Coronaviridae (Lai et al., 1994). Tout dernièrement, suite aux résultats obtenus lors de diverses études sur les Artérovirus, deux possibilités ont été retenues au niveau de la taxonomie. La première serait d'inclure les Artérovirus à l'intérieur de la famille des Coronaviridae pour ensuite diviser la famille en deux sous-familles: Coronavirinae et Artérovirinae. La deuxième serait de placer les Artérovirus à l'intérieur de la

famille des Artérviridae pour ensuite former un ordre comprenant les Artérviridae ainsi que les Coronaviridae. Jusqu'à présent, le virus de l'artérite virale équine, le virus responsable du syndrome reproducteur et respiratoire porcin et le virus de la fièvre hémorragique simienne sont considérés comme étant des artérvirus (Cavanagh et al., 1994).

Selon des études sérologiques de séroneutralisation, d'ELISA, d'immunofluorescence, d'immuno-électro-microscopie et d'inhibition de l'hémagglutination, le genre coronavirus a été divisé en 3 sous-groupes (Tableau I) antigéniquement distincts les uns des autres (Siddell et al., 1983; Sturman et Holmes, 1983; Wedge et al., 1982; Pederson et al., 1978). Le coronavirus bovin (BCV) appartient au sous-groupe des coronavirus hémagglutinants des mammifères tout comme le coronavirus hémagglutinant de l'encéphalomyélite porcine (HEV), le coronavirus respiratoire humain HCV-OC43 de même que le coronavirus de l'entérite transmissible des dindes (TCV). Entre les isolats appartenant aux différents sous-groupes, aucune réactivité croisée n'a pu être démontrée lors d'épreuves d'ELISA et d'immunofluorescence indirecte (Siddell et al., 1983; Pederson et al., 1978). À l'intérieur du sous-groupe des coronavirus hémagglutinants, seuls les BCV et TCV partagent des déterminants antigéniques reconnus dans les épreuves de séroneutralisation et d'inhibition de

TABLEAU I

**GROUPES ANTIGÉNIQUES, HÔTES NATURELS ET
PATHOLOGIES DES CORONAVIRUS.**

Groupe Antigénique	Virus	Hôte	IR	IE	H	IN	A
I	HCV-229E	homme	X				X
	TGEV	porc	X	X			X
	CCV	chien	X				
	FECV	chat	X				
	FIPV	chat	X	X	X	X	X
II	HCV-OC43	homme	X	?			
	MHV	souris	X	X	X	X	X
	HEV	porc	X	X		X	
	BCV	bovin	X	X			
	TCV	dinde	X	X			X
	RbCV	lapin	X				X
III	IBV	poulet	X				X

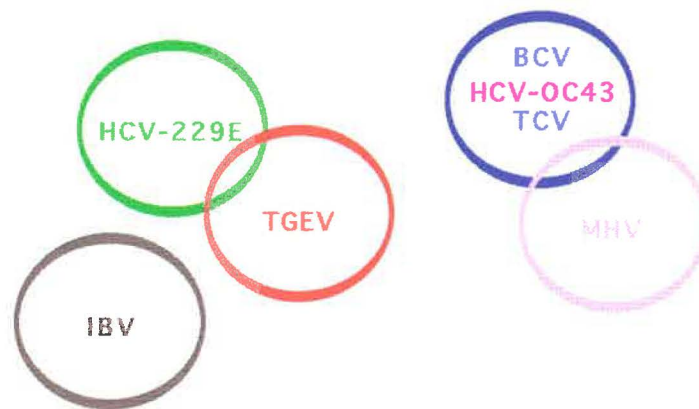
IR:Infection respiratoire; IE:Infection entérique; H:Hépatique;
IN:Infection neurologique; A:Autres

HCV 229-E: Coronavirus humain souche 229-E
TGEV: Coronavirus de la gastroentérite transmissible porcine
CCV: Coronavirus canin
FECV: Coronavirus entérique félin
FIPV: Coronavirus de la péritonite infectieuse féline
HCV OC43: Coronavirus respiratoire humain souche OC43
MHV: Coronavirus de l'hépatite murine
HEV: Coronavirus hémagglutinant de l'encéphalomyélite
 porcine
BCV: Coronavirus bovin
TCV: Coronavirus de l'entérite de la dinde
RbCV: Coronavirus du lapin
IBV: Coronavirus de la bronchite infectieuse aviaire

FIGURE 1

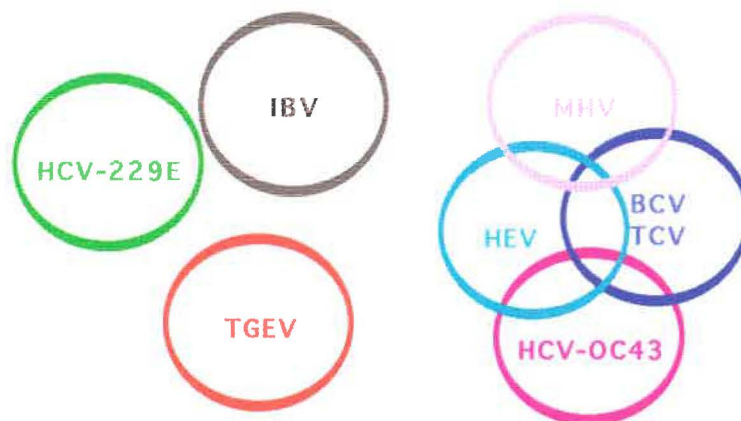
Sommaire des relations antigéniques croisées observées chez les coronavirus de différentes espèces animales

A)



Résumé des relations antigéniques chez les coronavirus tel qu'observé par des tests d'immunofluorescence indirecte (IIF) et d'ELISA.

B)



Résumé des relations antigéniques chez les coronavirus tel qu'observé par des tests de séroneutralisation (SN) et d'inhibition de l'hémagglutination (IHA).

l'hémagglutination (Dea et al., 1989c; Figure 1).

1.3 Caractéristiques générales

1.3.1 Morphologie

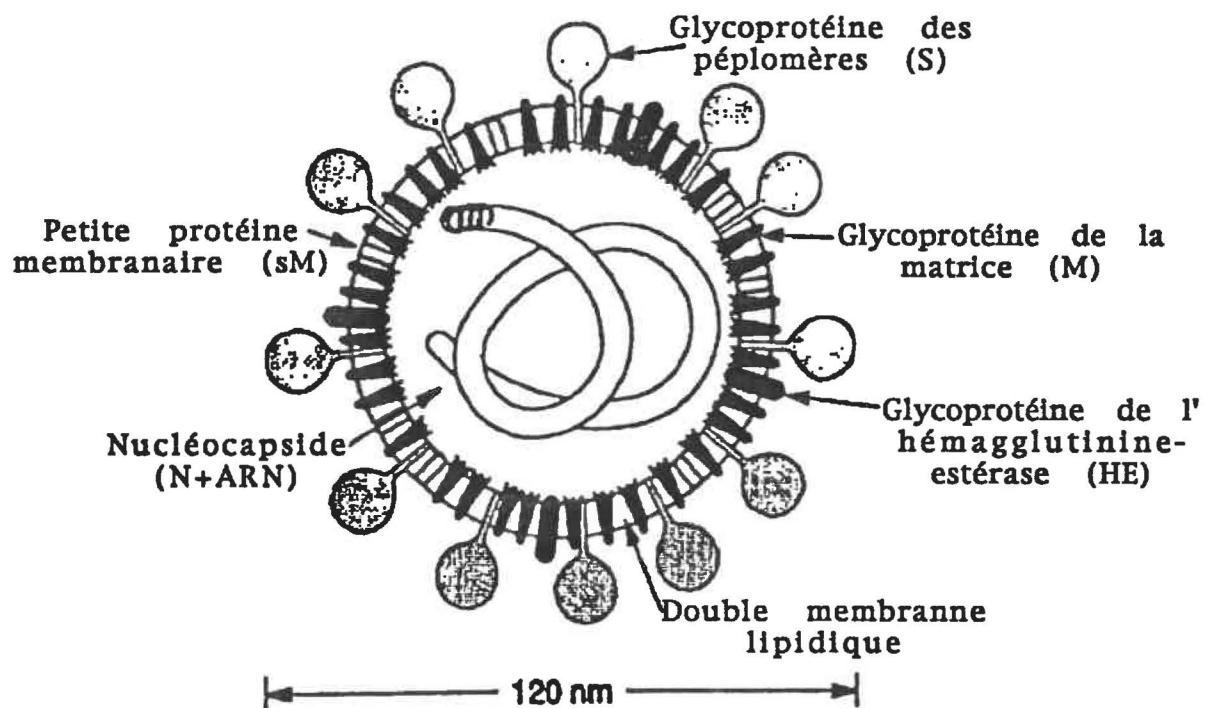
Les coronavirus sont des particules pléomorphes de forme sphérique à ovale, et possédant un diamètre se situant entre 60 et 220 nm (Tyrrell et al., 1968). Le virion est enveloppé d'une double membrane lipidique dans laquelle sont ancrées des péplomères largement espacés dont les extrémités se terminent en renflement. Ceux-ci confèrent aux particules virales l'aspect caractéristique d'une couronne en microscopie électronique, d'où le nom de corona. Les coronavirus hémagglutinants des mammifères possèdent un second type de projections de surface, de forme plutôt granulaires, situées à la base des péplomères plus caractéristiques (Figures 2 et 3).

1.3.2 Culture in vitro

Les premiers essais positifs d'adaptation des coronavirus en cultures cellulaires ont été réalisés à la fois à l'aide de cultures de cellules de trachée humaine (Tyrrel et Bynoe, 1965) et de cultures de cellules de reins humains (Hamre et Procknow, 1966). Dans les deux cas,

FIGURE 2

REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE D' UN CORONAVIRUS



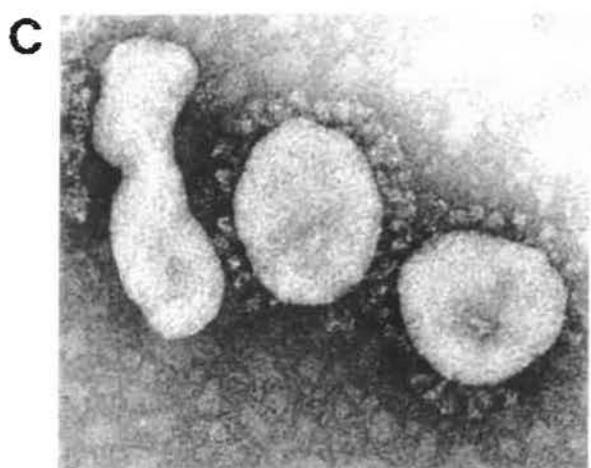
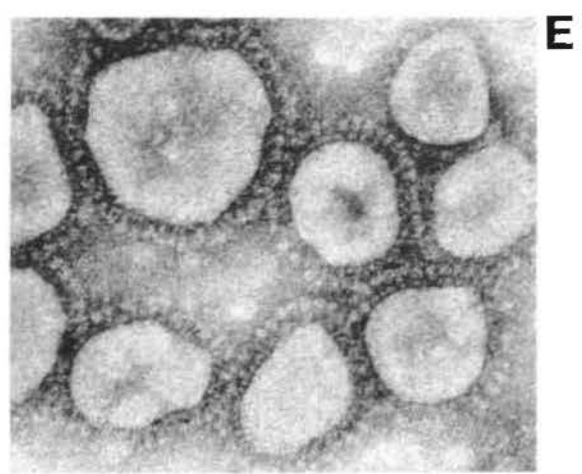
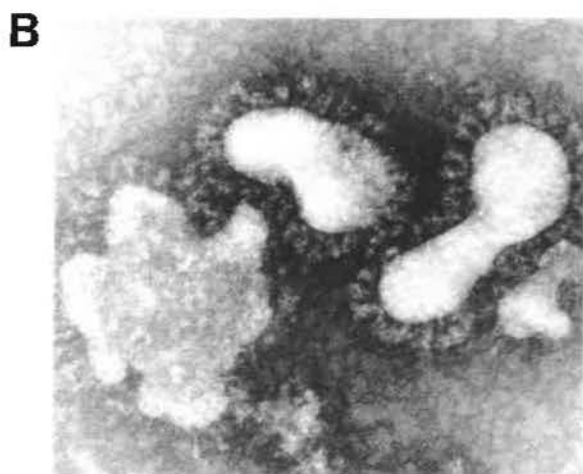
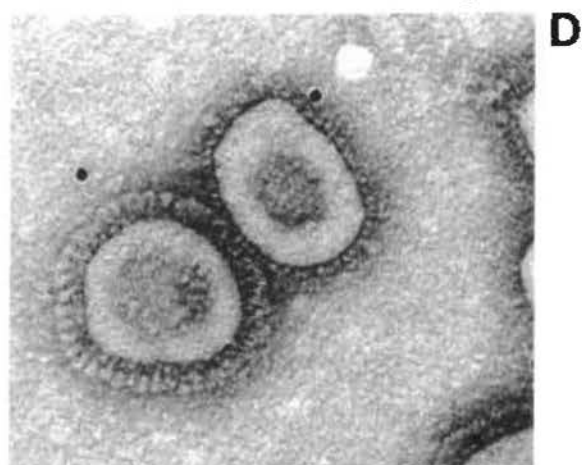
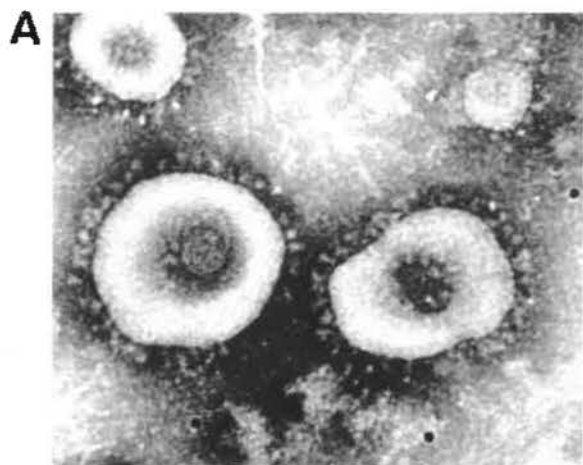
Tirée de : Revision of taxonomy of the coronavirus, torovirus and arterivirus genera, 1994.

FIGURE 3

MICROGRAPHIE ÉLECTRONIQUE À IMPRÉGNATION NÉGATIVE DES PARTICULES VIRALES DE CORONAVIRUS

- A. Coronavirus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV)
- B. Coronavirus respiratoire humain (HCV-OC43)
- C. Coronavirus hémagglutinant de l' encéphalomyélite porcine (HEV)
- D. Coronavirus entérique bovin (BCV)
- E. Coronavirus de l'entérite transmissible des dindes (TCV)
- F. Coronavirus de la gastroentérite transmissible des porcs (TGEV)

Tirée de Dea et Garzon, 1991.



différents isolats de coronavirus humains ont été isolés suite à de multiples passages cellulaires. En 1969, McIntosh et al. ont rapporté la facilité d'adaptation en cultures cellulaires d'isolats viraux antigéniquement associés à la souche HCV-229E du coronavirus humain, comparativement à ceux antigéniquement associés à la souche HCV-OC43.

En plus des cultures primaires ou secondaires de cellules embryonnaires de reins humains, il a été possible de propager certains coronavirus humains sur des lignées cellulaires diploïdes de fibroblastes humains ainsi que sur certaines lignées cellulaires hétéroploïdes comme les cellules MA-177. Cependant, les plus hauts titres infectieux ont été obtenus après propagation sur une lignée cellulaire provenant d'un rhabdomyosarcome humain (Shmidt et al., 1979) aussi bien pour le coronavirus humain HCV-229E que le virus HCV-OC43. L'adaptation ainsi que la propagation des coronavirus entériques se sont toujours avérées plus compliquées que pour les autres coronavirus. Par exemple, avant l'adaptation du BCV sur les cellules HRT-18 (Laporte et al., 1980), celui-ci pouvait difficilement être propagé en laboratoire. Bien que se multipliant sur des cultures primaires de cellules de reins de fœtus bovins, l'effet cytopathogène y était difficilement identifiable. Sur les lignées cellulaires continues comme les cellules Vero, PK-15 et MDBK, bien qu'un effet cytopathique ait pu être démontré

(Dea et al., 1980), les titres infectieux n'étaient jamais élevés. Les cellules HRT-18, provenant d'un adénocarcinome intestinal humain et ayant conservé certaines caractéristiques des entérocytes normaux des intestins, permettent une multiplication rapide et efficace du coronavirus bovin. Les cellules HRT-18 sont aussi permissives aux coronavirus hémagglutinants d'autres virus comme HCV-OC43, TCV et HEV (Dea et al., 1989c; Storz et al., 1981).

1.3.3 Propriétés physico-chimiques

Le virion possède une densité de flottation de 1.17 à 1.21 g/ml sur gradient de saccharose (Tyrrell et al., 1975). Les coronavirus perdent leur infectivité après une période d'incubation de 10 à 15 minutes à 56°C. Les coronavirus entériques conservent leur infectivité pendant plusieurs mois à -20°C et sont stables à des valeurs de pH se situant entre 3,0 et 11,0. Cependant les coronavirus associés aux infections des systèmes respiratoire et nerveux sont sensibles à des valeurs de pH inférieures à 6,0. Les solvants des lipides détruisent le pouvoir infectieux ainsi que l'activité hémagglutinante des coronavirus (Dea et al., 1989c; Spaan et al., 1988).

1.4 Membrane lipidique

Les lipides de l'enveloppe virale correspondent essentiellement aux lipides des membranes cellulaires. La double membrane lipidique virale est donc composée de glycolipides, de phospholipides et de cholestérol (Siddell et al., 1983; Sturman et Holmes, 1983).

1.5 Le génome

Le génome des coronavirus est constitué d'une seule molécule d'ARN monocaténaire (Struman et al., 1983), non-segmentée, polyadénylée en 3' (70 à 90 nucléotides) et munie d'une coiffe méthylée en 5'. L'ARN viral est de polarité positive donc infectieux (Lomniczi B., 1977; Schochetman et al., 1977). L'ARN viral est en étroite association avec la nucléoprotéine N de la capsid (Bournsnell et al., 1987; Lee et al., 1991). L'analyse des séquences nucléotidiques du génome entier de coronavirus a démontré certaines variations au niveau de l'ARN génomique. En effet, le génome du coronavirus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV) compte 27 000 nucléotides tandis que celui du coronavirus murin (MHV) en compte 31 000 (Bournsnell et al., 1987; Lee et al., 1991). Les séquences nucléotidiques complètes du génome du TGEV porcin ainsi que du coronavirus humain HCV-229E sont aussi connues (Talbot et Levy, 1995).

1.6 Protéines virales et précurseurs

Chez les coronavirus, on retrouve de 3 à 4 protéines structurales. Les protéines de la matrice (M), de la nucléocapside (N) et des péplomères (S) sont présentes chez tous les coronavirus. La protéine de l'hémagglutinine-estérase (HE) n'a été identifiée jusqu'à maintenant que chez les coronavirus appartenant au sous-groupe des coronavirus hémagglutinants des mammifères. Toutes les protéines structurales mentionnées ci-haut induisent la production d'anticorps chez l'hôte infecté. Depuis peu, une nouvelle protéine structurale appelé "Small membrane protein" (sM), associée à l'enveloppe virale, a été identifiée pour les coronavirus IBV (Godet *et al.*, 1992), TGEV (Liu et Inglis, 1991) et HCV-OC43 (Mounir et Talbot, 1993a et b). En plus des différentes protéines structurales, le génome des coronavirus comprend de nombreux cadres de lecture (ORF) codant pour des protéines non-structurales (NS) dont les fonctions ne sont pas encore totalement élucidées.

1.6.1 Protéine N de la nucléocapside

La protéine N de la nucléocapside est une protéine phosphorylée dont le poids moléculaire varie de 50 000 (50K) à 60 000 (60K). L'analyse des séquences en acides aminés des virus MHV A-59 (Amstrong *et al.*, 1983), MHV-JHM (Skinner et

Siddell, 1984), IBV (Bournsnell et al., 1985), TGEV (Karpe et Brian, 1986) et BCoV (Lapps et al., 1987b) ont démontré que la protéine N est basique, riche en arginine et en acide glutamique et qu'elle est hautement conservée parmi les coronavirus appartenant au même groupe antigénique (Parker et Master, 1990). Pour les coronavirus bovin (Lapps et al., 1987b) et murin (Amstrong et al., 1983) le gène N est bicistronique. Le second ORF, code pour une protéine hydrophobique d'un poids moléculaire de 23K, présente seulement chez les coronavirus possédant un gène HE, qu'il soit fonctionnel ou non (Brian et al., 1992). Chez le coronavirus humain HCoV-OC43, le gène N semble posséder 3 ORF, il serait donc polycistronique (Mounir et al., 1993).

La protéine N se divise en 3 domaines conformationnels. Elle est synthétisée au niveau des ribosomes libres du cytoplasme et phosphorylée au niveau des résidus sérine par une protéine kinase présente dans les cellules infectées (Siddell et al., 1982; Stohlman et al., 1978, 1983.). Les résidus sérine comptent pour 8 à 10% des acides aminés de la protéine. La protéine N ne subit aucune modification post-traductionnelle avant son incorporation dans le virion. En plus d'être impliquée lors du processus de réplication de l'ARN, la protéine N interagit avec celui-ci pour former une nucléocapside flexible de symétrie hélicoïdale (Caul et al., 1979; McNaughton et al., 1978; Stohlman et Lai, 1979; Sturman

et Holmes, 1977). Pour le coronavirus MHV, l'une des régions de liaison de l'ARN à la protéine N se situe au niveau du second des trois domaines conformationnels de la molécule (Masters, 1991). Finalement, différentes études ont démontré que la protéine N se lie à la glycoprotéine de la matrice (M) située au niveau de l'enveloppe viral.

1.6.2 Protéine M de la matrice

La protéine M de la membrane est une glycoprotéine transmembranaire dont le poids moléculaire varie considérablement entre les coronavirus de différentes espèces. Selon l'isolat, le poids moléculaire de la protéine se situe entre 20 et 30 K (Lapps et al., 1987a et b; Verbeek et al., 1990; Hogue et al., 1984; Lapps et Brian 1985; Laude et al., 1987; Kapke et al., 1988; Britton et al., 1988). Lors d'analyse polypeptidique sur gels de polyacrylamide, la glycoprotéine M apparaît comme une famille de deux à trois polypeptides de poids moléculaires rapprochés (Dea et al., 1989a,b,c et d; Lapps et al., 1987a et b). Ceci s'explique par le fait qu'un précurseur de 20K, non-glycosylé, soit aussi incorporé dans la particule virale. Les variations de poids moléculaire ne sont pas dûes uniquement aux différences dans le nombre des acides aminés composant la protéine, mais aussi au type de glycolysation (O-liée ou N-liée), au nombre de sucres ajoutés ainsi qu'à leur complexité. Le procédé de

glycolysation de la protéine M diffère selon les coronavirus. Chez les coronavirus MHV et BCoV (Deregt *et al.*, 1987a) la glycosylation est de type "O" tandis qu'elle est de type "N" chez les coronavirus IBV, TGEV et TCV (Laude *et al.*, 1987; Stern et Steffon, 1982; Cavanagh, 1983; Garwes *et al.*, 1984; Cavanagh et Davis, 1987, 1988; Dea et Tijssen, 1988).

Suite aux analyses des séquences d'acides aminés de la protéine M pour différents coronavirus, 86% d'homologie a été observé entre les coronavirus BCoV et MHV (Spaan *et al.*, 1988), plus de 95% entre le BCoV et le coronavirus humain HCoV-OC43 (Mounir *et al.*, 1991) ainsi qu'entre le BCoV et le TCV (Verbeek *et al.*, 1990). Entre les séquences des souches humaine HCoV-OC43 et murine MHV-A59, il y a plus de 84% d'homologie (Mounir *et al.*, 1991). Entre les séquences d'acides aminés des coronavirus TGEV et FIPV, et le BCoV on ne retrouve que 37% d'homologie. Cependant, lorsque comparées entre elles, les séquences d'acides aminés des coronavirus TGEV et FIPV partagent plus de 95% d'homologie (Laude *et al.*, 1987a; Karpe *et al.*, 1988; Britton *et al.*, 1988b).

Selon le modèle de la structure secondaire déduit de l'analyse des séquences en acides aminés de la glycoprotéine M, la portion glycosylée de la protéine, soit environ 10% de la partie amino terminale, se retrouve au niveau de la surface externe de la membrane virale (Rottier *et al.*, 1986).

Les acides aminés situés entre les portions amino terminale et carboxy terminale, soit approximativement un tiers de la molécule, forment 3 hélices alpha hydrophobes traversant la membrane à 3 reprises. La portion carboxy terminale qui n'est ni hydrophobe ou hydrophile se situe à l'intérieur du virion et permet la liaison avec la nucléocapside (Spaan *et al.*, 1988). Habituellement, les protéines membranaires possèdent à leur extrémité amino terminale un polypeptide signal permettant l'insertion de la protéine dans la membrane. Chez les coronavirus, jusqu'à maintenant, seul la protéine M du coronavirus TGEV possède ce polypeptide signal d'environ 17 acides aminés (Laude *et al.*, 1987a et b). Chez les coronavirus MHV, IBV et BCoV, la troisième hélice alpha traversant la membrane jouerait ce rôle (Machamer et Rose, 1987; Mayer *et al.*, 1988). La protéine M est responsable de la maturation du virus. Elle permet l'ancrage des péplomères au niveau de l'enveloppe et détermine la localisation intracellulaire du site de bourgeonnement (Dubois-Dalq *et al.*, 1985).

1.6.3 Protéine S des péplomères

La glycoprotéine S confère aux coronavirus sa morphologie caractéristique. C'est une protéine glycosylée de 170 à 200 kDa (Siddell *et al.*, 1983; Sturman et Holmes, 1983; Spaan *et al.*, 1988). Le produit final dérive d'un précurseur

intracellulaire glycosylé de 150 kDa pour les coronavirus MHV, IBV et TGEV (Siddell et al., 1981; Rottier et al., 1981) et de 170 kDa pour les coronavirus BCV (Deregt et al., 1987a et b) et TCV (Dea et al., 1989b). Ce précurseur intracellulaire provient lui-même d'une apoprotéine de 130 kDa (Binns et al., 1985; Luytjes et al., 1987) possédant de 20 à 30 sites de glycosylation potentiels. Les oligosaccharides sont acquis à partir de molécules de dolichol-phosphate venant s'attacher aux résidus asparagine par un lien azoté, lors de la traduction du précurseur non-glycosylé (apoprotéine) au niveau du réticulum endoplasmique. La glycosylation de la protéine S est de type N (Holmes et al., 1981; Niemann et al., 1982; Deregt et Babiuk, 1987; Spaan et al., 1988).

Les analyses moléculaires du gène S des coronavirus IBV (Binns et al., 1985, 1986; Niesters et al., 1986), MHV-JHM et MHV-A59 (Schmidt et al., 1987; Luytjes et al., 1987), TGEV (Rasschaert et Laude, 1987; Jacobs et al., 1987), FIPV (de Groot et al., 1987), BCV (Parker et al., 1990b; Storz et al., 1992), et HCV-OC43 (Mounir et al., 1993b) démontrent la présence d'un site de clivage (Arg-Arg-Phe-Arg-Arg) pour les coronavirus IBV, MHV-JHM et BCV (Deregt et al., 1987; Abraham et al., 1991). Ce clivage est assuré par les protéases cellulaires et résulte au scindage de la glycoprotéine S en deux sous-unités non identiques S1 et S2, de 95 et 105K, pour

le coronavirus bovin (Deregt et al., 1987) et de 84 et 90K (Cavanagh et Davis, 1987) pour le coronavirus de la bronchite infectieuse aviaire. Contrairement à leurs homologues, la glycoprotéine S des coronavirus TGEV et FIPV, possédant un site clivage incomplet, ne peut être scindée par les protéases cellulaires (Horzinek et al., 1982). En ce qui concerne le coronavirus humain HCV-OC43, seulement quelques péplomères sont clivés (Cavanagh et al., 1986). Pour certains coronavirus, le scindage enzymatique de la protéine S est dépendant de la cellule-hôte, mais peut être obtenu par le traitement du virus à la trypsine (Dea et al., 1989a; Hogue et Brian, 1986; Sturman et al., 1985). Il est de plus, associé à l'activité fusogène de la protéine et nécessaire à l'infectivité du virus (St.Cyr-Coats et al., 1988; Sturman et al., 1985; Yoo et al., 1991). La sous-unité S1 représente la partie bulbeuse des péplomères (Cavanagh et al., 1983) tandis que la sous-unité S2, composée de trois hélices alpha forme la tige ainsi que la région d'ancrage des péplomères à l'enveloppe (de Groot et al., 1987a et b; Boireau et al., 1990). Pour les virus MHV et IBV (Rasschaert et Laude, 1987) ainsi que FIPV (de Groot et al., 1987) les deux hélices alpha formant la tige sont localisées entre les nucléotides 1007 et 1077 ainsi qu'entre les nucléotides 1269 et 1294. La troisième hélice alpha serait située entre les nucléotides 1305 et 1335 (Boireau et al., 1990). La biosynthèse de la glycoprotéine S se fait dans le réticulum endoplasmique

rugeux. Habituellement, un péplomère est composé de trois glycoprotéines S (de Groot et al., 1987; Delmas et al., 1990).

Toujours selon l'analyse des séquences nucléotidiques, le gène codant pour la glycoprotéine S ne possède qu'un seul ORF. Il existe cependant des variations considérables quant au nombre d'acides aminés composant la protéine. Entre les coronavirus HCV-OC43 et BCV, il existe plus de 95% d'homologie. Cependant, entre les coronavirus humain HCV-OC43 et HCV-229E ou MHV-A59 des délétions respectives de 48 et 139 acides aminés ont été identifiées (Mounir et al., 1991).

En plus d'être associée à l'activité fusogène du virus (Storz et al., 1981; Struman et al., 1985), à l'attachement du virus aux récepteurs cellulaires (Williams et al., 1990), à l'induction d'anticorps protecteurs (Collins et al., 1982), à l'immunité à médiation cellulaire (Holmes et al., 1986; Stohlman et al., 1986). La glycoprotéine S serait, pour certain coronavirus responsable de l'agglutination d'érythrocytes de poulet (Schultze et al., 1993a).

1.6.4 Protéine HE (hémagglutinine-estérase)

La glycoprotéine HE a d'abord été identifiée par Makino et al. (1983) ainsi que par Siddell et al. (1985). La

protéine de l'hémagglutinine-estérase est glycosylé, son poids moléculaire varie de 130 à 140 K. En condition réductrice la protéine est scindé en deux sous-unités polypeptidiques de 60 à 65 K liées par des ponts disulfures (Dea et al., 1990b, 1989a; Spaan et al., 1988; Hogue et Brian, 1986; King et Brian., 1982). Le gène HE est tout d'abord traduit en une apoprotéine de 47 K. Subséquemment, la glycosylation puis la polymérisation donnent naissance à un homodimère de 140 K (Hogue et al., 1989; Dea et al., 1989b; King et al., 1985) qui est en étroite association avec la protéine de la membrane et l'enveloppe viral. Le site d'ancrage de la glycoprotéine HE à l'enveloppe viral, se situe au niveau de la région carboxy-terminale (Parker et al., 1990). La glycoprotéine HE est présente chez le coronavirus respiratoire humain HCV-OC43, chez le coronavirus de l'encéphalomyélite porcine HEV ainsi que chez le coronavirus de l'entérite transmissible des dindes TCV (Schultze et al. 1991; Dea et al., 1989a, 1988; Hogue et al., 1986). Elle a aussi été identifié chez les variants antigéniques du coronavirus murin MHV-JHM (Taguchi et al., 1986, 1984) et MHV-DVIM (Gagneten et al., 1995). Cependant, pour la souche MHV-A59, bien que possédant un cadre de lecture ouvert codant pour le gène HE, la glycoprotéine HE n'a pu être identifié à la surface des virus. En plus de provoquer l'agglutination d'érythrocytes de différentes espèces animales (Vlasak et al., 1988a, 1988b), la

glycoprotéine HE possède des activités enzymatiques telle l'activité acétyl-estérase et enzyme destructrice de récepteurs (Zhang et al., 1991; Schultze et al., 1991; Parker et al., 1989; Vlasak et al., 1988). La glycoprotéine HE induit la production d'anticorps neutralisants (Vautherot et al., 1984)

1.6.5 Autres protéines

En plus des gènes codant pour les protéines structurales, le génome des coronavirus contient de nombreux ORF pouvant être transcrits puis traduits. Le nombre et la position de ces gènes varient selon les coronavirus de différentes espèces. Chez le coronavirus de la bronchite infectieuse aviaire, 5 ORFs sont identifiés. Trois d'entre eux sont localisés entre les gènes S et M, tandis que les deux autres se situent entre les gènes M et N (Bournsnell et al., 1984, 1985). L'un des ORFs se situant entre les gènes S et M code pour une protéine de 9.5 K. Chez le virus de la gastroentérite transmissible du porc, trois ORFs ont été identifiés entre les gènes S et M, tandis qu'un seul est localisé à l'extrémité 3' du gène N (Karpe et al., 1986, 1988). En ce qui concerne le coronavirus MHV, cinq ORFs ont été identifiés; trois d'entre eux sont situés entre les gènes S et M (Budzilowics et Weiss, 1987; Skinner et Siddell, 1985), un à l'extrémité 5' du gène S codant pour la

polymérase (Bredenbeek et al., 1990; Zoltick et al., 1990) et un à l'intérieur du gène N (Amstrong et al., 1983). Chez le BCV, quatre ORFs sont localisés entre les gènes S et M codant pour des protéines de 12.7, 4.8, 9.5 et 4.9 K (Abraham et al., 1990); un à l'extrémité 5' du gène HE codant pour la polymérase (Cox et al., 1989) et un autre à l'intérieur du gène N (Lapps et al., 1987). Pour le coronavirus humain HCV-OC43, deux cadres de lecture ont été identifiés entre les gènes S et M codant pour des protéines de 12.9 et 9.5 K, deux autres à l'intérieur du gène N (Mounir et al., 1994) et un dernier en 5' du gène HE (Labonté et al., 1995).

Jusqu'à présent, l'importance biologique des protéines non-structurales n'a pas été complètement élucidée. On leur accorde cependant un rôle au niveau de la multiplication virale. La protéine de 9.5 K identifiée pour les coronavirus IBV, TGEV et HCV-OC43 est présente en petite quantité à l'intérieur du virion. Les fonctions de cette protéine restent cependant à être déterminées. Certaines hypothèses énoncées sont en faveur d'un rôle comme protéine de transport (channel protein) tout comme la protéine M2 de l'influenza C (Talbot et Levy, 1995).

1.7 Structure antigénique

Les anticorps monoclonaux produits contre les

coronavirus MHV, BCoV, TGEV et IBV reconnaissent des déterminants antigéniques localisés sur les protéines structurales S, N et M pour les coronavirus MHV, TGEV et IBV ainsi que S, HE, N et M pour le BCoV (Spaan et al., 1988; Holmes et al.).

Il a été démontré qu'autant la sous-unité S1 que la sous-unité S2 de la glycoprotéine S peuvent induire la production d'anticorps neutralisants (Vautherot et al., 1992; Hussain et al., 1991; Deregt et al., 1989; Deregt et Babiuk, 1987; Laude et al., 1986). Chez le coronavirus bovin, au moins 4 domaines antigéniques ont été identifiés sur cette protéine (Vautherot et al., 1982). Deux de ces domaines, situés sur la sous-unité S1, induisent la production d'anticorps neutralisants. Chez le coronavirus de la gastroentérite transmissible des porcs, quatre domaines antigéniques ont été localisés sur la partie amino-terminale de la glycoprotéine S (Correa et al., 1990; Delmas et al., 1990; Jiménez et al., 1986;). Entre les différents isolats, les déterminants provoquant la production d'anticorps neutralisants semblent conservés (Enjuanes et al., 1990; Correa et al., 1988; Delmas et Laude, 1991) et conformationnels. Au moins 4 différents sites antigéniques, pour un total de 6 épitopes, peuvent être identifiés sur la protéine S du coronavirus murin (MHV). Deux sites antigéniques sont de nature conformationnelle, étant donné

l'absence de réactivité des AcMo suite à la dénaturation des préparations virales par des détergents anioniques. Au moins 5 épitopes sont présents sur la glycoprotéine S du coronavirus IBV de la bronchite infectieuse aviaire.

Au niveau de la protéine M, au moins deux sites antigéniques ont été identifiés pour le coronavirus MHV, pour un total de trois épitopes (Talbot *et al.*, 1984). Les AcMo dirigés contre la protéine de la matrice sont neutralisants lorsque en présence du complément (Collins *et al.*, 1982).

1.8 Cycle de multiplication viral

1.8.1 Généralités

La réplication des coronavirus, est essentiellement cytoplasmique avec une durée du cycle de multiplication de 14 à 18 heures. La période de latence est d'environ de 6 à 7 heures (Tooze *et al.*, 1984; Siddell *et al.*, 1982). Les coronavirus peuvent induire la production d'un effet cytopathique (Dubois-Dalq *et al.*, 1985; Frana *et al.*, 1985) sur les cellules infectées. Dans le cas du coronavirus bovin, cet effet est dépendant de la présence de trypsine dans le milieu de culture (Cavanagh *et al.*, 1986; Storz *et al.*, 1981; Dea *et al.*, 1980).

1.8.2 Attachement et pénétration

L'adsorption du coronavirus à la membrane cellulaire nécessite l'interaction entre les récepteurs cellulaires et les protéines de surface du virus. Autant la glycoprotéine S que la glycoprotéine HE ont la capacité de se lier aux récepteurs cellulaires (Williams et al., 1990; Spaan et al., 1988). Le coronavirus de la gastroentérite transmissible porcine (TGEV) ainsi que le coronavirus humain HCV-229E, par leur protéine S, reconnaissent l'aminopeptidase N présente à la surface de certaines cellules (Delmas et al., 1992; Yeager et al., 1992). La glycoprotéine S du coronavirus murin MHV, reconnaît à la surface des cellules une protéine de 110 K appartenant à la famille des antigènes carcinoembryonnaires (Yong et Makino, 1994; Dveksler et al., 1993, 1991; Yokomori et al., 1992; Williams et al., 1990). Enfin, pour le coronavirus bovin, autant les glycoprotéine S que HE reconnaissent à la surface des érythrocytes de poulet et de souris, les résidus d'acide neuraminique 9-O-acétylés (Schultze et al., 1993). Même si certains récepteurs cellulaires ont été identifiés chez les coronavirus, le mécanisme moléculaire de l'infection n'en est pas pour autant élucidé (Talbot et Levy, 1995). De nombreuses recherches restent à venir en ce domaine.

1.8.3 Réplication et transcription de l'ARN viral

Immédiatement après la pénétration et la décapsidation de l'ARN viral à l'intérieur de la cellule, le génome viral est traduit pour la synthèse d'une ARN polymérase ARN dépendante. Jusqu'à présent, la séquence nucléotidique du gène de la polymérase a été déterminée pour le coronavirus respiratoire humain HCV-OC43 (Labonté et al., 1995), pour le BCV (Cox et al., 1991) ainsi que pour le MHV (Bredenbeek et al., 1990; Zoltick et al., 1990). Le gène de la polymérase est traduit en une protéine de 200 K absolument nécessaire à la transcription du génome viral. Il en résulte la synthèse d'un ARN de même longueur que le génome mais de polarité négative appelé intermédiaire réplcatif (IR). Celui-ci sert par la suite de matrice pour la synthèse de copies du génome à être incorporées dans les particules virales nouvellement formées ainsi que pour la synthèse d'une série de 6 à 8 ARNm sous-génomiques codant pour les différentes protéines virales. Les ARNm sont polyadénylés en 3' et munis d'une coiffe en 5'. Chacun de ces ARNm possède au niveau de l'extrémité 3', la séquence complète de l'ARNm qui lui est immédiatement plus petit, et une séquence unique supplémentaire au niveau de l'extrémité 5' codant pour le produit du gène (Spaan et al., 1988).

Depuis une dizaine d'années, l'hypothèse d'un modèle de transcription médié par les séquences de têtes libres, proposé par Makino, était universellement accepté (Talbot et Levy, 1995). Cependant bien qu'au niveau moléculaire cet hypothèse soit encore plausible, de récentes études ayant mené à l'identification d'un ARN sous-génomique de polarité négative relance le débat sur les mécanismes précis de la répllication, de la transcription ainsi que de leur régulation. Suite à ces découvertes de nouveaux modèle de transcription ont été élaborés dont l'un proposant que chacun des ARNm sous-génomiques puisse initier sa propre répllication (Lai et al., 1990, 1994; Talbot et Levy, 1995).

1.8.4 Assemblage des virions et maturation

Les coronavirus maturent par un processus de bourgeonnement s'opérant au niveau des membranes du RE et des cysternes de l'appareil de Golgi. Au site de bourgeonnement, les nucléocapsides hélicoïdales formées au niveau du cytosol s'alignent au niveau de la surface des vésicules présumément aux endroits où viennent se disposer les protéines virales pour l'assemblage du virion (Dubois-Dalq et al., 1985; Sturman et Holmes, 1983).

2. CORONAVIRUS BOVINS

2.1 Introduction

Chez les bovins, le coronavirus est considéré comme l'un des agents étiologiques majeurs du syndrome diarrhéique du veau nouveau-né en Europe et en Amérique du Nord (Dea et al., 1980; Langpag et al., 1979; Mebus et al., 1973). Ce virus est aussi responsable de pneumonies chez les veaux (Saif et al., 1986; Reynolds et al., 1985), de diarrhées chroniques chez les adultes (Takahashi et al., 1980) et possiblement de diarrhées hémorragiques (dysenterie d'hiver) affectant les sujets de moins d'un an lors de leur entrée en stabulation à l'automne (Durham et al., 1989; Saif et al., 1988). Au Canada, la diarrhée néonatale du veau est responsable de pertes économiques très importante pour l'industrie de l'élevage des bovins laitiers et de boucherie (Dea et al., 1980).

2.2 Pathologie

2.2.1 Diarrhée néonatale du veau

L'étiologie de la maladie est complexe et regroupe de nombreux agents pathogènes. Cependant, le rotavirus et le coronavirus semblent être les principaux agents viraux

responsables des troubles de diarrhée chez les veaux naissants (Dea et al., 1980). Habituellement, ces infections virales favorisent ou compliquent certaines infections bactériennes dont les infections par les sérotypes entéropathogènes ou entérotoxinogène d'E. coli (Saif et al., 1986; Dea et al., 1982). La diarrhée néonatale survient habituellement chez les veaux d'une à trois semaines d'âge. La gravité de l'infection à coronavirus dépend de l'état immunitaire des animaux, de la dose de virus, de la virulence des souches ainsi que de la présence d'agents opportunistes (Dea et al., 1982). Les principaux signes cliniques consistent en un abattement général, une grande faiblesse, une hypersalivation, de l'anorexie, de l'amaigrissement et une diarrhée profuse. Les animaux atteints excrètent des fèces très liquide, jaunâtre et abondante. Habituellement, la diarrhée s'accompagne d'une forte déshydratation. La maladie évolue en 4 à 14 jours. Les animaux qui récupèrent, habituellement demeurent dans un état de dénutrition avancée pour au moins de 4 à 6 semaines (Dea et al., 1982).

2.2.2 Dysenterie d'hiver

La dysenterie d'hiver se définit comme une diarrhée aiguë, rencontrée au début de l'hiver, chez les bovins adultes. Dans un troupeau, la diarrhée apparaît de façon soudaine et explosive, elle atteint la majorité des sujets

dans les 4 à 7 jours. Les principaux signes cliniques manifesté par les animaux malades sont une certaine faiblesse, de l'anorexie ainsi qu'une perte de poids. De plus, on constate une baisse de la production lactée qui peut durer plus d'une semaine. Les fèces sont claires, aqueuses, homogènes et parfois teintés de sang (Saif et al., 1991, 1990).

2.3 Variabilité antigénique et génomique parmi les isolats de coronavirus bovin

Des études tendent à démontrer qu'il existe parmi les coronavirus bovin des variants de pathogénies différentes (Benfield et Saif, 1990; Saif et al., 1986; Reynolds et al., 1985; Dea et al., 1980). À l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre la glycoprotéine S, une souche de BCV considéré hautement virulente a pu être différenciée d'une souche non-virulente (Hussain et al., 1991). Selon différentes études moléculaires, il semble que des altérations au niveau de la glycoprotéine S puissent conduire à un changement de pathogénicité (Rekik et Dea, 1994; Zhang et al., 1991). Une région hautement polymorphique a été identifiée au niveau de la sous-unité S1 du BCV entre les résidus d'acides aminés 456 à 592 (Yoo et al., 1991; Parker et al., 1990). Des mutations au niveau de ces régions peuvent résulter en une baisse de la virulence, ce qui suggère le

rôle important de la glycoprotéine S dans la pathogénicité du coronavirus bovin (Rekik et Dea, 1994). De plus, il semble qu'il existe des différences importantes au niveau du site de clivage enzymatique de la glycoprotéine S entre les souches de coronavirus bovin faiblement ou hautement fusogène (Rekik et Dea, 1994). Des variations antigéniques entre les coronavirus associés à des épidémies de diarrhée du veau nouveau-né ont été identifiées au début des années 80 par des techniques de contre immuno-électro-osmophorèse et d'immunoprécipitation (Dea et al., 1982). De même, Saif et Benfield (1990) ont pu identifier des variations sérologiques entre des souches de dysenterie d'hiver et les souches de diarrhée néonatale du veau.

2.4 Diagnostic

Jusqu'à présent, deux principales méthodes sont utilisées par différents laboratoires de diagnostic quant à la détection de coronavirus dans les échantillons cliniques. Les infections à coronavirus peuvent être démontrés directement dans les matières fécales suite à un examen en microscopie électronique après imprégnation négative ou par une technique d'ELISA indirecte. Tout dernièrement, une technique d'immuno-électromicroscopie après incubation en présence d'un antisérum suivi d'une autre incubation en présence de la protéine A couplée à l'or colloïdale s'est

avéré plus sensible que les techniques de microscopie conventionnelle et d'ELISA (Athanasious et al., 1994; Dea et Garzon, 1991). Cependant, la technique d'ELISA permet l'analyse simultanée de plusieurs échantillons lors d'un même test. Différentes techniques utilisant des sondes moléculaires radioactives ou biotinylées ont aussi été décrites dans la littérature (Verbeek et al., 1990; Shockley et al., 1987).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. ORIGINE ET IDENTIFICATION DES VIRUS

La souche prototype du coronavirus bovin (ATCC VR874) ainsi que la souche prototype du coronavirus hémagglutinant de l'encéphalomyélite porcine (ATCC VR740) ont été obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Md, É-U). La souche HCV-OC43 du coronavirus humain, ainsi que les souches MHV-JHM et MHV A-59 du coronavirus de l'hépatite murine, nous ont été gracieusement fournies par le Dr. P.J. Talbot de l'Institut Armand-Frappier. La souche Minnesota du coronavirus de la dinde (TCV) a été obtenue du Dr. B.S. Pomeroy de l'Université du Minnesota, St-Paul, Mn., É-U. Les isolats cliniques de coronavirus bovin ont été obtenus soit, entre 1987 et 1992 des contenus intestinaux de veaux diarrhéiques de fermes de 6 différentes régions géographiques du Québec (BCQ), soit durant l'hiver 1992-1993 d'échantillons fécaux de bovins adultes atteints de la dysenterie d'hiver (WD). La souche Hollande du coronavirus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV), de même que la souche Purdue du coronavirus de la gastroentérite transmissible du porc (TGEV; ATCC VR763), ont aussi été obtenues de l'ATCC.

La souche Nebraska (NCDV) du rotavirus bovin, la souche Q.890 du virus de l'encéphalomyocardite porcine (EMCV) ainsi que le virus de l'immunodéficience bovine (BIV), cultivés antérieurement dans le laboratoire du Dr. S. Dea de

l'Institut Armand-Frappier, ont été utilisés à quelques reprises, comme virus témoins.

2. CULTURES CELLULAIRES

2.1 Origine des cellules

La lignée cellulaire HRT-18, établie à partir d'un adénocarcinome intestinal humain (Thompkins et al., 1980.), a été obtenue du Dr. Jean-François Vautherot de l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA), Jouy-en-Josas, France. Ces cellules ont conservé plusieurs caractéristiques des entérocytes normaux des intestins, dont la présence de microvillosités de surface où sont probablement localisés les récepteurs du virus.

2.2 Culture des cellules

Les cellules étaient mises en culture à raison d'une densité initiale de 150 000 cellules/ml. Elles étaient maintenues dans le milieu RPMI 1640 (GIBCO Laboratories Inc., Grand Island, NY.) supplémenté de 50 µg/ml de gentamycine (GIBCO), de 100 U/ml de pénicilline (GIBCO), de 100 µg/ml de streptomycine (GIBCO), de glutamine 2 mM (GIBCO) et de 10 à 15% de sérum foetal bovin irradié (SFB; GIBCO) et préalablement décomplémenté à la chaleur (56°C, 60 min.). Les

cultures cellulaires étaient incubées à 37°C en présence de 5% de CO₂. Un feuillet confluent était obtenu en moins de 4 jours.

Les passages cellulaires étaient effectués deux fois par semaine. Après deux lavages du feuillet cellulaire avec une solution saline phosphatée (PBS) ne contenant ni Ca²⁺ ni Mg²⁺ et ajustée à pH 7.4, un faible volume d'une solution 0.05% (p/v) de trypsine/PBS (Grade X; Sigma Chemical Co., St-Louis, MO, É.-U.) et 0.02% EDTA (acide éthylènediamine tétraacétique disodique; Sigma) était versé directement sur le feuillet cellulaire. Après détachement du feuillet de la surface du flacon et la dispersion des cellules, le dénombrement des cellules viables, colorées à l'aide d'une solution de bleu de trypan (1%), était effectué à l'hémacytomètre. La suspension cellulaire était réajustée à une concentration de 150 000 cellules/ml et un volume approprié était déposé dans les flacons de culture de 25, 75 ou 150 cm² (Corning Glass Works, N.Y., É.-U.) ou dans les cupules de plateaux à 96 puits (Flow Laboratories Inc., McLean, Va , E-U.).

3. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS CLINIQUES

Les contenus intestinaux étaient homogénisés dans 10 volumes de tampon Tris-HCl 0.05M, pH 8.0, et clarifiés par

centrifugation à 5000 x g pendant 30 min à 4°C. La présence de particules virales dans les préparations clarifiées était confirmée suite à l'examen en microscopie électronique (voir 7.1) Les échantillons contenant des particules coronaviriformes furent gardés et congelés à -70°C pour les fins d'isolement en cultures cellulaires (voir 4.1).

4. PROPAGATION DES VIRUS

4.1 Infection des feuillets cellulaires

Les différents virus ont été propagés sur feuillets cellulaires à 80% de confluence. Une fois le milieu de croissance vidangé, les feuillets cellulaires étaient rincés à deux reprises avec du PBS puis ensemencés à l'aide d'une quantité connue de virus correspondant à une multiciplicité d'infection (MOI) d'environ 0.1 DECP₅₀ par cellule. Après une période d'adsorption de 90 minutes à la température de la pièce, le milieu de maintien sans SFB était ajouté. Ce milieu était supplémenté de 10U/ml de trypsine pancréatique bovine (Sigma grade XIII). L'effet cytopathique (ECP) était observé au microscope photonique à inversion. Les cultures cellulaires étaient maintenues jusqu'au moment où l'on observait une détérioration de plus de 50% du feuillet cellulaire.

5. CONCENTRATION ET PURIFICATION DES SUSPENSIONS VIRALES

5.1 Suspensions virales clarifiées

Au moment où l'effet cytopathique affectait plus de 50% des cellules, soit au plus tard sept jours post-infection (pi), les cultures cellulaires étaient soumises à trois cycles de gel-dégel. Les suspensions obtenues étaient centrifugées à basse vitesse (3000 x g, 30 min à 4°C) afin d'éliminer les débris cellulaires. Les surnageants ainsi clarifiés étaient aliquotés et conservés à -70°C.

5.2 Sous-clonage des isolats cliniques

Afin de nous assurer de l'homogénéité des différents isolats propagés en culture cellulaires, ces derniers ont été sous-clonés par une technique de dilution limite, tel que décrit au point 6. À chaque passage on ne conservait que les surnageants des cultures correspondant aux plus hautes dilutions du virus démontrant un effet cytopathique ou pour lesquelles on pouvait toujours observer des foyers de fluorescence suite à l'incubation en présence du sérum hyperimmun dirigé contre la souche prototype.

5.3 Suspensions virales concentrées

Les surnageants clarifiés étaient transférés dans des tubes de 50 ml en polycarbonate (Beckman Instruments Inc., Paolo Alto, Ca., É-U). On procédait par la suite à une ultracentrifugation à 100 000 x g pendant 120 min à 4°C (rotor T-35), contre un coussin de 30% (p/v) de saccharose (Sigma) préparé dans le tampon TBS (Fisher Scientific) de 0,05M, à pH 8.0. Le culot était resuspendu dans 50µl du tampon.

5.4 Suspensions virales purifiées

Les préparations virales concentrées étaient ultracentrifugées à 100 000 x g pendant 16h à 4°C (rotor SW-27) à travers un gradient de densité continue de 20 à 60% de saccharose. Une fois la centrifugation terminée, les bandes virales opaques, correspondant à une densité de flottation de 1.20g/ml de saccharose, étaient récoltées manuellement tel que décrit par Maniatis *et al.*, (1982). Afin d'éliminer le saccharose, les fractions récoltées étaient diluées 1:5 dans le tampon TBS et recentrifugées à 100 000 x g pendant 2h à 4°C (rotor Ti-27). Le culot viral était finalement resuspendu dans un volume de 50 µl, aliquoté, et conservé à -70°C .

6. DÉTERMINATION DU TITRE INFECTIEUX

Des feuillets cellulaires HRT-18 étaient au préalable préparés dans des plateaux de 96 puits à fond plat (Flow Laboratories). Par la suite, des dilutions décimales de virus étaient ensemencées sur les feuillets cellulaires confluent à raison de 25µl par puits. Après une période d'adsorption de 90 min. à la température de la pièce, un volume de 100µl de milieu de croissance additionné de 10U/ml de trypsine, exempt de SFB, était ajouté. Les cultures étaient observées sous le microscope à partir du jour 3 pi jusqu'au jour 6 pi pour la mise en évidence de l'effet cytopathique (ECP). Le titre infectieux des virus était déterminé selon la méthode de Reed-Muench (Payment et Trudel, 1989) et estimé selon la valeur $\log_{10}$ de la plus haute dilution de la suspension virale engendrant un effet cytopathique dans au moins 50% des feuillets cellulaires inoculés (DEPC₅₀/ml).

7. MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

7.1 Imprégnation négative

Des grilles de cuivre recouvertes de Formvar et de carbone étaient déposées pour 2 minutes sur une goutte de suspension virale (selles clarifiées, surnageants de cellules infectées, etc.). Le surplus de liquide était absorbé à

l'aide d'un papier filtre et les grilles étaient rincées à l'eau distillée. Par la suite, les grilles étaient déposées sur une goutte d'acide phosphotungstique 2%, ajusté à pH 6.5 (Payment, P., M. Trudel. 1989). Les grilles étaient gardées à 4°C jusqu'à leur examen (Figure 4a etb).

8. ANTISÉRUMS

8.1 Sérums de référence anti-BCV

Un antisérum polyclonal hyperimmun, dirigé contre la souche Mebus du coronavirus bovin, a été produit chez le lapin. L'inoculum utilisé pour l'injection consistait en du virus purifié par ultracentrifugation. Au premier jour, les lapins ont reçu 0.5 ml d'antigènes viraux (250µg de protéines) mélangés à 0.5 ml d'adjuvant complet de Freund (Difco, Détroit, Michigan). Aux jours 14 et 28, les lapins ont été réinjectés avec un mélange de 0.5 ml d'antigènes viraux et de 0.5 ml d'adjuvant incomplet de Freund. La première injection a été réalisée par la voie intra-dermique à différents sites (0.1 ml/site), tandis que les deuxième et troisième injections ont été réalisées par la voie intramusculaire seulement. Au 40ième jour, les lapins ont été saignés et euthanasiés par injection intracardiaque d'euthanylTM (5-Ethyl-5-[-1-Methylbutyl]-2,4,6-trioxohexahydropyrimidine, ICN). L'antisérum ainsi récupéré a été

FIGURE 4

4a) PROFIL DE PURIFICATION DE LA SOUCHE MEBUS DU CORONAVIRUS BOVIN.

La purification des particules virales a été effectuée par centrifugation isopycniue sur gradients discontinus de densité de saccharose.

UHA : Unité Hémagglutinante.

--- : Activité Hémagglutinante.

— : Absorbance à 280 nm.

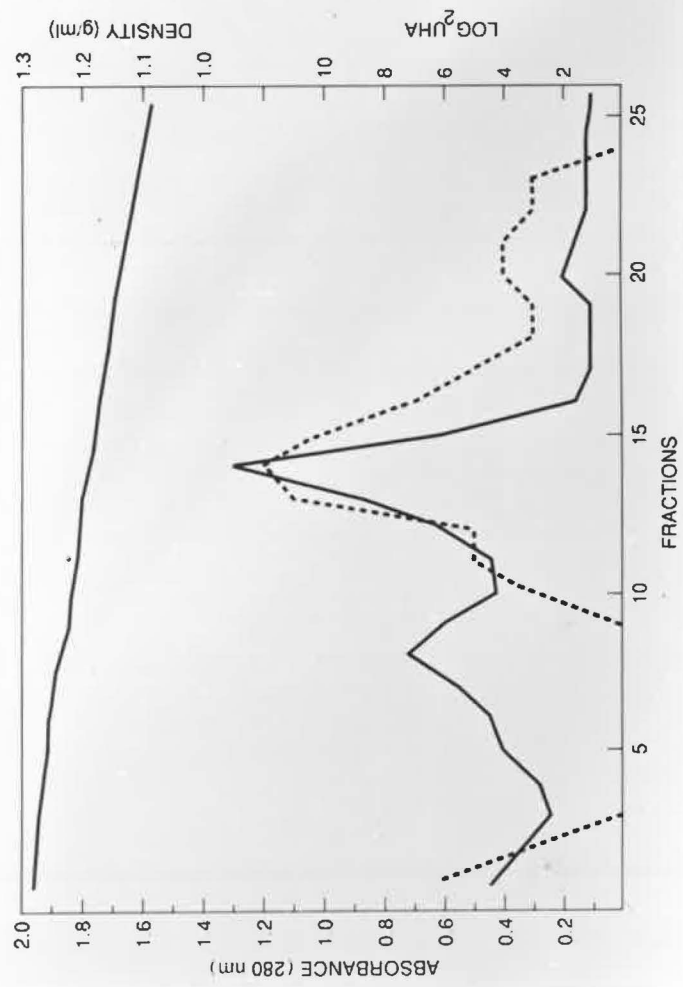
D' après Dea et al., 1989c.

4b) IMMUNO-ÉLECTRO-MICROSCOPIE DE PARTICULES DE CORONAVIRUS PURIFIÉES SUR GRADIENT DE DENSITÉ DE SACCHAROSE.

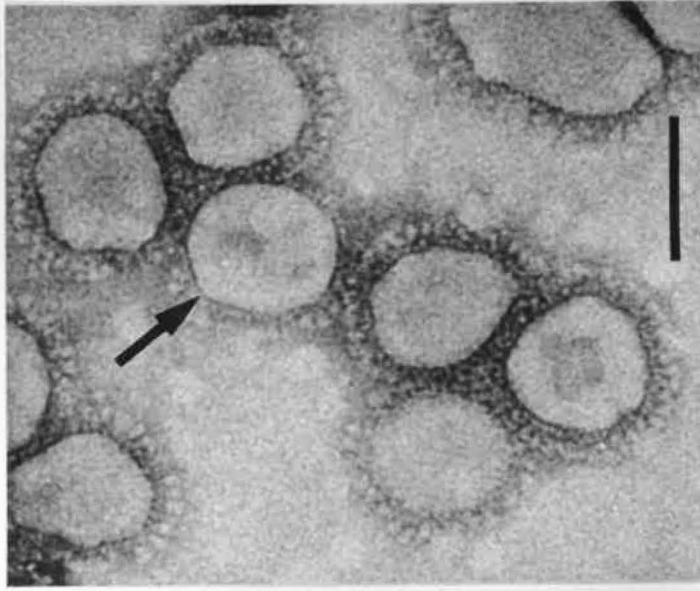
Particules virales de la souche Mebus du coronavirus bovin , après incubation en présence d' un antisérum hyperimmun anti-BCV produit chez le lapin.

D' après Dea et al., 1989c

A



B



inactivé à 56°C pendant 30 minutes, puis absorbé contre de l'albumine bovine de même que contre les cellules HRT-18. La spécificité des antisérums absorbés a été déterminée par les épreuves d'immuno-électro-microscopie (IEM) et d'inhibition de l'hémagglutination (IHA).

8.2 Autres antisérums

Des sérums hyperimmuns ont été produits chez des lapins contre la souche Minnesota du coronavirus de la dinde (TCV), la souche prototype du virus hémagglutinant de l'encéphalomyélite porcine (HEV), ainsi que la souche HCV-OC43 du coronavirus respiratoire humain. Ceux-ci ont été produits de la même façon que le sérum de référence anti-BCV.

9. IMMUNOMARQUAGE À LA PROTÉINE A-OR COLLOÏDAL

Les expériences d'immunomarquage à l'or colloïdal couplé à la protéine-A (PAG-IEM) ont été réalisées selon la procédure décrite par Dea et Garzon (1991). Brièvement, 100µl de surnageant des cultures cellulaires infectées, ou des dilutions des préparations virales purifiées (1:20), étaient placés dans des microtubes de nitrocellulose dans lesquels avaient été déposée préalablement une grille de nickel nue. Les particules virales étaient concentrées sur les grilles par suite d'une ultracentrifugation à 90 000 x g pendant 10

min (30 psi) à l'airfuge (Beckman). Les grilles étaient par la suite incubées en présence d'un antisérum hyperimmun homologue produit chez le lapin, puis en présence de particules d'or colloïdal conjugué à la protéine A (Pharmacia). Les particules d'or complexées à la protéine A mesuraient de 7 à 15 nm de diamètre. Les grilles étaient par la suite contre-colorées à l'aide d'une solution d'acide phosphotungstique 2%, pH 7.0. Pour démontrer la spécificité de la réaction immune, des réactions contrôles incluant le sérum hyperimmun seul et le complexe or colloïdal-protéine A seul étaient effectuées en parallèle.

10. TEST D'HÉMAGGLUTINATION ET D'INHIBITION DE L'HÉMAGGLUTINATION.

10.1 Test d'hémagglutination

Des dilutions sérielles en base 2 des échantillons de coronavirus étaient d'abord effectuées dans un tampon PBS, à pH 8.0, et déposées dans des plateaux de 96 puits à fond rond (Flow Laboratories) à raison de 100 µl/puits. À ces dilutions, étaient ajoutés 100µl d'une suspension à 0.04% de globules rouges (rat, poulet, souris) préparée dans du tampon PBS, pH 8.0, supplémenté de 0.4% de BSA. Les érythrocytes étaient préalablement lavés tel que décrit par Payment et Trudel (1989). Après une période d'incubation d'une heure à

la température désirée (4, 22 ou 37°C), le titre hémagglutinant était évalué selon la réciproque de la plus haute dilution de la préparation virale causant l'agglutination complète des globules rouges.

10.2 Test d'inhibition de l'hémagglutination

Pour les tests d'inhibition de l'hémagglutination, une quantité constante de virus, ajustée à une dose de 4 unités hémagglutinantes (UHA), était ajoutée à volume égal aux dilutions sérielles d'antisérum hyperimmun (100µl/puits) dans des microcabarets à 96 puits à fond rond. Après une période d'incubation d'une heure à 37°C, un volume de 100 µl d'une solution d'érythrocytes (0.4%) était ajouté. Le mélange était de nouveau incubé à 37°C pour 1 heure puis placé à la température de la pièce pendant toute la nuit. Les titres IHA étaient exprimés selon la réciproque de la plus haute dilution sérique inhibant l'activité hémagglutinante de 4 unités HA du virus.

Lors des épreuves HA et IHA, des témoins positifs et négatifs étaient testés en parallèle. Les dilutions à rebours des préparations virales étaient effectuées afin de s'assurer de l'exactitude du nombre d'unités HA utilisées.

11. MESURE DES ACTIVITÉS ACÉTYL-ESTÉrase ET ENZYMES DESTRUCTRICE DE RECEPTEURS

11.1 Activité acétyl-estérase

L'activité acétyl-estérase des différents isolats de coronavirus fut évaluée selon la technique décrite par Vlasak *et al.*, (1988). Brièvement, 15 μ l des préparations virales purifiées, possédant des titres infectieux variant entre $10^{7.2}$ et $10^{10.4}$ DEPC₅₀/50 μ l, étaient ajoutés à 3 ml de PBS, pH 8.0, contenant 1 mM de p-nitrophénylacétate (PNPA) préalablement dissous dans de l'éthanol (Fisher). L'hydrolyse du substrat (PNPA) était évaluée au spectrophotomètre à 405nm (Spectronic 2,000, Milton Roy) à toutes les minutes pour une période de 5 minutes. Les résultats obtenus après 5 minutes ont été utilisés pour les fins de comparaison. Les suspensions virales préparées dans du PBS sans substrat étaient utilisées comme témoins négatifs.

11.2 Activité enzyme destructrice de récepteurs

Les tests d'héماغglutination, utilisant les suspensions d'érythrocytes de coq ou de rat, ont été réalisés tel que décrit au point 10.1. Après une incubation d'une heure à 4°C, les microplateaux étaient immédiatement placés à 37°C ce qui permettait l'expression de l'activité acétyl-estérase.

L'activation de l'enzyme résultait en la destruction des complexes BCV-érythrocytes et une baisse des titres HA. Pour estimer l'activité RDE, on considérait la baisse des titres HA après 1 heure d'incubation à 37°C.

12. ANALYSE DES PROTÉINES STRUCTURALES SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRÉSENCE DE SDS (SDS-PAGE)

12.1 Migration sur gels de polyacrylamide

L'analyse des protéines virales a été réalisée par électrophorèse sur gels de polyacrylamide selon la méthode à pH discontinu décrite par Laemmli (1970). Brièvement, les gels de regroupement (3% acrylamide-0.08% bis-acrylamide; pH 6.8) et de séparation (12% acrylamide-0.32% bis-acrylamide; pH 8.4) ont été coulés entre deux plaques de verre à une épaisseur de 0,75 mm et d'une hauteur de 6cm (Appareil d'électrophorèse Mini-Protein II, Bio-Rad, Mississauga, Ont., Can.). Les échantillons à analyser ont été préalablement bouillis de 3 à 5 minutes à 100°C dans le tampon de dénaturation constitué de Tris 62.5mM, pH 6.8, 10% (v/v) de glycérol, 2% (p/v) de SDS, 0,0025% (p/v) de bleu de bromophénol, en présence ou en absence de 5% (v/v) de 2-mercaptoéthanol. L'électrophorèse fut conduite à une intensité de 60V pendant 1 h dans le tampon d'électrophorèse

constitué de Tris-HCl 0.025M, glycine 0.192M et de 0.1% SDS (p/v).

12.2 Révélation des protéines virales

Les protéines virales présentes dans les gels de polyacrylamide ont été révélées par coloration au bleu de Coomassie. Les gels de polyacrylamide ont été immergés pendant 1 h dans une solution contenant 10% (v/v) d'acide acétique glacial, 80% (v/v) de méthanol et 0.05% (p/v) de bleu de Coomassie R-250 (Bio-Rad). Les gels ont été par la suite décolorés dans une solution contenant 30% de méthanol et 7% d'acide acétique.

La masse moléculaire des protéines a été déterminée par comparaison de leur distance de migration avec celle des protéines standard de poids moléculaires connus (Rainbow Markers, molecular weight, Amersham).

13. IMMUNOBUVARDAGE

13.1 Préparation des suspensions d'antigènes viraux

Les protéines virales séparées par SDS-PAGE ont été transférées électrophorétiquement, selon la technique décrite par Towbin et al. (1979), sur une membrane de nitrocellulose

d'une porosité de 45 μm (Bio-Rad). Le tampon de transfert consistait en du tampon Tris 25mM, glycine 192 mM, pH 8.3, additionné de 20% (v/v) de méthanol. L'appareil Mini Trans Blot Cell (Bio Rad Labs) a été utilisé pour le transfert sous une tension constante de 60V pour une période de 2 heures. Par la suite les membranes ont été immergées dans le tampon de blocage TBS-Tween (NaCl 150mM, Tris 5mM, pH 8.0, 0,05% (v/v) Tween-20), puis rincées au TBS. Les membranes étaient utilisées immédiatement ou conservées à 4°C dans un emballage hermétique.

13.2 Réaction immunologique

Les membranes de nitrocellulose portant les protéines transférées ont été incubées, de 45 à 90 minutes, dans une solution de sérum de lapin hyperimmun anti-BCV (1:1000) préparée dans le tampon TBS-Tween. Après 3 lavages de 15 minutes, les membranes ont été réincubées, pour une période de 2 heures, dans une solution d'immunoglobulines de chèvre anti-IgG de lapin conjuguées à la peroxydase (1:2000). Après 3 autres lavages, les complexes immuns étaient révélés après une incubation, de 15 à 45 minutes, dans une solution de 0.06% (p/v) de 4-chloro-1-naphtol (Sigma) préparée dans le tampon TBS contenant 20% de méthanol (v/v) et 0.01% de peroxyde d'hydrogène (Sigma). La réaction était arrêtée suite à un rinçage à l'eau distillée.

Toutes les étapes de lavage ont été effectuées dans le tampon TBS-Tween à pH 8.3. Ces différentes étapes ont été réalisées sous agitation constante à la température ambiante.

14. PRÉPARATION D'ANTICORPS MONOCLONAUX

14.1 Origine des Anticorps Monoclonaux

Les anticorps monoclonaux dirigés contre la souche Mebus du coronavirus bovin avaient été produits dans le laboratoire lors d'études antérieures (Dea et Tijssen, 1989). Brièvement, des splénocytes de souris BALB/c, inoculées à 3 reprises avec des préparations purifiées de la souche prototype du BCV (ATCC VR874) mélangées à l'adjuvant complet ou incomplet de Freund, ont été fusionnés à des cellules myélomateuses non-sécrétrices (Sp-2/0) de souris en présence de 50% de polyéthylène glycol 1400 (Sigma). Les hybridomes obtenus ont été cultivés dans le milieu RPMI contenant 1% HAT (Sigma), 15% de sérum foetal bovin et 10% du milieu de conditionnement H1 (Boehringer-Mannheim). Les hybridomes sécréteurs d'anticorps contre les protéines du BCV ont été identifiés par des épreuves d'ELISA et d'immunofluorescence indirecte. Finalement, les clones sécréteurs ont été sous-clonés par la technique des dilutions limites (Dea et Tijssen, 1989).

14.2 Production et purification

Des liquides d'ascite ont été obtenus suite à l'injection intrapéritonéale à des souris Balb/c, de plus de 12 semaines d'âge, de 5×10^5 à 6×10^6 cellules hybridomes sécrétrices d'anticorps monoclonaux. Deux semaines auparavant, un volume de 0,5 ml de pristane (2,6,10,14-tétraméthyl pentadécane; Sigma) avaient été inoculé par la voie intrapéritonéale aux souris. Une fois récoltés, les liquides d'ascite ont été clarifiés par centrifugation et conservés à -20°C . Les immunoglobulines provenant du liquide d'ascite ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur une colonne de protéine A-Sépharose CL-4B (Pharmacia) (Dea et Tijssen, 1989).

14.3 Couplage à la biotine de l'anticorps

Les immunoglobulines purifiées ont été dialysées contre un tampon PBS à pH 7.4. Les solutions d'IgG ont par la suite été ajustées à une concentration de 1 mg/ml. Pour la réaction de couplage, les immunoglobulines ont été mélangées à une solution de biotine (1 mg N-hydroxyl-succinimide-biotine dans 1 ml de N'-N,diméthyl formamide à 25%) à raison d'un rapport moléculaire biotine-IgG de 90:1 (Michaud et Dea, 1992). Après une période d'incubation de 4 heures à 25°C , les anticorps biotinylés ont été dialysés contre un tampon PBS, à pH 7.4,

pendant 24 heures. Lors de cette étape, trois changements de tampon ont été effectués. Finalement, un volume égal de glycérol a été ajouté à la suspension d'anticorps dialysée. Les anticorps biotinylés ont été conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

15. IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

15.1 Préparation des échantillons

Les feuillets cellulaires infectés (voir 1.4) par différents isolats de coronavirus bovin ont tout d'abord été trypsinisés 24 heures après le début de l'infection. Le culot cellulaire obtenu, suite à une étape de centrifugation, a été resuspendu dans du milieu de culture sans SFB. Par la suite, la suspension cellulaire a été ajustée à une concentration d'environ 500 000 cellules/ml. Les cellules infectées ont été déposées, à raison de 25µl/puits, sur des lames de verre stériles recouvertes de teflon (Flow Laboratories). Après fixation des cellules à l'éthanol froid (-20°C) et séchage à l'air ambiant, on conservait les lames à -20°C.

15.2 Réaction immunologique

L'épreuve d'immunofluorescence a été réalisée à l'aide soit d'antisérum polyclonal hyperimmun ou des liquides

d'ascite des souris injectées avec les différents hybridomes. Les dilutions sérielles des spécimens à tester étaient déposées (25µl/puits) sur les lames contenant les cellules infectées. Après séchage à l'air ambiant, les lames étaient lavées à trois reprises, sous légère agitation, dans une solution de PBS. La réaction immunologique était révélée suite à une incubation de 45 minutes avec les préparations d'IgG de chèvre anti-IgG de lapin ou de souris conjuguées à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC; Cappel Laboratories Inc., Cochranville, PA). Après une deuxième série de lavages, les lames étaient montées sous lamelle à l'aide d'une solution de glycérine-PBS (9:1). Avant de procéder au montage avec le glycérol tamponné, la fluorescence non-spécifique était éliminée par un lavage additionnel avec une solution de PBS additionné de 0.003% de bleu d'Evans

16. SÉRONEUTRALISATION

Des dilutions sérielles à base 2 des antisérums polyclonaux ou des liquides d'ascite ont été réalisées dans des plateaux de 96 puits. Toutes les dilutions ont été effectuées dans le milieu de culture RPMI sans SFB mais contenant 10 U/ml de trypsine. Par la suite, 25 µl de la suspension virale, ajustée à une concentration de 400 DEPC₅₀/0.1ml, étaient ajoutés à toutes les cupules. Après une incubation de 90 min à la température de la pièce, les

mélanges "virus-dilution d'antisérum" étaient inoculés aux feuillets cellulaires HRT-18 préparés en plateaux de 96 puits à fond plat. Les microplateaux étaient par la suite incubés à 37°C. Après une période d'incubation de 5 à 7 jours, les feuillets cellulaires étaient fixés à l'aide d'une solution de méthanol contenant 1% de peroxyde d'hydrogène (Fisher). Les titres neutralisants des antisérums étaient estimés après coloration des feuillets cellulaires par la technique d'immunoperoxydase.

17. IMMUNOPEROXYDASE

Les feuillets cellulaires fixés étaient recouverts d'un volume de 100µl de la dilution appropriée (1:1000) du sérum hyperimmun anti-BCV produit chez le lapin. Après une période d'incubation d'une heure à 37°C, les feuillets étaient rincés 3 fois avec du PBS. Les feuillets étaient par la suite incubés en présence d'une préparation d'immunoglobulines de chèvre (100 mg/ml) marquées à la peroxydase de raifort (Sigma) pour une période de 2 heures à 37°C en atmosphère humide exempte de CO₂. Après une nouvelle série de lavages, les feuillets étaient recouverts de la solution de révélation consistant en une solution de 0.05 mg/ml de 3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochlorure (DAB) (Sigma) contenant 0.03% de peroxyde d'hydrogène et ajustée à pH 7,6. Lorsque la réaction était jugée optimale, les feuillets étaient lavés à

l'eau distillée afin d'arrêter la réaction enzymatique. La lecture de la réaction était faite au microscope photonique inversé.

18. ELISA

18.1 Préparation du matériel

Les différentes suspensions virales possédant un titre infectieux d'au moins 10^8 DEPC₅₀/ml ont été diluées 1:1000 dans du tampon 0,05M carbonate-bicarbonate, à pH 9.6. Pour l'enrobage, les préparations antigéniques étaient par la suite déposées, à raison de 100µl/puits, dans le fond des puits de microplateaux à 96 puits. Après une incubation d'une nuit à 4°C, le surplus des préparations antigéniques était vidangé par inversion des microplateaux. Par la suite, les sites de réactions non-spécifiques étaient bloqués par l'ajout à chacune des cupules de 150µl d'une solution de TBS, pH 8.0, contenant 0.5% de BSA (Sigma). Après une incubation d'une heure à 37°C, la solution de blocage était vidangée. Les microcabarets étaient conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

18.2 ELISA indirecte

Les dilutions d'anticorps (antisérum polyclonal,

liquide d'ascite ou préparations d'anticorps biotinylés) étaient déposées, à raison de 100µl/puits, dans des microplateaux préalablement enrobés de virus. Après une incubation de 90 à 120 minutes à 37°C en absence de CO₂, les puits étaient lavés à trois reprises avec le tampon de lavage (TBS 0.05M, à pH 8.0 additionné de 0.1% de Tween-20). Par la suite, la solution d'immunoglobulines, dirigées contre les IgG de l'espèce animale ayant servi à la production du premier anticorps et conjuguées à la peroxydase (1:2000), a été diluée dans le tampon de bloquage et ajoutée à raison de 100µl/puits. Après une nouvelle période d'incubation de 90 à 120 minutes à 37°C en absence de CO₂, les plateaux étaient lavés à trois reprises. Après avoir ajouté 100µl de la solution du substrat de l'enzyme (100µg/100ml d'acide 5-aminosalicylique dans 0.005% de peroxyde d'hydrogène, à pH 6.0), les plateaux étaient de nouveau incubés pour 30 minutes à la température de la pièce dans l'obscurité. Pour arrêter la réaction, 100µl de HCl 1N étaient ajoutés à chacun des puits. Par la suite, la valeur d'absorbance du contenu des puits était mesurée à une longueur d'onde de 474 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Titertek Multiscan, Flow Laboratories).

Des cellules HRT-18 non-infectées, des préparations de virus hétérologues, ainsi que la souche Mebus du coronavirus bovin, ont servi de contrôles négatifs et positifs. La

technique d'ELISA indirecte a été utilisée pour mesurer l'avidité comparative des différents anticorps monoclonaux (AcMo) ainsi que la réactivité croisée de ces AcMo envers les différents isolats québécois du BCV.

18.3 ELISA compétitive

Un volume de 100 µl de dilutions décimales d'anticorps monoclonaux non conjugués (compétiteurs) était déposé dans le fond des puits des microplateaux de 96 puits ayant été enrobés avec le virus. Après une période d'incubation de 90 à 120 minutes à 37°C en absence de CO₂, le surplus d'anticorps était vidangé. Après 3 lavages au TBS-Tween, un volume de 100µl/puits d'une dilution fixe d'anticorps biotinylés était ajouté. La dilution optimale à utiliser avait été préalablement déterminée. Après une période d'incubation d'une heure à 37°C, les plateaux étaient relavés à 3 reprises. Par la suite, un volume de 100µl d'une solution de streptavidine-biotine (Sigma) était ajouté à chacune des cupules. Après une nouvelle période d'incubation de 90 min à 37°C, les plateaux étaient de nouveau lavés à 3 reprises. Le substrat était par la suite ajouté tel que décrit précédemment (4.1). La valeur d'absorbance du contenu des cupules était mesurée à une longueur d'onde de 492 nm.

19. AMPLIFICATION DU GÈNE HE

19.1 Préparation du matériel

Étant donné la sensibilité aux ribonucléases des ARN simple brin, toutes les solutions ainsi que les instruments utilisés pour l'isolement d'ARN ont été traités avec une solution de 0.05% de diéthyl pyrocarbonate (DEPC), un inhibiteur des ribonucléases.

19.2 Isolement de l'ARN génomique

L'ARN génomique a été extrait des préparations virales purifiées selon la technique décrite par Chomczynski et Sacchi (1987). Brièvement, un volume de 500 μ l de la solution D (4M isothiocyanate de guanidine, 0.75M citrate de sodium à pH 7.0, 0.5% de sarcosyl et 0.1M de β -mercaptoéthanol) était ajouté à 100 μ l de préparation virale. Après avoir bien homogénisé, on procédait à une extraction au phénol-chloroforme (1:1) en présence d'acétate de sodium 2M, à pH 4.0. La phase aqueuse, contenant l'ARN viral, était prélevée et l'ARN était par la suite précipité 1 heure à -20°C par l'ajout d'un volume égal d'isopropanol. Après centrifugation à 10000 x g pendant 30 min., le culot était lavé à l'éthanol 75%, puis séché sous vide et resuspendu dans 10 μ l d'eau distillée traitée au DEPC. La préparation d'ARN était

conservée à -70°C et la concentration, évaluée au spectrophotomètre, variait habituellement de 10 à 50 ng/ μl .

19.3 Choix des amorces pour l'amplification du gène

HE

Les amorces oligonucléotidiques utilisées lors de la réaction de la transcriptase inverse (RT) et de l'amplification par la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) ont été choisies à partir des séquences publiées du gène HE de la souche Mebus du coronavirus bovin (Parker *et al.*, 1989). Pour le choix des amorces, nous avons considéré les critères de sélection tels que mentionnés par McInnis *et al.*, (1989). Les amorces HE.A et HE.B ont été choisies de façon à permettre l'amplification d'un fragment d'environ 1500 pb correspondant à l'extrémité 3' du gène de la polymérase, au gène HE ainsi qu'à l'extrémité 5' du gène S (Figure 5).

La localisation des amorces HE.A (5'-TTT ATG AAT CTC CAG TTG-3') et HE.B (5'-TTA ATC TCC TAT AAC AGC-3') a été déterminée par analyse de la séquence du génome de la souche Mebus du coronavirus bovin à l'aide du programme d'analyse Purstell (International Biotechnologies Inc., New Haven, CT, É-U.). L'amorce HE.A correspondait à la séquence nucléotidique complémentaire à la séquence de l'ARN génomique

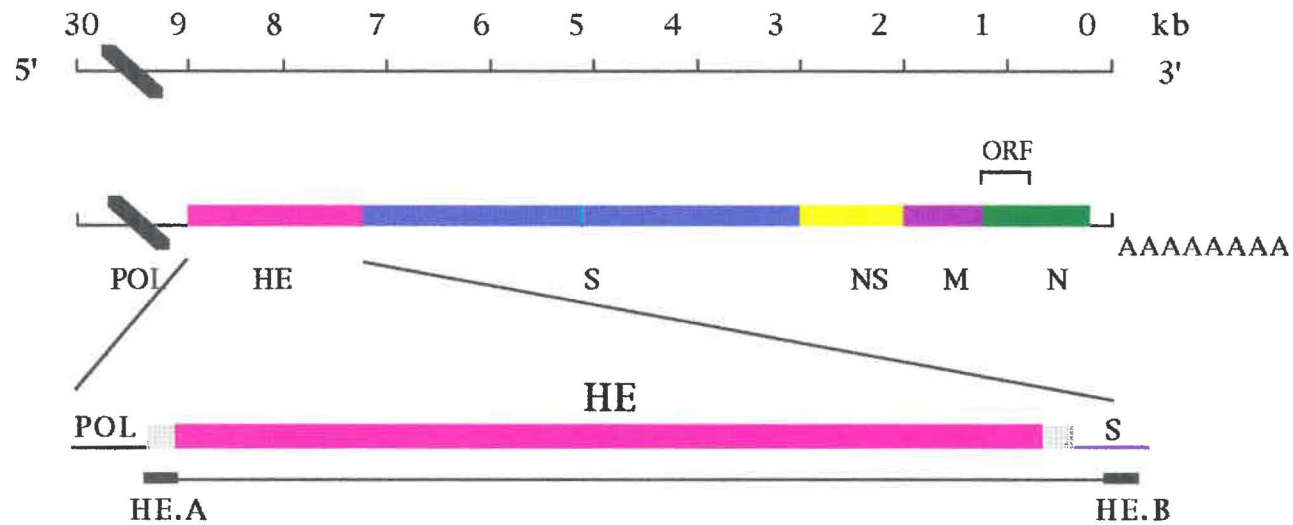
se situant entre les nucléotides -25 et -8 en amont du gène HE. L'amorce HE.B correspondait à une séquence "antisens" de la séquence nucléotidique de l'ARN génomique se situant en aval du gène HE entre les nucléotides 1500 et 1518 du gène S.

19.4 Réaction de transcription inverse

À environ 5 μ l de la préparation d'ARN génomique (environ 200ng d'ARN) étaient ajoutés 1 unité d'enzyme Taq DNA polymérase, 2 μ l de tampon 10X de l'enzyme (Bio-Can Scientific, Mississauga, Ont.), 20U de RNAGuard (Pharmacia), 1mM de chacun des dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP; Pharmacia) ainsi que 100 pmoles de l'amorce nucléotidique HE.B. Le volume du mélange réactionnel était complété à 20 μ l par l'ajout d'eau distillée préalablement traitée au DEPC. Par la suite, le mélange était chauffé à 94°C pendant 1 min., puis à 65°C pendant 5 min., pour être ensuite rapidement refroidi sur la glace. Après l'ajout de 20U de l'enzyme transcriptase inverse du virus Moloney de la leucémie murine (MuLV RT, Pharmacia), le mélange était incubé à 42°C pendant 60 min. afin de permettre la synthèse d'ADNc. Finalement, la température était élevée à 95°C pendant 5 min. afin d'inactiver l'enzyme. La préparation finale d'ADN était congelée à -70°C ou utilisée directement pour l'amplification par la réaction en chaîne de l'ADN polymérase.

FIGURE 5

Représentation schématique du génome du coronavirus bovin et localisation des amorces oligonucléotidiques utilisées pour l'amplification du gène HE codant pour la glycoprotéine de l'hémagglutinine.



Amorces oligonucléotidiques	% G+C	Longueur du produit amplifié
HE.A: 5'-TTT ATG AAT CTC CAG TTG-3'	33%	1.3 kb
HE.B: 5'-TTA ATC TCC TAT AAC AGC-3'	33%	1.3 kb

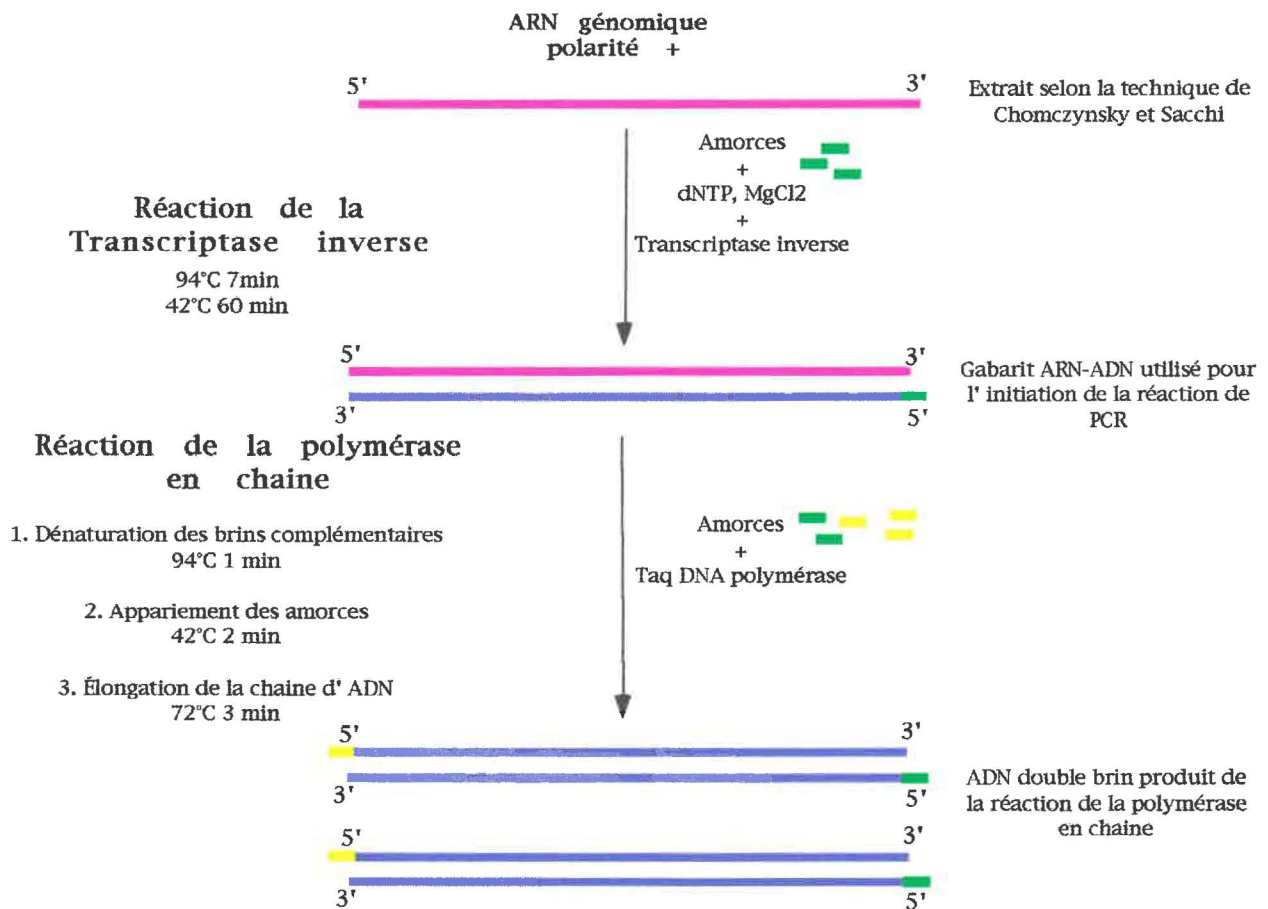
19.5 Réaction en chaine de la polymérase

La réaction d'amplification a été réalisée dans un volume final de 100 μ l. Au 20 μ l de la préparation d'ADNc, on ajoutait 80 μ l du mélange réactionnel de l'épreuve PCR. Le mélange PCR était constitué de: 8 μ l de tampon Taq DNA polymérase 10X, 1 μ M de chacune des amorces (HE.A et HE.B), 200 μ M de chacun des déoxyribonucléotides et 1mM de MgCl₂. À ce mélange, on ajoutait 2.5U de Taq DNA polymérase (Bio-Can). Après addition de 100 μ l d'huile minérale, les échantillons étaient soumis à 35 cycles de température comprenant chacun trois phases: une phase de dénaturation à 94°C pendant 1 min.; une phase d'appariement des amorces à 42°C pendant 2 min. et une phase d'élongation à 72°C pendant 3 min. Une fois les 35 cycles complétés, les échantillons étaient incubés 10 minutes à 74°C (Figure 6).

Après la réaction d'amplification, 5 à 10 μ l du produit final de chaque échantillon étaient analysés sur gels d'agarose 0.8% dans le tampon TBE (0.089M Tris-HCl à pH 8.3, 0.089M d'acide borique, 2mM EDTA). Après coloration des fragments au bromure d'éthidium (0.5 μ g/ml), le poids moléculaire ainsi que la concentration des fragments étaient déterminés par comparaison à la distance de migration de fragments d'ADN de poids moléculaire connu (Drygest II, Pharmacia).

Figure 6

Schéma de la technique de la réaction de la polymérase en chaîne utilisée pour l' amplification du gène HE des coronavirus hémagglutinants



20. STRATÉGIE DE CLONAGE

20.1 Technique de clonage

Les produits de PCR ont été directement insérés dans le vecteur de clonage PCR 2000 (TA cloning kit; Invitrogen Corporation) selon les directives du manufacturier. Le mélange de ligation a été utilisé pour transformer les cellules bactériennes *E.coli* JM101 compétentes (Invitrogen Corporation) toujours selon les directives du manufacturier (Figure 7).

20.2 Sélection des clones

Les bactéries recombinantes ont été sélectionnées selon leur résistance à la kanamycine (100µg/ml) ainsi que selon leur réactivité au substrat chromogène du gène de la β -galactosidase (X-Gal; 2%) en présence d'un inducteur (IPTG; 100mM).

Afin de vérifier la présence du gène HE à l'intérieur du plasmide recombinant, les bactéries choisies ont étéensemencées dans 2 ml de milieu Luria Betrani (LB) en présence de 100µg/ml de kanamycine. Les mélanges ont été incubés pendant 16 heures à 37°C. Par la suite, 1 µl de bouillon de culture a été utilisé pour réaliser la technique

PCR tel que décrit précédemment. Les différents échantillons ont été analysés sur gels d'agarose. Les échantillons permettant l'amplification, à l'aide des amorces HE.A et HE.B, d'un fragment correspondant au poids moléculaire du gène HE ont été identifiés comme positif, c'est-à-dire contenant des bactéries transformées par un plasmide vecteur contenant le gène HE. Par la suite, les bactéries recombinantes ont été récupérées par centrifugation et mélangées dans un volume égal de glycérol (1:1) afin d'être conservées à -20°C.

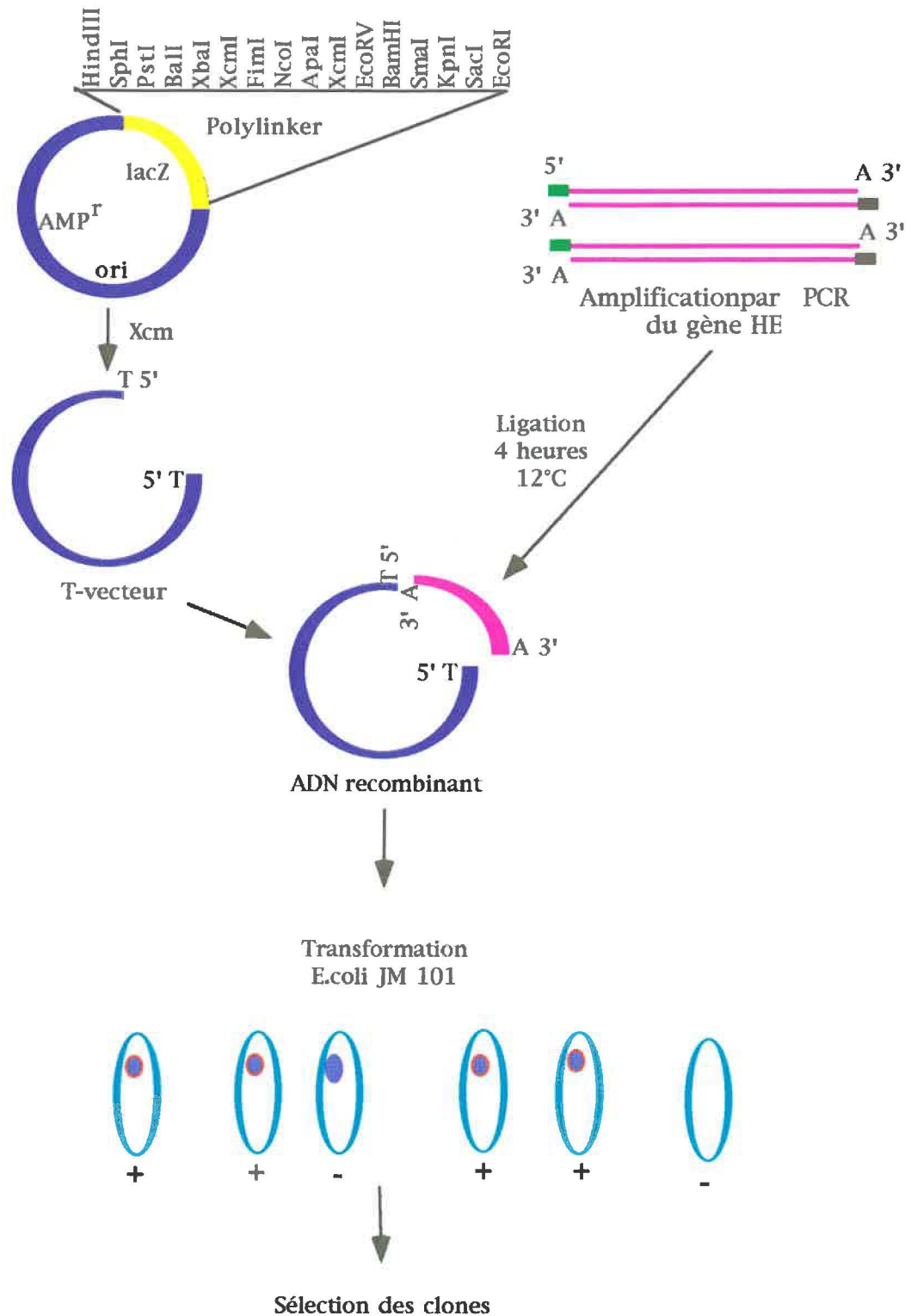
Des témoins positifs et négatifs ont été utilisés lors des étapes de clonage et d'amplification des clones par la technique PCR.

20.3 Préparation des clones pour le séquençage

Après avoir été ensemencées dans 2 ml de milieu LB, à pH 7.5, en présence de 50 µg/ml de tétracycline, les bactéries recombinantes ont été incubées à 37°C pour une période d'au moins 16 heures sous agitation vigoureuse (250 rpm). Par la suite, les plasmides chimères ont été purifiés à l'aide du système "Magic Minipreps DNA Purification System" (Promega Corporation, Madison, É-U) selon les instructions du manufacturier.

Figure 7

Stratégie de clonage utilisée en vue du séquençage du gène HE



La concentration d'ADN plasmidique récolté était mesurée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 250nm tandis que la pureté était vérifiée par migration sur gel d'agarose (0.8%). La présence de l'insert à l'intérieur du plasmide était confirmée par la technique PCR en utilisant les amorces HE.A et HE.B.

21. SÉQUENÇAGE

Le séquençage a été effectué par le personnel du laboratoire de séquençage de l'Institut Armand-Frappier. Les fragments clonés ont été séquençés par la méthode de Sanger basée sur l'arrêt de la synthèse de la double chaîne d'ADN suite à l'incorporation de résidus didéoxynucléotides-triphosphate (Sanger et al., 1977). La trousse "T7 sequencing" de Pharmacia a été utilisée selon les directives du manufacturier. Les différentes amorces internes utilisées pour le séquençage sont répertoriées à la figure 8.

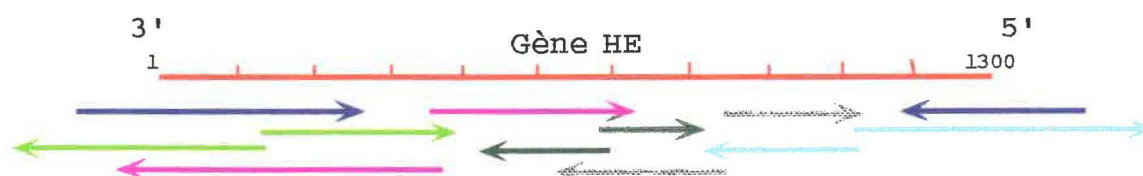
22. HYBRIDATION MOLÉCULAIRE

22.1 Préparation des sondes moléculaires

Les sondes moléculaires ont été préparées à partir de plasmides recombinants contenant le gène codant pour la glycoprotéine HE. Les plasmides recombinants ont été purifiés

FIGURE 8

Localisation des amorces utilisées lors du séquençage des différents coronavirus.



Amorce	Séquence nucléotidique	Direction	Position ^a
S202	GCCCTGTGTGATTCTGGTAAAA	→	202
S202RC	TTTTACCAGAATCACACAGGGC	←	202
S418	AAGAATATGGCTGTGTATCG	→	418
S418RC	CGATACACAGCCATATTCTT	←	418
S609	CGAGTATATCGTACCACTTTGT	→	609
S609RC	ACAAAGTGGTACGATATACTCG	←	609
S881	TTGATTACGGTGGAAACAATGC	→	881
S881RC	GCATTGTTCCACCGTGAATCAA	←	881
S1083	TGATAATGTTAGCAGTGTCTGG	→	1083
S1083RC	CCAGACACTGCTAACATTATCA	←	1083
	amorces universelles pour le séquençage	→ ←	

a: La position des nucléotides composant les amorces correspond soit à l'extrémité 5' pour les amorces sens ou à l'extrémité 3' pour les amorces antisens.

tel que décrit précédemment au point 20.3. Après la purification, l'ADN recombinant était linéarisée à l'aide de l'enzyme de restriction *Hind* III. Brièvement, l'ADN plasmidique (1µg) était mélangé en présence de 10U de l'enzyme de restriction, dans un volume final de 25µl complété par le tampon de réaction "One-Phor-All 1X" (Pharmacia). Le mélange réactionnel était par la suite incubé de 1 à 2 heures à 37°C. La réaction était arrêtée par l'addition d' EDTA 10mM, à pH 7.4. Afin d'éliminer l'enzyme, l'ADN plasmidique était précipité 1 heure à -20°C par l'ajout d'un volume égal d'isopropanol. Après centrifugation à 10000 x g pendant 30 min., le culot était lavé à l'éthanol 75% puis séché sous vide pour être finalement resuspendu dans 10µl d'eau distillée.

22.2 Marquage des sondes

Après la purification, tout juste avant l'étape de marquage, l'ADN plasmidique était dénaturé à 95°C pour 10 minutes, pour être ensuite placé sur la glace pour quelques minutes.

22.2.1 Marquage radioactif

Le marquage radioactif des clones purifiés a été réalisé à l'aide de la trousse de marquage moléculaire

"Oligolabelling Kit" (Pharmacia Biotech Inc., Baie d' Urfé, P.Q., Can.) en présence de dCTP marqué au phosphore³² (ICN; [α -³²P]dCTP) selon les recommandations du manufacturier. Après l'étape de marquage, l'élimination des nucléotides libres, ainsi que le calcul de la radioactivité spécifique des sondes, ont été effectués tel que décrit par Verbeek et al. (1991). En moyenne, la radioactivité spécifique variait de 10^8 à 10^9 dpm/ μ g d'ADN.

22.2.2 Marquage non-radioactif

Le marquage non-radioactif des clones purifiés a été réalisé à l'aide de la trousse de marquage moléculaire "DIG nucleic acid labeling and detection" (Boehringer Mannheim) en présence de digoxygénine-11-dUTP, selon les instructions du manufacturier.

22.3 Préparation des échantillons

Les échantillons viraux provenaient soit de surnageant cellulaires (BCV, HEV, TCV, HCV-OC43, BIV, MHV-3, TGEV), de liquides amniotiques (IBV) ou d'échantillons cliniques (BCV). Tous les échantillons, étaient préalablement traités au fréon (1,1,2-trichloro trifluoroéthane) avant leur application sur membrane de nylon.

22.4 Adsorption des échantillons viraux sur membrane de nylon par microfiltration (SlotBlot)

Des aliquots de 100µl d'échantillons viraux étaient appliqués sur une membrane de nylon de porosité de 0.20µm préalablement équilibrée dans le tampon SSC 6X (1X SSC: 0,15M NaCl, 0,015M citrate de sodium, pH 7,0) à l'aide de l'appareil Minifold 72 puits (Schleicher and Schuell, Inc.). La fixation de l'ARN viral sur la membrane de nylon a été réalisée par chauffage de la membrane sous-vide, durant 2 heures à 80°C. Après l'étape de la fixation, la membrane pouvait être conservée à la température de la pièce jusqu'à son utilisation.

22.5 Réaction d'hybridation

Suite à la fixation, la membrane a été réhydratée dans le tampon SSC 5X, puis préhybridée 16 heures à 42°C dans une solution de préhybridation consistant en une solution de 5X SSC additionnée de 0,5% (p/v) de caséine modifiée, de 0,1% de N-lauroylsarcosine (Sarcosyl), de 0,02% (p/v) de SDS et 50% (v/v) de formamide (Fisher Scientific). Par la suite, la solution de préhybridation était vidangée et remplacée par la solution d'hybridation consistant essentiellement en la solution de préhybridation additionnée de la sonde moléculaire à raison de 100 à 500ng de sonde/ml et ce autant pour la

sonde radioactive que pour la sonde non-radioactive. Le mélange d'hybridation était incubé de 16 à 24 heures à 42°C. La membrane était ensuite lavée suivant les procédures standards décrites par Maniatis (Maniatis et al., 1982) lors d'hybridation avec une sonde radioactive tandis que lors d'hybridation avec une sonde non-radioactive, la membrane était lavée selon les procédures standards de la trousse de marquage moléculaire "DIG nucleic acid labeling and detection" (Boehringer Mannheim).

22.6 Détection des signaux d'hybridation

22.6.1 Détection radioactive

La mise en évidence de réactions positives lorsque détectées par la sonde radioactive, était effectué par autoradiographie tel que décrit par Maniatis (Maniatis et al., 1982)

22.6.2 Détection Immunologique

La mise en évidence de réactions positives lorsque détectées par la sonde non-radioactive, était effectuée par analyse colorimétrique, tel que décrit dans les procédures de la trousse de marquage moléculaire "DIG nucleic acid labeling and detection kit" (Boehringer Mannheim).

RÉSULTATS

1. IDENTIFICATION DES ISOLATS DE CORONAVIRUS BOVIN

La présence de coronavirus bovin dans les échantillons fécaux, provenant soit de cas de dysenterie d'hiver (WD) ou de cas de diarrhée néonatale du veau (BCQ), a été confirmée à l'aide des techniques de microscopie électronique à imprégnation négative et d'ELISA indirecte. La technique d'immuno-électro-microscopie utilisant le sérum hyperimmun produit contre la souche Mebus du coronavirus bovin, et un mélange de protéine-A liée à l'or colloïdal, a permis de reconfirmer l'identification du virus (Tableau II).

2. ÉTUDE DE LA CROISSANCE VIRALE

Dans un premier temps, nous avons vérifié la capacité des isolats de coronavirus bovin ainsi que des différentes souches de coronavirus hémagglutinants, incluant la souche Minnesota du coronavirus de la dinde (TCV), la souche HCV-OC43 du coronavirus respiratoire humain et la souche HEV-67N du coronavirus hémagglutinant de l'encéphalomyélite porcine d'induire des changements dégénératifs, sur les feuillettes cellulaires HRT-18 (Figure 8). Les coronavirus hémagglutinants, à l'exception de la souche Mebus du coronavirus bovin, n'ont été propagés pour pas plus de 5 passages sur les cellules HRT-18. Sous des conditions similaires et en présence de 10U/ml de

TABLEAU II

CARACTÉRISTIQUES BIOLOGIQUES ET SÉROLOGIQUES D' ISOLATS QUÉBÉCOIS DE CORONAVIRUS BOVIN COMPARATIVEMENT À D'AUTRES ISOLATS DE CORONAVIRUS HÉMAGGLUTINANTS

- ^aCPE: Type d' effet cytopathique (voir tableau III).
- ^bInfectivité: Les titres infectieux ont été évalués à l'aide de la technique d' immunoperoxidase et calculés comme la valeur du $\log_{10}$ de la DECP₅₀/0.1 ml de surnageant clarifié.
- ^cHA: Les titres HA ont été obtenus à partir des surnageants clarifiés des cultures HRT-18 infectées. Ces titres correspondaient à la moyenne de quatre tests différents.
- ^dIHA: Les titres correspondent à la réciproque de la plus haute dilution d' antisérum polyclonal inhibant 4 unités HA.
- ^eSN: Les titres correspondent à la réciproque de la plus haute dilution d' antisérum polyclonal neutralisant 400 DEPC₅₀ de virus.
- ND: Non-déterminé.

TABLEAU II

CARACTÉRISTIQUES BIOLOGIQUES ET SÉROLOGIQUES D'ISOLATS QUÉBÉCOIS
DE CORONAVIRUS BOVIN COMPARATIVEMENT À D'AUTRES ISOLATS DE
CORONAVIRUS HÉMAGGLUTINANTS.

ISOLATS	PROPAGATION SUR HRT-18			TITRE HAC		HAId	SN ^e
	PASSAGES CPE ^a	INFECTIVITÉ ^b		37°C	4°C		
BCV VR874	7	A	6.5-7.5	1280	1280	1280-2560	1280
BCQ.3	3	B	5.3-7.5	640	640	1280-2560	1280
BCQ.7	3	A	4.7-6.2	64-128	ND	ND	ND
BCQ.9	3	B	4.7-6.6	320	320	1280	2560
BCQ.20	4	A	6.5-7.0	320	320	40	1280
BCQ89.143	4	B	6.6	128-256	ND	160-320	ND
BCQ89.571	3	C	4.2-6.2	320	320	80	2560
BCQ89.189	3	A	5.2-7.0	128-256	ND	640-1280	1280
BCQ.1750	4	A	6.5	64-128	ND	160	ND
BCQ.2070	4	C	5.75	160	160	1280	2560
WD.2439	3	C	8.16	40	320	80	2560
WD.7373	3	C	7.00	80	1280	160	2560
WD.2508	3	C	6.50	80	80-160	80	1280
WD.2590	3	C	6.42	<20	640	80	2560
HCV OC43	3	A	5.7-6.5	2048-4096	ND	<20	80
HEV 67N	4	C	6.2-6.5	512-1020	ND	<20	<20
TCV MINN	5	B	6.5-7.0	512-1024	ND	640	2571

trypsine pancréatique bovine, les titres infectieux des virus, tel que déterminé par immunofluorescence indirecte ou par immunoperoxydase indirecte, variaient de 1×10^5 à 1×10^7 DEPC₅₀/ml entre les 3ième et 5ième passages (Michaud & Dea., 1993).

2.1 Cytopathogénicité sur cellules HRT-18

Pour tous les isolats de BCV étudiés, un effet cytopathique (ECP) a pu être démontré à partir du troisième passage sur les cellules HRT-18. La présence de 10U/ml de trypsine pancréatique bovine s'avéra cependant indispensable à l'apparition d'ECP. Sur la base des changements dégénératifs observés, les coronavirus hémagglutinants étudiés ont été répartis en trois groupes différents (Tableaux II et III).

Les coronavirus appartenant au groupe A se sont avérés faiblement fusogéniques. Vingt-quatre heures post-infection (pi) le feuillet cellulaire nous apparaissait intact. Ce n'est qu'à partir de 96h pi qu'il était possible de remarquer la présence de très petits syncytia, ne contenant pas plus de 10 noyaux, mais toujours sans destruction du feuillet cellulaire. Les souches Mebus du coronavirus bovin et HCV-OC43 du coronavirus respiratoire humain produisaient ce type d'ECP (Figure 9 a et b; Tableau III).

TABEAU III

**CARACTÉRISTIQUES DES EFFETS CYTOPATHIQUES
PROVOQUÉS PAR DES ISOLATS DE CORONAVIRUS BOVINS
COMPARATIVEMENT À D'AUTRES CORONAVIRUS
HÉMAGGLUTINANTS.**

ECP	TEMPS POST-INFECTION	CARACTÉRISTIQUES MORPHOLOGIQUES	ISOLATS
TYPE A	24 H. pi:	Petits syncytia. Aucune destruction du feuillet cellulaire.	BCV VR874 BCQ.6,BCQ.718 BCQ.7,BCQ.1750 BCQ.12 BCQ.417 BCQ.14,BCQ.17
	96 H. pi:	Petits syncytia Aucune destruction du feuillet cellulaire.	BCQ.19 BCQ.20 BCQ.189 HCV-OC43
TYPE B	24 H. pi:	Destruction intensive du feuillet cellulaire	BCQ.4,BCQ.3 BCQ.9,BCQ.15 BCQ.16 BCQ.28 BCQ.143 TCV.MINN.
	96 H. pi:	Destruction totale du feuillet cellulaire.	
TYPE C	24 H. pi:	Syncytia nombreux. Destruction partielle du feuillet.	BCQ.2070 BCQ.571 WD2439,WD2508 WD2442,WD2590
	96 H. pi:	Syncytia très larges Destruction massive du feuillet cellulaire.	

FIGURE 9

EFFET CYTOPATHIQUE INDUIT PAR DES ISOLATS DE CORONAVIRUS HÉMAGGLUTINANTS SUR LES CELLULES HRT-18, À 37°C, EN PRÉSENCE DE TRYPSINE

Infection des feuillets cellulaires HRT-18 par différents isolats québécois de coronavirus ou par des souches hétérologues de coronavirus hémagglutinants en présence de 10U/ml de trypsine pancréatique bovine. La quantité de virusensemencée correspondait à une multiplicité d'infection (MOI) de 0.01 DECP₅₀ par cellule. Les virus ont été ensemencés sur un feuillet cellulaire confluent à 80%.

A et B) Effet cytopathique de type A, 24 et 96 h pi

C et D) Effet cytopathique de type B, 24 et 96 h pi

E et F) Effet cytopathique de type C, 24 et 96 h pi

Après fixation au méthanol, les feuillets cellulaires ont été traités selon la technique d'immunoperoxydase afin de mieux visualiser les différents types d'ECP au microscope à inversion. L'antisérum dirigé contre la souche ATCC-VR874 fut utilisé.

FIGURE 9

A



B

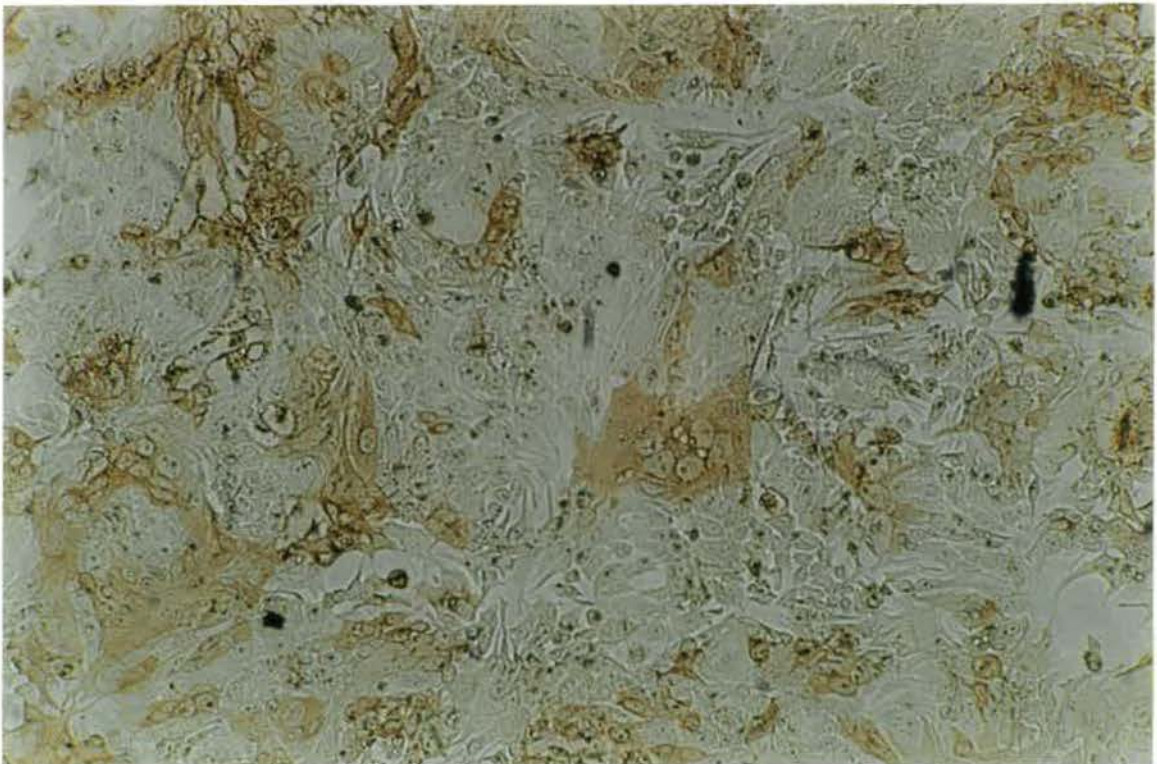
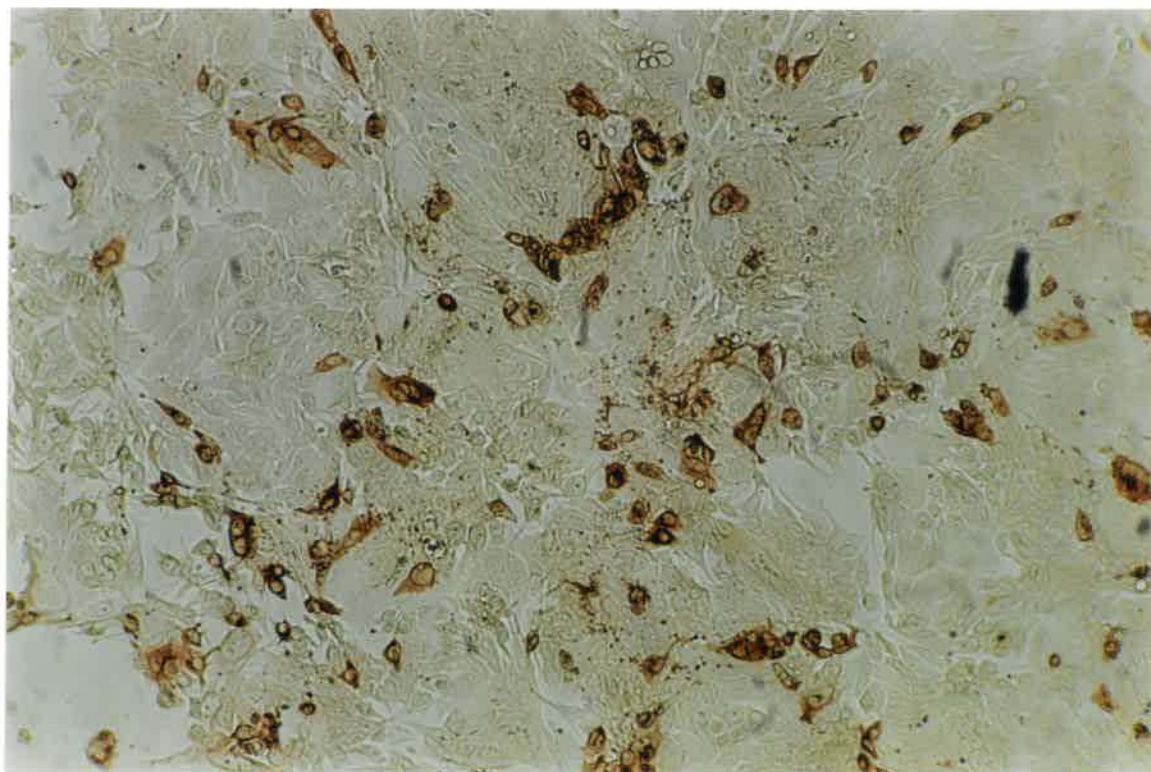


FIGURE 9

C



D

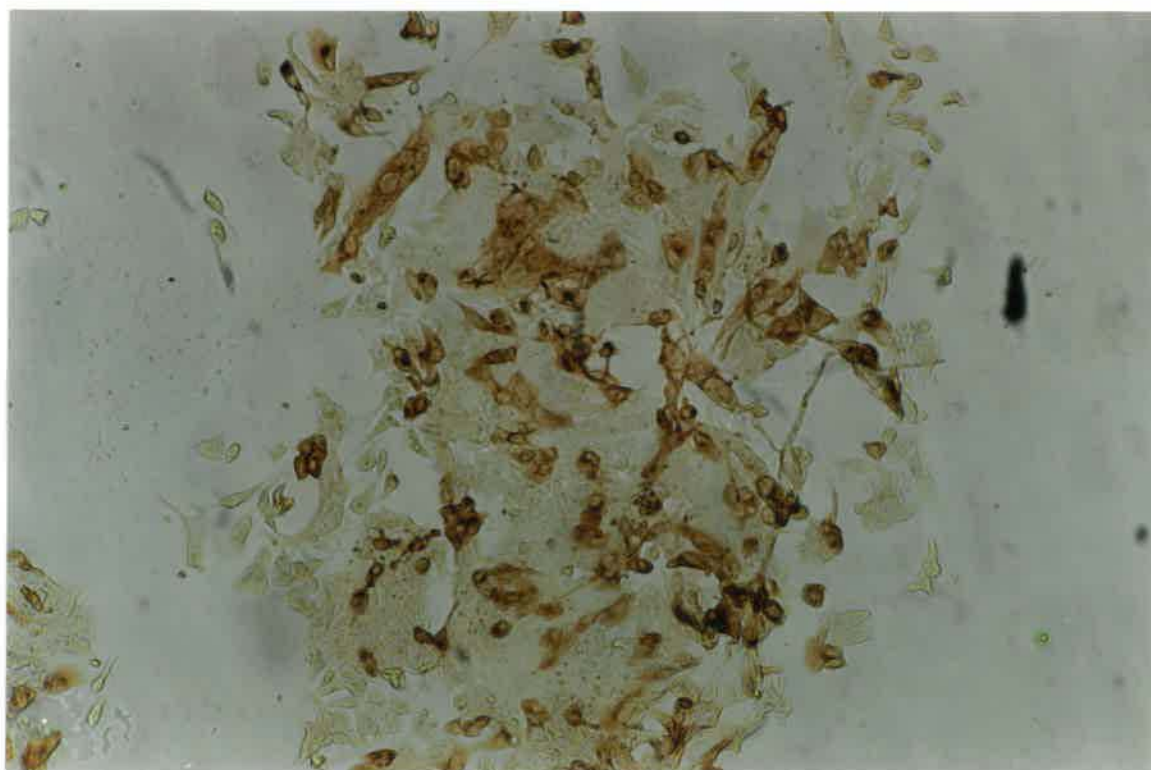
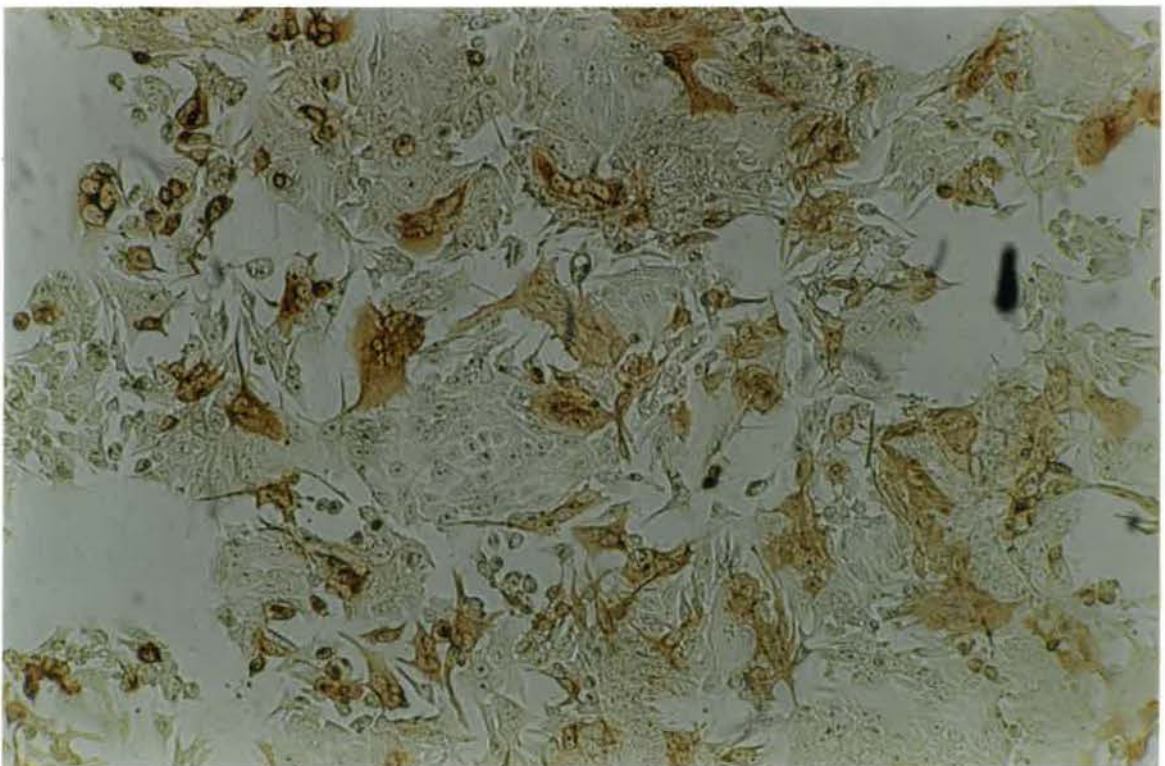


FIGURE 9

E



F



Les coronavirus appartenant au groupe B, contrairement à ceux des groupes A et C, n'induisaient pas la production de syncytia. Ces derniers s'avéraient plutôt hautement cytolytiques. Vingt-quatre heures post-infection (pi), il nous était possible d'observer une destruction intensive du feuillet cellulaire. La destruction complète du feuillet cellulaire survenait habituellement entre 72 et 96h post-infection (Figure 9c et d; Tableau III).

Les coronavirus appartenant au groupe C se sont avérés hautement fusogéniques. Vingt-quatre heures post-infection (pi) on pouvait observer, avec ces isolats, l'apparition de nombreux syncytia. Quatre jours plus tard (96h pi), les syncytia avaient augmenté en nombre et en grosseur (jusqu'à 40 noyaux) et la destruction du feuillet cellulaire devenait plus évidente. Les isolats de coronavirus provenant de cas de dysenterie d'hiver (WD), ainsi que la souche HEV 67N du coronavirus hémagglutinant de l'encéphalomyélite porcine, induisaient ce type d'ECP (Figure 9e et f; Tableau III).

Pour chacun des isolats, les analyses de cytopathogénicité ont été répétées au moins à trois reprises. Les conditions expérimentales ont toujours été les mêmes au cours des différents essais. La quantité de virus ensemencée correspondait à une multiplicité d'infection (MOI) d'environ 0.01 DECP₅₀ par cellule. L'utilisation de la technique

d'immunoperoxydase indirecte nous a permis de mieux visualiser les différents changements dégénératifs (Figure 9).

3. ÉTUDE DES ACTIVITÉS BIOLOGIQUES ET ENZYMATIQUES ASSOCIÉES À LA GLYCOPROTÉINE DE L'HÉMAGGLUTININE

Dans un premier temps, nous avons vérifié pour tous les isolats de coronavirus bovin, ainsi que pour les souches hétérologues de coronavirus hémagglutinants, la présence des principales activités associées à la glycoprotéine de l'hémagglutinine soient: l'activité d'hémagglutination (HA), l'activité acétyl-estérase (AE) et l'activité enzyme destructrice de récepteurs (RDE). Dans un deuxième temps, nous avons comparé entre elles les valeurs obtenues pour les différents virus étudiés.

3.1 Activité hémagglutinante à différentes température d'incubation

Les titres hémagglutinants, déterminés avec une solution d'érythrocytes de rats (0.4%), des isolats de coronavirus bovin provenant de cas de diarrhée néonatale du veau (BCQ) et ceux provenant de cas de dysenterie d'hiver (WD) étaient similaires à 4°C. Ceux-ci variaient de 80 à

1280. À 37°C, une différence dans l'activité hémagglutinante des souches associées aux deux types d'entités pathologiques fut notée. En effet, tandis que les titres hémagglutinants des isolats provenant de cas de diarrhée néonatale du veau ne subissaient à peu près aucune variation, les titres hémagglutinants des isolats provenant de cas de dysenterie d'hiver chutaient dramatiquement. Ceux-ci variaient de <20 à 80, une baisse très importante comparativement aux titres notés à 4°C. Comparativement, l'activité hémagglutinante des coronavirus d'autres espèces, soient HCV-OC43, HEV et TCV, n'était pas influencée par la température d'incubation. Pour tous les isolats de coronavirus hémagglutinants étudiés, les épreuves d'hémagglutination avec des érythrocytes de poulet ne donnaient que des titres HA très faibles autant à 4°C qu'à 37°C (Tableau II).

Les titres hémagglutinants ont été évalués selon la réciproque de la plus grande dilution de virus provoquant l'agglutination complète d'érythrocytes après une heure d'incubation à 4°C ou à 37°C. Pour chaque isolat, les tests d'hémagglutination ont été effectués à au moins quatre reprises. Les titres infectieux des isolats utilisés variaient de $10^{4.2}$ à $10^{8.16}$ DEPC₅₀/ml.

3.2 Activité Acétyl-Estérase

L'activité acétyl-estérase a tout récemment été associée à la glycoprotéine HE (Zhang *et al.*, 1992; Parker *et al.*, 1989a; Vlasak *et al.*, 1988). Cette activité enzymatique est responsable de l'inactivation des récepteurs utilisés par les coronavirus hémagglutinants situés à la surface des cellules susceptibles. En fait, elle permet l'hydrolyse d'un lien ester provoquant le relâchement de résidus acétate à partir de l'acide sialique retrouvé à la surface des cellules-cibles. L'activité acétyl-estérase a été évaluée selon la technique décrite par Vlasak *et al.* en 1988. Une solution de 1mM de p-nitrophényl acétate (PNPA) a été utilisée comme substrat pour l'enzyme acétyl-estérase. Dans cette épreuve, le relâchement d'acétate à partir du substrat, se traduit par une augmentation de la densité optique (DO), à 405nm, de la solution. Selon les valeurs obtenues, les isolats BCQ.3 (0.492) et WD.2590 (0.764) possédaient l'activité acétyl-estérase la plus faible, tandis que les isolats BCQ.189 (3.388) et WD.2439 (3.293) possédaient l'activité acétyl-estérase la plus forte (Tableau IV).

L'activité acétyl-estérase a été évaluée pour des isolats possédant des titres infectieux se situant entre $10^{7.2}$ et $10^{9.4}$ DECP₅₀/ml. On ne pouvait cependant pas établir de

TABLEAU IV

**DIFFÉRENCIATION DES ISOLATS DE CORONAVIRUS BOVIN SELON LEUR ACTIVITÉ
HÉMAGGLUTINANTE AINSI QUE LEURS ACTIVITÉS ENZYMATIQUES ACÉTYL
ESTÉrase (AE) ET ENZYME DESTRUCTRICE DE RÉCEPTEURS (RDE).**

ISOLATS ^a	TITRE INFECTIEUX (LOG ₁₀ DEPC ₅₀ /50μl)	ACÉTYL ESTÉrase ^b /15μl	HÉMAGGLUTINATION ^c		TITRE RDE ^d	
			RAT	POULET	RAT	POULET
BCV.VR874	9.4	3.155	16384	128	2	8
BCQ.20	7.90	1.877	4096	<16	<2	32
BCQ.571	7.50	1.782	8192	<16	<2	2
BCQ.2070	7.70	3.210	4096	<16	<2	8
BCQ.189	8.90	3.388	8192	NT	<2	64
BCQ.9	9.70	1.826	8192	32	<2	16
BCQ.3	8.40	0.492	4096	<16	<2	32
WD2439	7.20	3.292	8192	64	6	16
WD7373	8.7	2.151	4096	64	256	64
WD2508	8.70	3.089	8192	32	64	4
WD2590	9.4	0.764	4096	<16	128	64

a:Les souches sauvages de BCV n' ont été propagées pour pas plus de 5 fois sur les cellules HRT-18, en présence de trypsine pancréatique bovine.

b:Densité optique à 405 nm après une incubation de 5 minutes en présence d'une solution de 1 mM de p-nitrophényl acétate.

c:Réciproque de la plus haute dilution produisant l'agglutination complète d'érythrocytes de rat ou de poulet après une incubation d'une heure à 4°C.

d:Réciproque de la plus haute dilution produisant une désaggrégation complète des complexes érythrocyte-BCV après 1 heure à 37°C (activité HA résiduel).

corrélation entre le titre infectieux et l'activité acétyl-estérase. Tout comme les épreuves d'héماغglutination, les épreuves d'acétyl-estérase ont été effectuées à au moins quatre reprises.

3.3 Activité enzyme destructrice de récepteurs

L'activité destructrice de récepteurs (RDE) a été évaluée selon la technique décrite par Storz et al. en 1991. Après avoir déterminé les titres HA à 4°C, une incubation subséquente d'une heure à 37°C permettait d'évaluer l'effet de l'enzyme acétyl-estérase sur l'inactivation des récepteurs, reflétée par la destruction des complexes BCV-érythrocytes. La destruction des récepteurs conduisaient à l'élution des virus et la sédimentation normale des globules rouges dans le fond des puits.

Tout comme il a été démontré précédemment, les titres à 4°C étaient similaires pour les souches provenant de cas de diarrhée néonatale (BCQ) et de dysenterie d'hiver (WD). À 37°C cependant, il y avait une perte de l'activité héماغglutinante des souches associées à la dysenterie d'hiver. Les isolats WD.2439, WD.2508 ainsi que WD.2590 possédaient une activité RDE supérieure, ce qui traduisait une activité acétyl-estérase plus effective que celle des souches associées à la diarrhée néonatale (Tableau IV). Les

titres RDE ont été déterminés selon la réciproque de la plus grande dilution provoquant une désagrégation complète des complexes virus-érythrocytes.

4. ÉTUDE COMPARATIVE DES PROTÉINES STRUCTURALES

L'électrophorèse sur gels de polyacrylamide nous a permis d'identifier pour tous les isolats de coronavirus bovin, provenant soit de cas de diarrhée néonatale du veau ou de cas de dysenterie d'hiver, quatre polypeptides majeurs tel que décrit précédemment dans la littérature pour la souche de référence du coronavirus bovin (Deregt *et al.*, 1987; King *et al.*, 1985; Hogue *et al.*, 1984). En conditions non-réductrices, la glycoprotéine des péplomères (S, gp200/100), la glycoprotéine de l'hémagglutinine (HE, gp140), la protéine de la nucléocapside (N, p52), ainsi que la glycoprotéine de la matrice (M, gp24/p20), ont été identifiées. En conditions réductrices, la glycoprotéine de l'hémagglutinine HE a été réduit en deux polypeptides de 65K (Figure 13 et 14).

5. PROPRIÉTÉS DES ANTICORPS MONOCLONAUX (AcMo)

5.1 Propriétés biologiques des anticorps monoclonaux

La spécificité polypeptidique des liquides d'ascite ou des AcMo purifiés a été déterminée par immunobuvardage. Tout

d'abord, les quatre polypeptides majeurs décrit antérieurement pour le coronavirus bovin, ont été identifiés en utilisant un antiserum hyperimmun homologue à la souche prototype du BCV produit chez le lapin. Selon les mêmes conditions expérimentales, 14 hybridomes ont été identifiés comme produisant des anticorps reconnaissant la glycoprotéine S. Ces anticorps réagissaient envers la gp100 ou la gp200, ou envers les deux glycoprotéines. Un seul de ces hybridomes produisait des Ac dirigés contre la glycoprotéine HE. Quatre autres hybridomes réagissaient contre la protéine N tandis qu'un autre réagissait contre la glycoprotéine M. Les différents liquides d'ascite utilisés pour la récupération d'AcMo purifiés possédaient des titres ELISA variant de 2.9 à 6.2. Tous les AcMo obtenus, à l'exception de l'AcMo BC24, ont été classés à l'intérieur des sous-classes d'immunoglobuline IgG2A, IgG2B ou IgG1. L'AcMo BC24 appartenait à la famille des immunoglobulines de type M (IgM).

En plus d'être caractérisés selon leur spécificité polypeptidique, leur titre ELISA et leur isotypie, les AcMo obtenus de ces fusions, ont été étudiés selon leur capacité à neutraliser ou à inhiber l'activité hémagglutinante de la souche prototype du coronavirus bovin. Les épreuves de neutralisation révélèrent que 5 des anticorps monoclonaux (BCB1, BCF4, BCH1, BCB5 et BCA3) avaient une forte activité

TABLEAU V

**PROPRIÉTÉS DES ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGÉS
CONTRE LES PROTÉINES STRUCTURALES DE LA
SOUCHE MEBUS DU CORONAVIRUS BOVIN.**

Clone no.	Ig ^a Isotype	Titre ^b ELISA	Titre ^c Neutralisant	Titre ^c HI	Spécificité ^d Polypeptidique
BC6	G2b	6.3	<20	<20	M
BCH5	G2a	2.9	<20	<20	S
BCB1	G2a	5.9	10240	<20	S
BCH6	G1	5.3	<20	<20	S
BCF4	G2a	5.9	10240	<20	S
BC16	G	5.9	<20	<20	N
BCH1	G2a	5.3	2560	<20	S
BC18	G1	5.3	<20	<20	S
BC24	M	6.2	<20	<20	S
BC25	G	6.2	<20	<20	N
BCB5	G2b	6.2	10240	<20	S
BC27	G2b	5.9	<20	<20	N
BC32	G2b	5.3	<20	1280	HE
BCA3	G1	5.6	10240	<20	S
BCH3	G2a	5.3	<20	<20	S
BCA1	G2a	5.3	<20	<20	S
BCA7	G2b	6.2	160	<20	S
BCA2	G1	5.3	320	<20	S
BCH8	G1	5.3	640	<20	S
BC314C	G2a	5.3	<20	<20	N

a: Isotype de l' immunoglobuline déterminé par ELISA

b: Log 10 de la plus haute dilution de liquide d' ascite donnant une valeur d' absorbance à 450 nm 2.5 fois supérieure à celle obtenue avec un témoin contrôle.

c: Log 10 de la plus haute dilution de liquide d' ascite neutralisant 100 DEPC 50 ou inhibant 4 unités hémagglutinantes de virus.

d: Réactivité des anticorps monoclonaux aux polypeptides viraux tel que révélée par immunobuvardage;
S:gp 200 ou gp 100; HE:gp 140; N:p 52; M:gp 26.

neutralisante (titre SN variant entre 1:2560 et 1:10240), tandis que 3 autres (BCA7, BCA2 et BCH8) avaient une activité neutralisante plus faible (titre SN variant entre 1:160 et 1:640). Tous ces anticorps monoclonaux ont été identifiés comme réagissant contre la glycoprotéine S (gp100) par immunobuvardage. Six autres AcMo (BCH5, BCH6, BC18, BC24, BCH3 et BCA1), aussi dirigés contre la glycoprotéine S, étaient dépourvus d'activité neutralisante. Ceux-ci réagissaient soit contre la gp100 ou la gp200. Aucun des AcMo dirigés contre les protéines structurales N ou M ne neutralisaient l'infectivité virale. L'AcMo BC32 qui réagissait contre la glycoprotéine HE (gp125-140) inhibait l'activité hémagglutinante de la souche prototype du coronavirus bovin, mais ne montrait aucun signe d'activité neutralisante (Tableau V).

Les épreuves de neutralisation et d'inhibition de l'hémagglutination ont été effectuées à au moins deux reprises en utilisant respectivement les mêmes conditions expérimentales.

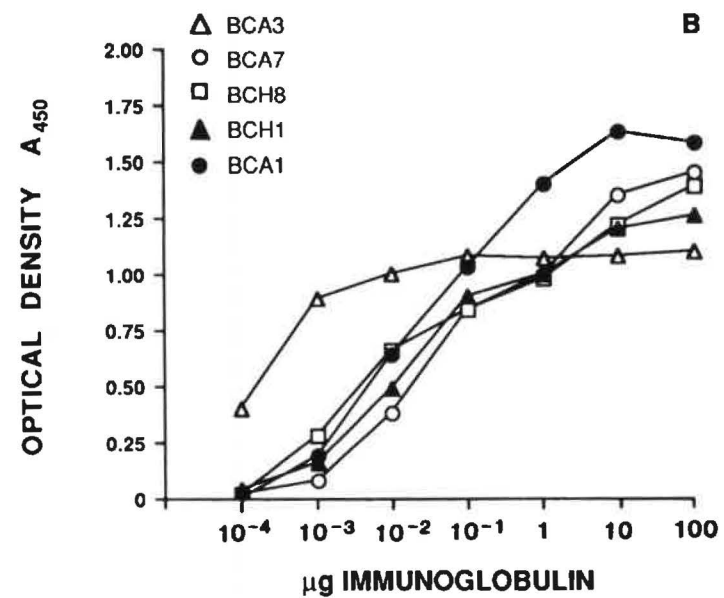
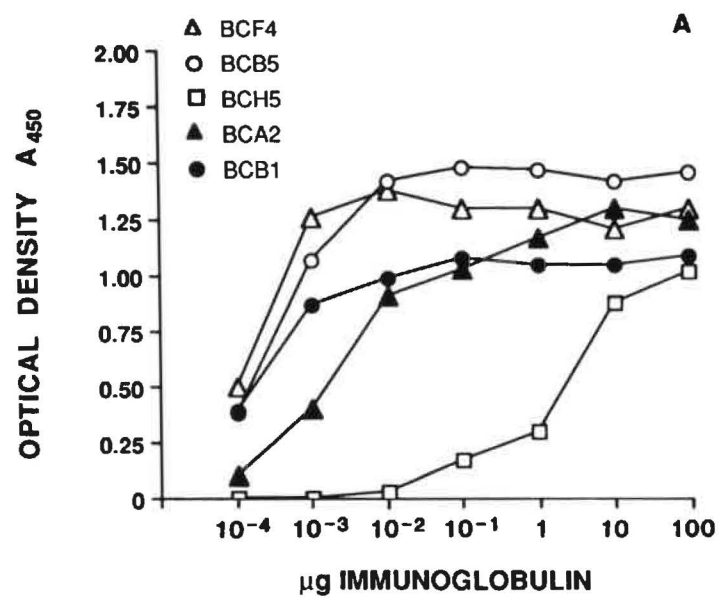
5.2 Courbes d'avidité

Une relation directe existe entre l'avidité et la quantité d'AcMo se liant à une quantité donnée d'antigènes viraux (Niesters et al., 1987a et b; Frankel et al., 1979).

FIGURE 10

AVIDITÉ COMPARATIVE DES ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGÉS CONTRE LA GLYCOPROTÉINE "S" DES PÉPLOMÈRES DU CORONAVIRUS BOVIN.

Des dilutions en série d' anticorps monoclonaux purifiés ont été incubées dans des microplateaux imprégnés d'antigènes viraux (0.5 µg de protéines/puits) préparés à partir de la souche Mebus du coronavirus bovin. Après une incubation à température de la pièce, la réaction immunologique fut détectée par l' addition d' anticorps anti IgG de souris liés à la peroxydase. L' absorbance a 474 nm a été utilisée pour évaluer le degré de liaison relative des anticorps monoclonaux aux antigènes viraux.



Le degré de liaison relative aux antigènes viraux (souche Mebus du coronavirus bovin) des AcMo dirigés contre la glycoprotéine S, a été évaluée à l'aide d'une épreuve d'ELISA indirecte.

Selon les résultats obtenus, à une absorbance de 450 nm, un plateau de saturation a été identifié entre les densités optiques 0.8 et 1.50. Pour les AcMo BCF4, BCB5, BCA2, BCB1 et BCA3, 0.01µg d'immunoglobulines provoquait la saturation de 0.5µg d'antigènes viraux (souche Mebus du coronavirus bovin). Les AcMo BCA7, BCH8, BCH1, BCA1 et BCH5 même à une concentration pouvant aller jusqu'à 100µg d'immunoglobulines par puits ne pouvait provoquer la saturation de 0.5µg d'antigène viraux (Figure 10A et 10B). Ces résultats suggéraient donc que les AcMo BCF4, BCB5, BCA2, BCB1 et BCA3 possédaient une plus grande avidité envers la glycoprotéine S que les AcMo BCA7, BCH8, BCH1, BCA1 et BCH5. En général, la biotinylation n'a pas affecté la capacité d'adsorption de l'AcMo aux sites antigéniques du virus.

6. TOPOGRAPHIE DES DÉTERMINANTS ANTIGÉNIQUES LOCALISÉS SUR LA GLYCOPROTÉINE DES PÉPLOMÈRES

Afin de différencier les AcMo reconnaissant des régions antigéniques distinctes au niveau de la glycoprotéine S du coronavirus bovin, une épreuve d'ELISA compétitive a été

réalisée suivant la méthode décrite par Deregt et Babiuk (1987).

Selon la réactivité des liquides d'ascite observée en présence d'un AcMo bloqueur de référence ayant été biotinylé, les AcMo dirigés contre la glycoprotéine S ont pu être séparés en quatre groupes différents appelés A,B,C et D (Tableau VI). Entre les membres de chaque groupe, la compétition s'est avérée généralement forte et réciproque (Figure 11). Selon les résultats de ces épreuves d'ELISA compétitive, une carte antigénique illustrant la topographie des principaux domaines se retrouvant sur la glycoprotéine S des péplomères a été réalisée (Figure 12). Les résultats obtenus suggèrent que les épitopes associés à l'activité neutralisante soient localisés au niveau des sites antigéniques A, B et C. Les domaines antigéniques A et B, associés à une forte activité neutralisante, étaient reconnus par les AcMo BCF4, BCB1 et BCH5, et les AcMo BCB5 et BCA3, respectivement. Les AcMo dirigés contre la glycoprotéine S ayant une activité neutralisante plus faible (BCA2 et BCH8) ou dépourvus d'activité neutralisante (BCA1 et BCH3) définissaient le domaine antigénique C. L'AcMo BCA7 ne pouvait être bloqué par les autres AcMo. Ceci suggérerait donc la présence d'un domaine distinct non-neutralisant. D'autres AcMo tels BCH5 ainsi que BCA1 et BCH3 qui étaient assignés

TABLEAU VI

RÉSULTATS DES TESTS D'ELISA COMPÉTITIVE ENTRE DIFFÉRENTS ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGÉS CONTRE LA GLYCOPROTÉINE DES PÉPLOMÈRES DE LA SOUCHE MEBUS DU CORONAVIRUS BOVIN

LÉGENDE :

Titres neutralisant: - = <20
 + = >20<320
 ++ = >640<5160
 +++ = >10240

% de compétition: - = <20%
 ++ = 25 à 50%
 ++++ = >75%

ND: Non Déterminé

-  Compétition entre AcMo du groupe A
-  Compétition entre AcMo du groupe B
-  Compétition entre AcMo du groupe C
-  Compétition entre AcMo du groupe D
-  Compétition partielle entre AcMo de
groupes différents

TABLEAU VI

RÉSULTATS DES TESTS D'ELISA COMPÉTITIVE ENTRE DIFFÉRENTS ANTICORPS
MONOCLONAUX DIRIGÉS CONTRE LA GLYCOPROTÉINE DES PÉPLOMÈRES DE LA
SOUCHE MEBUS DU CORONAVIRUS BOVIN

Anticorps Compétiteurs	Activité Neutralisante	Anticorps biotinylés								
		BCA2	BCH8	BCA1	BCH3	BCA3	BCB5	BCF4	BCB1	BCA7
BCA2	+	++++	++++	++++	++++	-	-	-	-	-
BCH8	+	++++	++++	++++	++++	-	-	-	-	-
BCA1	-	+++	++++	++++	+++	+	-	-	-	-
BCH3	-	+++	++++	+++	++++	+	-	-	-	-
BCA3	+++	-	-	-	ND	+++	+++	-	-	-
BCB5	+++	-	-	+	ND	+++	++++	-	-	-
BCH5	-	-	-	-	-	+	-	+++	+++	-
BCF4	+++	-	-	-	-	-	-	++++	++++	-
BCB1	+++	-	-	-	-	-	-	++++	++++	-
BCA7	-	-	-	-	ND	-	-	-	-	++++

Figure 11

TEST DE COMPÉTITION ENTRE LES DIFFÉRENTS ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGÉS CONTRE LA GLYCOPROTÉINE S DES PÉPLOMÈRES

Les tests de compétition ont été effectués à l'aide d'AcMo biotinylés dirigés contre la glycoprotéine S des péplomères de la souche Mebus du coronavirus bovin. Les microplateaux contenant l'antigène viral (0,5 µg de protéine/puits) ont tout d'abord été incubés en présence de dilutions sériées d'AcMo non conjugué (Ac compétiteur). Par la suite, les AcMo biotinylés ont été ajoutés, à des dilutions préalablement établies. Les niveaux de compétition ont été déterminés en fonction de l'absorbance à 474 nm.

LÉGENDE:

AcMo biotinylé:	a)	BCA3
	b)	BCB5
	c)	BCA2
	d)	BCA1
	e)	BCH3
	f)	BCB1
	g)	BCF4
	h)	BCH8
AcMo compétiteur:	◆	BCA3
	◇	BCA1
	▲	BCH5
	△	BCB5
	●	BCA2
	○	BCH8
	*	BCH3
	■	BCB1
	□	BCF4

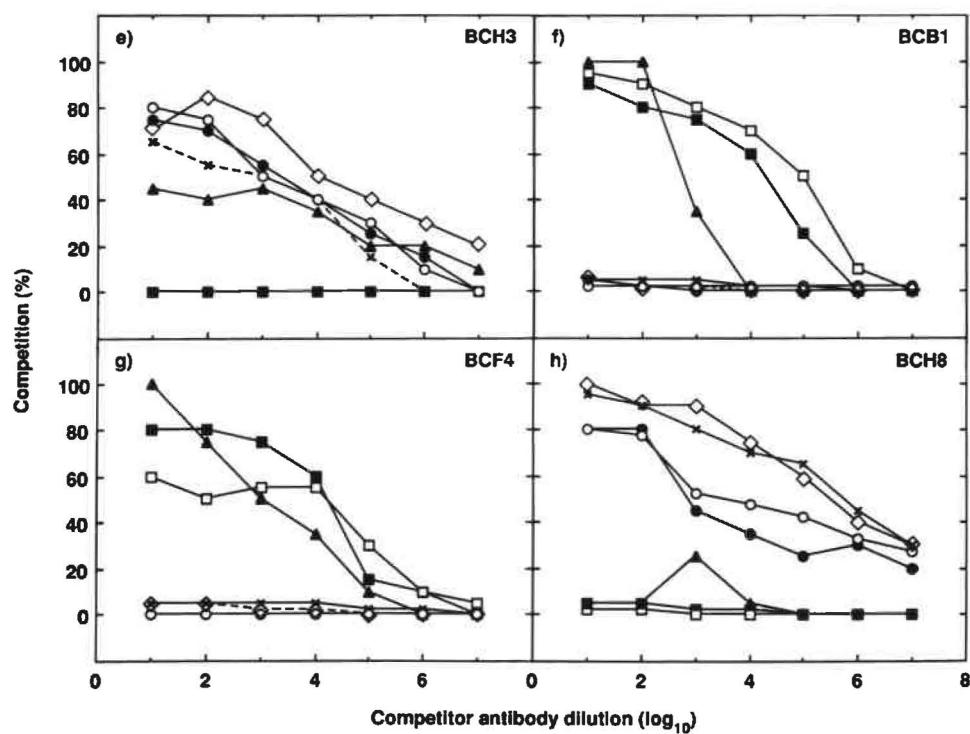
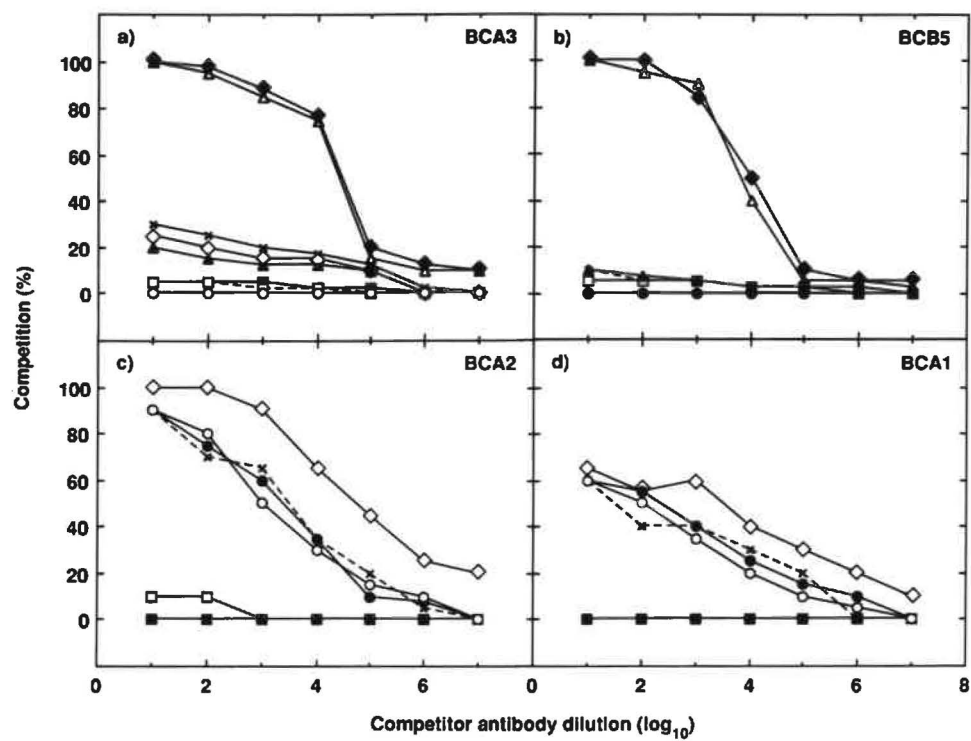
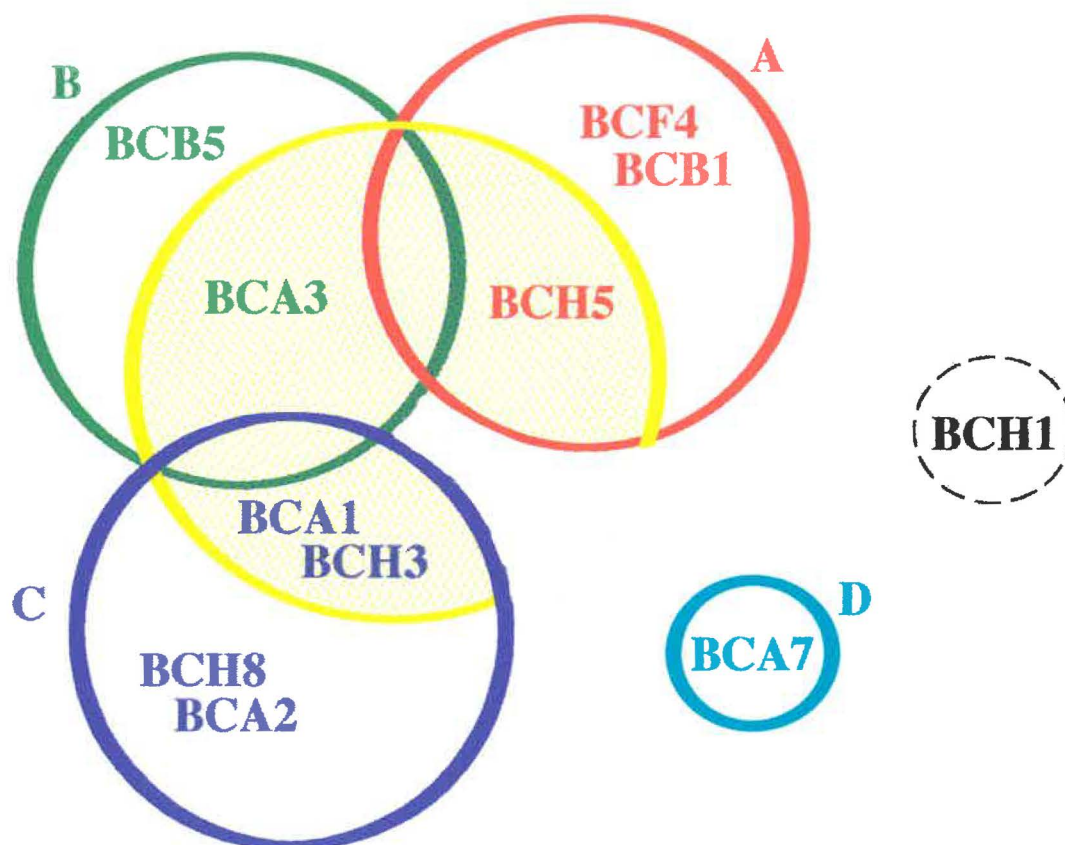


FIGURE 12

**TOPOGRAPHIE DES DOMAINES ANTIGÉNIQUES MAJEURS DE
LA GLYCOPROTÉINE S
DU BCV DÉDUITE SELON LES RÉSULTATS DES ÉPREUVES DE
COMPÉTITION.**



Les cercles A,B,C et D représentent les 4 domaines antigéniques définis par les AcMo dirigés contre la glycoprotéine S des coronavirus bovin. Les anticorps définissant chaque site sont indiqués à l'intérieur des cercles correspondant.

Les anticorps BCA1 et BCH3 appartenant au groupe antigénique C ainsi que l'anticorps BCH5 appartenant au groupe antigénique A réagissaient de façon partielle avec l'anticorps BCA3 appartenant au groupe B.

L'anticorps neutralisant BCH1 n'a pu être assigné à un groupe antigénique en particulier. Cependant, l'épitope neutralisant défini par cet anticorps a été identifié chez tous les isolats de coronavirus bovin étudiés. Pour cette raison, un site antigénique particulier lui a été assigné.

Les sites antigéniques identifiés sur la glycoprotéine S du BCV ont été désignés selon la nomenclature utilisée par Deregts *et al.*, 1982 ainsi que par Vautherot *et al.*, 1984.

aux domaines antigéniques A et C, montraient une compétition réciproque avec l'AcMo BCA3 assigné au domaine antigénique B. Ceci suggérait donc la présence de région antigénique se chevauchant à l'intérieur des domaines antigéniques majeurs responsables de l'activité neutralisante.

7. ÉTUDE DES RELATIONS ANTIGÉNIQUES CROISÉES

7.1 Épreuve de séroneutralisation

Les épreuves de séroneutralisation CONDUITES avec un antisérum polyclonal hyperimmun, produit chez le lapin et dirigé contre la souche Mebus du coronavirus bovin, n'ont pas permis de démontrer s'il existait des variations parmi les différents isolats québécois de coronavirus bovin. De même, cet antisérum ne permettait pas de différencier entre la souche Mebus du coronavirus bovin et le coronavirus entérique des dindes (Tableau VII). Lorsque les épreuves de séroneutralisation étaient réalisées soit avec un antisérum polyclonal dirigé contre la souche prototype du coronavirus de l'encéphalomyélite porcine ou bien contre la souche HCV-OC43 du coronavirus respiratoire humain, aucune réactivité croisée ne pouvaient être démontrée entre ces différents sera et les isolats de coronavirus bovin. De même, lorsque cette épreuve était réalisée avec un antisérum polyclonal dirigé contre la souche prototype du coronavirus de la dinde, il

TABLEAU VII

**RÉACTIVITÉ CROISÉE DES ANTICORPS POLYCLONAUX OU MONOCLONAUX DIRIGÉS
CONTRE LA SOUCHE MEBUS DU CORONAVIRUS BOVIN ENVERS DIFFÉRENTS ISOLATS
DE BCV AINSI QUE DES SOUCHES HÉTÉROLOGUES DE CORONAVIRUS
HÉMAGGLUTINANTS TELLE QUE DÉMONTRÉ PAR SÉRONEUTRALISATION**

ISOLAT VIRAL	ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-BCV					ANTISÉRUM POLYCLONAL ANTI-			
	V8	BCF4	V34	BCB5	BCA2	MEBUS	HEV	OC43	TCV
BCV MEBUS	1280	640	2560	1280	<8	5120	<40	160	2560
BCQ.3	<8	<8	<8	<8	<8	1280	ND	ND	ND
BCQ.9	<8	<8	<8	<8	<8	3200	ND	ND	ND
BCQ.20	1280	1280	1280	640	<8	2560	<40	80	ND
BCQ.571	<8	<8	<8	<8	<8	3200	ND	ND	ND
HCV OC43	<8	<8	<8	<8	<8	80	<40	80	ND
HEV	<8	<8	<8	<8	<8	<20	6400	160	ND
TCV MINNESSOTA	ND	ND	ND	ND	<8	2560	<20	<20	2560
TCV.1713	ND	ND	ND	ND	<8	2560	<20	<20	2560

Titres SN: Réciproque de la plus haute dilution de liquide d'ascite ou d'antisérum neutralisant 400 DEPC₅₀ de virus.

ND: Non déterminé

était impossible de différencier ce dernier de la souche Mebus du coronavirus bovin (Tableau VII).

Les épreuves de séroneutralisation ont été répétées au moins à quatre reprises. Les titres SN correspondaient à la réciproque de la plus haute dilution d'antisérum polyclonal neutralisant 400 DEPC₅₀ de virus.

7.2 Épreuve d'inhibition de l'hémagglutination

La réaction d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) se définit comme la capacité d'un antisérum homologue à se fixer aux particules virales et ainsi inhiber leur activité hémagglutinante. Cette technique a été utilisée pour déterminer s'il était possible de distinguer des variations entre les différents isolats de coronavirus bovins étudiés, et les coronavirus hémagglutinants d'autres espèces animales (titre IHA).

Contrairement aux épreuves de neutralisation qui ne permettaient pas d'établir de distinction entre les différents isolats de coronavirus bovin associés à différentes entités cliniques, les épreuves d'inhibition de l'hémagglutination permettaient d'établir une distinction précise entre les isolats associés à des cas de dysenterie d'hiver et ceux responsable d'épidémies de diarrhée néonatale

du veau. À l'exception des isolats BCQ.20 et BCQ.571, tous les isolats provenant de cas de diarrhée néonatale réagissaient, envers l'antisérum hyperimmun dirigé contre la souche Mebus du coronavirus bovin de la même façon que la souche Mebus (Tableau II). Quant aux isolats provenant de cas de dysenterie, ainsi que les isolats BCQ.20 et BCQ.571, une réactivité de 16 à 32 fois inférieure à celle observée avec la souche Mebus fut obtenue. Tout comme pour les tests de séroneutralisation, aucune réactivité croisée n'a pu être démontrée envers les souches hétérologues de coronavirus hémagglutinants à l'exception de la souche Minnesota du coronavirus de la dinde réagissant avec le même titre IHA que la souche Mebus (BCV VR874) du coronavirus bovin (Tableau IV).

Comme pour les épreuves de séroneutralisation, les épreuves d'inhibition de l'hémagglutination ont été répétées au moins à quatre reprises. Les titres IHA correspondaient à la réciproque de la plus haute dilution d'antisérum polyclonal inhibant 4 unités hémagglutinantes de virus.

7.3 Épreuve d'immunobuvardage

Les résultats des épreuves d'immunobuvardage, effectuées avec un antisérum polyclonal hyperimmun dirigé contre la souche prototype du coronavirus bovin (Figure 13)

FIGURE 13

ANALYSE PAR IMMUNOBUVARDAGE DES PROTÉINES STRUCTURALES DES CORONAVIRUS HÉMAGGLUTINANTS.

Des préparations virales concentrées de coronavirus hémagglutinants ont été analysées sur gels de polyacrylamide (12.5%) en présence de 5% de 2-mercaptoéthanol. Les protéines ont ensuite été transférées sur membrane de nitrocellulose et incubées en présence d'antisérum hyperimmun anti-BCV (ATCC-VR874) produit chez le lapin.

LÉGENDE:

VR874:	Coronavirus bovin, souche VR874
OC43:	Coronavirus respiratoire humain, souche HCV-OC43
HEV:	Coronavirus hémagglutinant de l'encéphalomyélite porcine
TCV:	Coronavirus de l'entérite des dindes
Q.20:	Isolat québécois du coronavirus bovin
Q.571:	Isolat québécois du coronavirus bovin
Q.3:	Isolat québécois du coronavirus bovin
Q.9:	Isolat québécois du coronavirus bovin

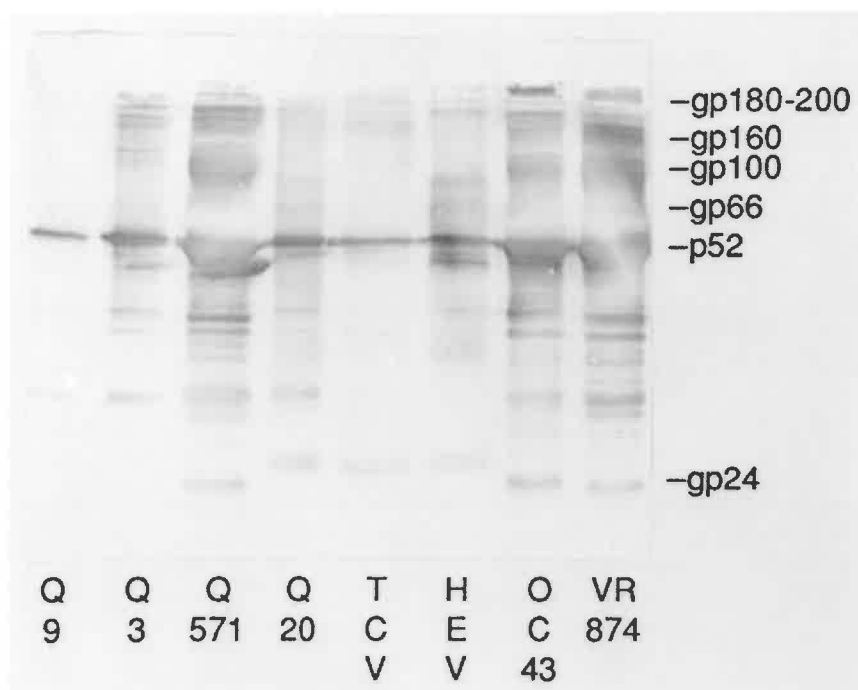


FIGURE 14

ANALYSE PAR IMMUNOBUVARDAGE DES RÉACTIONS ANTIGÉNIQUES CROISÉES ENTRE LES PROTÉINES STRUCTURALES DES CORONAVIRUS HÉMAGGLUTINANTS

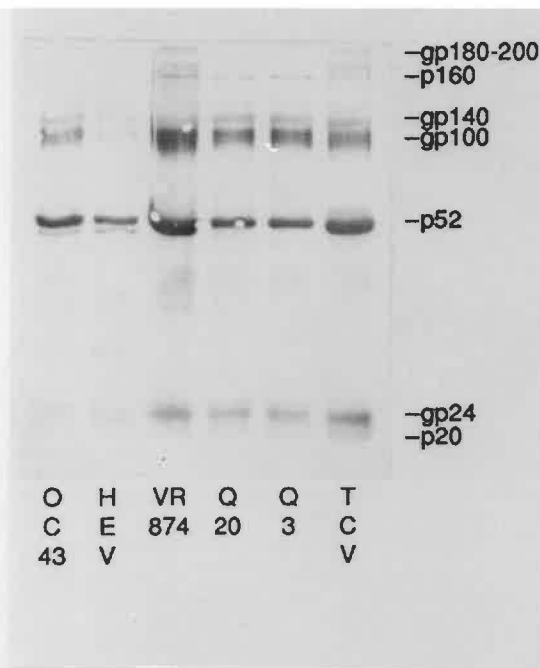
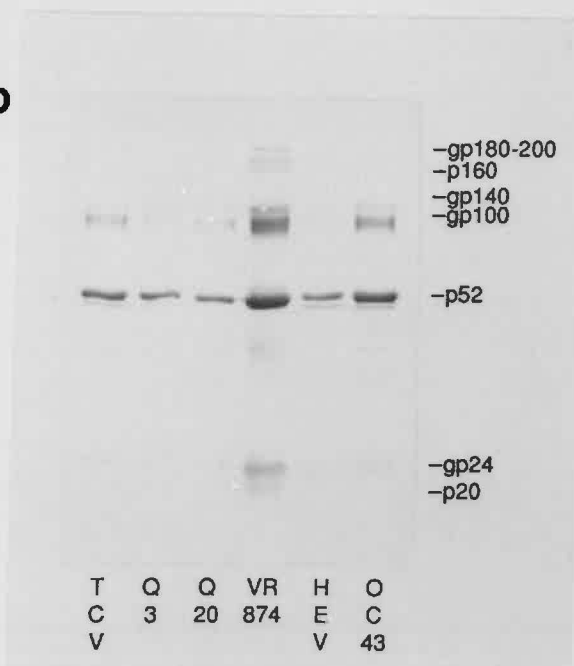
Différents sérums hyperimmuns de lapin ont été utilisés pour la révélation des profils d' électrophorèse.

- a) Antisérum anti TCV
- b) Antisérum anti HCV-OC43
- c) Antisérum anti HEV

Les analyses par électrophorèse ont été effectuées en présence (a,b), où en absence (c) de 2-mercaptoéthanol.

LÉGENDE:

- VR874: Coronavirus bovin, souche VR874
- OC43: Coronavirus respiratoire humain, souche HCV-OC43
- HEV: Coronavirus hémagglutinant de l'encéphalomyélite porcine
- TCV: Coronavirus de l'entérite des dindes
- Q.20: Isolât québécois du coronavirus bovin
- Q.3: Isolât québécois du coronavirus bovin

a**c****b**

n'ont pas permis de déceler de variations tant au niveau de la masse moléculaire des protéines structurales qu'au niveau des déterminants antigéniques. Les mêmes épreuves effectuées avec différents antiséras polyclonaux (Figure 14) nous permettaient d'en arriver aux mêmes conclusions.

7.4 ELISA indirecte

La réactivité croisée des AcMo, dirigés contre la glycoprotéine S du coronavirus bovin, envers différents isolats de coronavirus bovin ainsi qu'envers différents coronavirus d'espèces hétérologues a été analysée par ELISA indirecte. Tel que démontré à la figure 15, les liaisons avec les différents virus ont été exprimées en % comparativement à l'absorbance obtenue pour la souche de Mebus du coronavirus bovin. Selon cette technique, au moins trois groupes antigéniques distincts ont pu être identifiés parmi les isolats de coronavirus étudiés. Les isolats BCQ.4 et BCQ.718 ont réagit exactement de la même façon que la souche de référence contre les 12 AcMo testés. Les AcMo BCH6, BCH1 et BCA7 se liaient intensivement à tous les isolats de coronavirus bovins ainsi qu'aux trois autres souches de coronavirus hémagglutinants. Les AcMo BCB1, BCF4, BCB5 et BCA3 ne réagissaient que très faiblement envers les 8 isolats québécois de coronavirus (BCQ.3, BCQ.12, BCQ.20, BCQ.189, BCQ.417, BCQ.571, BCQ.1750, BCQ.2070). Les isolats BCQ.9,

FIGURE 15

RÉACTIVITÉ CROISÉE ENTRE LES ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGÉS CONTRE LA GLYCOPROTÉINE S DU BCV ET LES DIFFÉRENTS ISOLATS DE CORONAVIRUS HÉMAGGLUTINANTS TEL QU'ÉTABLIE PAR ELISA

La réactivité croisée entre les différents isolats de coronavirus hémagglutinants a été déterminé par ELISA indirecte de compétition. La quantité d' Ac Mo utilisée correspondait au double de la valeur maximale d' absorbance obtenu contre la souche Mebus. Le degré de liaison des Ac aux virus hétérologues fut exprimé en % selon les valeurs obtenues, à une absorbance de 450 nm, pour les virus hétérologues comparativement à la souche Mebus.

- ☐ : 50 à 100% d' homologie
- ☒ : 25 à 50 % d' homologie
- ☐ : - de 25% d'homologie

VIRUS ISOLATE[illegible]

BCQ.12, BCQ.2070 et HEV ne montraient à peu près aucune réactivité envers les 8 des AcMo étudiés (BCB1, BCF4, BCB5, BCA3, BCH3, BCA1, BCA8 et BCA2). Quatre des AcMo (BCH5, BCB1, BCF4 et BCH3) ne réagissaient pas contre la souche HEV-OC43. La souche Minnesota du coronavirus de la dinde réagissait fortement avec la plupart des AcMo. Ce virus ne se différenciait de la souche prototype du BCV que par sa faible réactivité aux AcMo BCH3, BCH8 et BCA2 (50% de la valeur obtenue avec le virus homologue) (Figure 15).

8. COMPARAISON AU NIVEAU MOLÉCULAIRE DES ISOLATS DE CORONAVIRUS BOVIN

Les variations démontrées parmi les différents isolats québécois de coronavirus bovin, tant au niveau sérologique qu'au niveau de leurs activités acétyl-estérase et enzyme destructrice de récepteurs, ou du type d'effet cytopathique induit sur les cellules HRT-18, étaient apparemment reliées en partie à la glycoprotéine de l'hémagglutinine (Parker *et al.*, 1989a; Storz *et al.*, 1991, 1992; Vautherot *et al.*, 1992). Pour ces raisons, il nous est apparu essentiel de vérifier la pertinence de ces variations en regard de la séquence moléculaire du gène HE.

8.1 Choix des isolats

Les isolats choisis pour l'analyse moléculaire du gène HE provenaient de cas de diarrhée néonatale du veau (BCQ.3 et BCQ.571) et de cas d'épidémie de dysenterie d'hiver (WD.2590). Les isolats BCQ.571 et WD.2590 appartenaient au groupe de virus induisant un effet cytopathique de type C sur les cellules HRT-18, tandis que l'isolat BCQ.3 appartenait au groupe de virus induisant un effet cytopathique de type B sur ces mêmes cellules. De plus, les isolats BCQ.3 et WD.2590 possédaient une activité acétyl-estérase relativement faible comparativement à l'isolat BCQ.571. Finalement, les isolats WD.2590 et BCQ.571 réagissaient différemment comparativement à l'isolat BCQ.3 lors d'épreuves d'inhibition de l'hémagglutination. En guise de comparaison, des analyses parallèles incluant d'autres coronavirus hémagglutinant, soit le virus respiratoire humain HCV-OC43, le virus HEV porcin ainsi que le coronavirus de l'entérite des dindes (TCV), ont été effectuées.

8.2 Amplification par la technique de la polymérase en chaîne du gène HE codant pour la glycoprotéine de l'hémagglutinine

Les résultats d'analyses par électrophorèse sur gel d'agarose des fragments du gène HE amplifiés par la technique

de la polymérase en chaîne pour les coronavirus étudiés sont présentés à la figure 16. Les amorces HE.A et HE.B (Figure 5) ont permis l'amplification de fragments d'environ 1300 paires de bases comparativement aux marqueurs de poids moléculaire. Pour chaque isolats, l'amplification de ce fragment s'est avérée possible. Aucune délétion ou insertion n'a pu être observée.

Pour vérifier la spécificité des amorces oligonucléotidiques, des essais d'amplification ont été réalisés sur des préparations d'acides nucléiques de cellules HRT-18, de coronavirus non-hémagglutinants, ainsi que de virus hétérologues (EMCV, BIV). Même à une très basse température d'appariement (37°C), aucune amplification n'a été possible.

8.3 Analyse des séquences nucléotidiques du gène HE de trois isolats québécois de coronavirus bovin comparativement à la souche Mebus du BCV

Les séquences nucléotidiques des isolats BCQ.3, BCQ.571 et WD.2590 ont été analysées, comparativement à la souche prototype du BCV, en utilisant les programmes GeneWorks 2.2 (IntelleGenetics) et MacVector 3.5 (International Biotechnologies). Au niveau nucléotidique, il fut possible de démontrer plus de 98% d'homologies entre les isolats

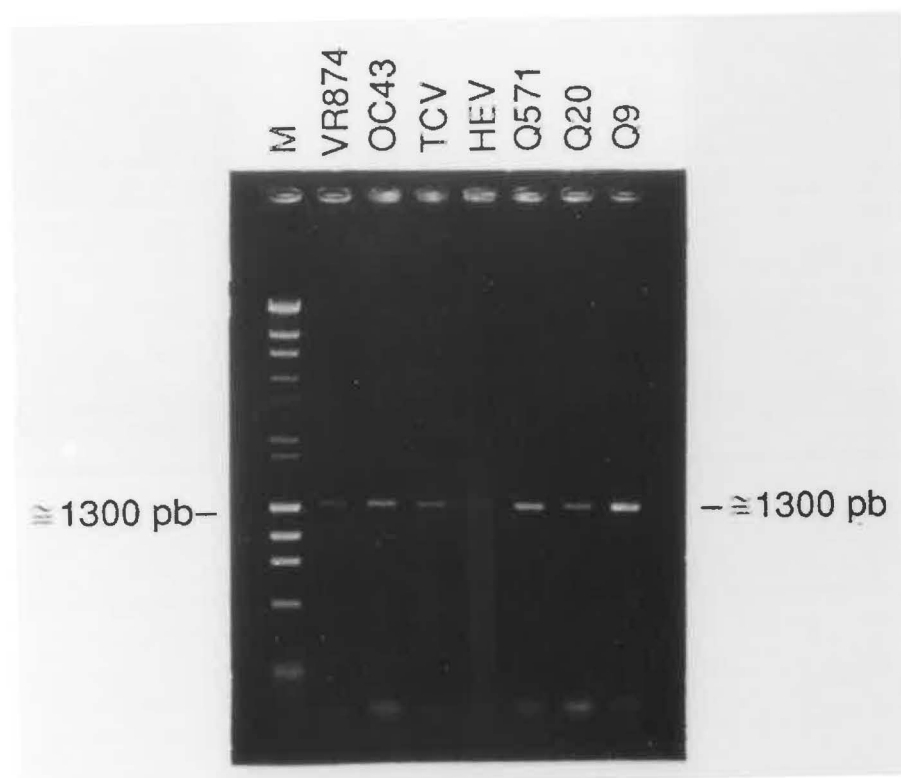
FIGURE 16

AMPLIFICATION PAR LA TECHNIQUE DE LA POLYMERASE EN CHAÎNE (PCR) DU GÈNE HE DES CORONAVIRUS HÉMAGGLUTINANTS.

Les produits d' amplification des fragments HE des différents isolats de coronavirus ont été migrés sur gel d' agarose 0.8%. Les amorces HE.A et HE.B ont été utilisées pour l' amplification enzymatique. Les isolats étudiés étaient: BCV-VR874, HCV-OC43, TCV Minnesota, HEV 67-N, BCQ.571, BCQ.20 et BCQ.9. Le phage Lambda Hind III/øX-174 RF DNA Hinc II a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire.

LÉGENDES:

M: Marqueur de poids moléculaire.
VR874: Coronavirus bovin; souche prototype VR874.
OC43: Coronavirus respiratoire humain; souche HCV-OC43.
TCV: Coronavirus de l'entérite des dindes.
HEV: Coronavirus de l'encéphalomyélite porcine; souche VR740.
Q571: Isolât québécois du coronavirus bovin identifié BCQ.571.
Q20: Isolât québécois du coronavirus bovin identifié BCQ.20.
Q9: Isolât québécois du coronavirus bovin identifié BCQ.9.



québécois et la souche de référence du BCV. Pour chacun des isolats québécois, un total de 19 (WD.2590), 13 (BCQ.571) et 10 (BCQ.3) substitutions nucléotidiques ont pu être observé. En accord avec les résultats de Zhang *et al.*, (1991), la majorité des substitutions nucléotidiques se localisaient entre les nucléotides 1 et 600 ou bien entre les nucléotides 825 et 1225. La partie centrale de la protéine s'avérait mieux conservée que les extrémité 5' ou 3'. Tel que démontré à la figure 17, les substitutions n'impliquaient pas les codons de départ et de terminaison. Les mutations observées ne correspondaient qu'à des mutations ponctuelles. Aucune délétion, insertion ou mutation non-sens n'a pu être démontrées.

8.4 Analyse des séquences d'acides aminés de la glycoprotéine HE de trois isolats québécois de coronavirus bovin comparativement à la souche Mebus du BCV

La figure 18 illustre les séquences d'acides aminés, des différents isolats québécois de coronavirus bovin comparativement à la souche prototype ATCC-VR874 (BCV-Meb). Pour chaque isolat, une protéine de 424 résidus d'acides aminés a été analysée. Pour les isolats WD.2590 et BCQ.3, une première substitution Leu-Pro a été identifiée au niveau du peptide signal (aa5). Cette mutation a été observée

antérieurement pour la souche virulente BCV-LY138 par un autre groupe de chercheur (Zhang *et al.*, 1991). Cinq substitutions supplémentaires ont été observées pour l'isolat WD.2590: Val-Ala (aa8); Arg-Pro (aa53); Asp-Ala (aa344); Glu-Arg (aa350) et Ser-Pro (aa367). La substitution d'une sérine pour une proline (aa367) a aussi été rapportée antérieurement pour la souche virulente BCV-LY138 (Zhang *et al.*, 1991). Cependant, la substitution d'une arginine pour une proline (aa53) semble unique à l'isolat virulent WD.2590. Cette mutation se retrouve tout juste en aval du site acétyl-estérase (FGDS).

9. ÉTUDE DES RÉACTIONS D'HYBRIDATION

Une sonde HE réalisée à partir du produit d'amplification de la souche Mebus du coronavirus bovin a permis la détection des coronavirus hémagglutinants bovin (BCQ,WD), aviaire (TCV), porcin (HEV) et humain (HCV-OC43). Selon les conditions d'hybridations utilisées, le coronavirus hémagglutinant murin MHV-3 appartenant au même groupe sérologique que le BCV n'a pu être détecté. Il en est de même pour le coronavirus hémagglutinant de la bronchite infectieuse aviaire. Celui-ci cependant est caractérisé comme étant sérologiquement différents du BCV (Spaan *et al.*, 1988). Lorsque mis en présence d'autres coronavirus appartenant à des groupes sérologiques différents, aucune réactivité de la

sonde n'a pu être identifiée (Figure 19).

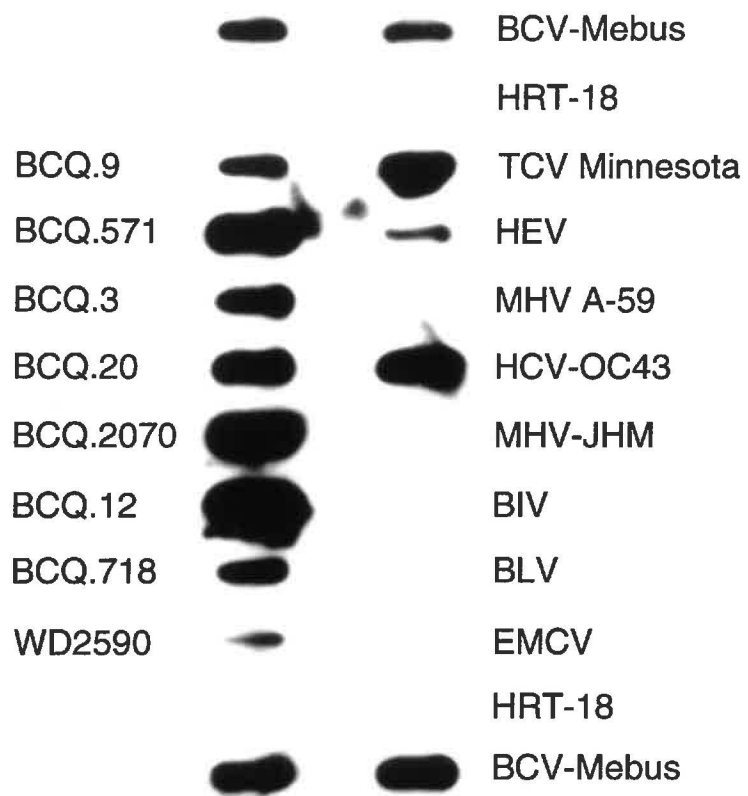
FIGURE 19

DÉTECTION PAR HYBRIDATION MOLÉCULAIRE DE CORONAVIRUS HÉMAGGLUTINANTS AVEC UNE SONDE HE RADIOACTIVE

Une sonde radioactive fabriquée à partir du gène HE de la souche Mebus du coronavirus bovin a été utilisée pour la détection de coronavirus hémagglutinants. Les souches BCV-Mebus, TCV-Minnesota, HEV ainsi que HCV-OC43 ont pu être identifiées. Il en est de même pour les différents isolats québécois de BCV associées à la diarrhée néonatales du veau ou à la dysenterie d'hiver. Les cellules HRT-18, des coronavirus d'autres groupes antigéniques ainsi que des virus hétérologues ont été utilisés à titre de témoins négatifs. L'hybridation a été effectuée pendant 12 heures en présence de 50% formamide, à 42°C. La sonde était ajoutée à la solution d'hybridation à raison de 50ng de sonde par ml de solution d'hybridation.

LEGENDES:

BCV-Mebus:	Coronavirus bovin; souche prototype VR874
BCQ.9:	Isolat québécois de coronavirus bovin
BCQ.571:	Isolat québécois de coronavirus bovin
BCQ.3:	Isolat québécois de coronavirus bovin
BCQ.20:	Isolat québécois de coronavirus bovin
BCQ.2070:	Isolat québécois de coronavirus bovin
BCQ.12:	Isolat québécois de coronavirus bovin
BCQ.718:	Isolat québécois de coronavirus bovin
WD.2590:	Isolat québécois de coronavirus bovin
TCV Minnesota:	Coronavirus de l'entérite des dindes
HEV:	Coronavirus de l'encéphalomyélite porcine; souche prototype VR740
HCV-OC43:	Coronavirus respiratoire humain; souche OC43
MHV A-59:	Coronavirus de l'hépatite murine; souche A-59
MHV-JHM:	Coronavirus de l'hépatite murine; souche JHM
BIV:	Virus de l'immuno-déficience bovine
BLV:	Virus de la leucémie bovine
EMCV:	Virus de l'encéphalomyélocardite porcine
HRT-18:	Cellules HRT-18



DISCUSSION

Considérant la complexité de la pathogénicité et du tropisme cellulaire du coronavirus bovin, l'accumulation de données sur la comparaison de différents isolats de ce virus devient nécessaire pour la compréhension de ces phénomènes. Même si la présence de sérotypes distincts pour le coronavirus bovin n'a pas encore été confirmée de façon définitive, les résultats des études de différents chercheurs sont très suggestives (Benfield et Saif, 1990; Hussain et al., 1991; El-Ghorr et al., 1989; Saif et al., 1986; Dea et al., 1982). Étant donné que la variabilité antigénique est souvent associée à des changements au niveau de la pathogénicité et du tropisme cellulaire et tissulaire du BCV (Benfield et Saif, 1992), nous avons tenté de caractériser puis comparer différents isolats québécois de BCV selon certains aspects biologiques, sérologiques et moléculaires. Ces isolats de BCV ont aussi été comparés à certaines souches de coronavirus hémagglutinants hétérologues.

Tel que décrit précédemment, tous les coronavirus hémagglutinants partagent les mêmes caractéristiques morphologiques (Siddell et al., 1983). L'examen en microscopie électronique de particules virales purifiées de coronavirus hémagglutinants a révélé la présence d'une double frange de projections de surface. Il en va de même pour les différents isolats de coronavirus bovins québécois étudiés qu'ils soient associés à des cas de diarrhée néonatale du

veau ou de dysenterie d'hiver (Athanasious *et al.*, 1994; Dea et Garzon, 1991; Saif *et al.*, 1991, 1988; Takahashi *et al.*, 1980). Tous ces isolats ont pu être propagés sur la lignée cellulaire continue HRT-18 (Mebus *et al.*, 1973). Indépendamment du titre infectieux, en présence de trypsine, différents types d'effet cytopathique (ECP) ont été observés. Les isolats de BCV associés à des cas de dysenterie d'hiver étaient généralement hautement fusogéniques, induisant la production de larges syncytia en moins de 72 heures. À l'exception des isolats BCQ.2070 et BCQ.571 qui se comportaient de la même façon que les isolats provenant de cas de dysenterie d'hiver, ceux provenant de cas de diarrhée néonatale du veau, se sont avérés faiblement fusogéniques mais hautement cytolytiques. Ces résultats confirment ceux obtenus auparavant par Benfield et Saif (1990) pour des isolats de BCV démontrant une pathogénicité différente. Le coronavirus entérique des dindes de même que le coronavirus humain HCV-OC43 induisaient le même type d'ECP que la souche Mebus du BCV. Le coronavirus HEV des porcs induisait un type d'ECP similaire à celui observé pour les isolats de BCV provenant de cas de dysenterie d'hiver.

Récemment une étude comparative réalisée dans notre laboratoire et portant sur la structure moléculaire du gène S de ces mêmes isolats québécois de BCV, a démontré que l'isolat BCQ.2070 était différent de la souche Mebus du

coronavirus bovin. Entre autre, une substitution de l'acide aminé (Ala→Ser) en position 769 du gène S de l'isolat BCQ.2070 a été identifiée (Rekik et Dea, 1994). Cette variation située immédiatement en amont du site de clivage, fut aussi observée par Zhang et al. (1991) lors de la comparaison des séquences en acides aminés des gènes S d'isolats de BCV non-virulents et virulents. L'existence d'une association entre ce changement d'acides aminés près du site de clivage et la virulence ou la cytopathogénicité des isolats de coronavirus bovins, tel que démontré par exemple pour le virus influenza de type A (Rott et al., 1984), reste à être déterminée. Dans le cas du coronavirus de l'hépatite murine, Sturman et al. (1985) ont démontré que le clivage de la glycoprotéine S était nécessaire à l'infection et à l'activité fusogène du virus. De même, Storz et al. (1981) ont démontré que l'addition de trypsine au milieu de culture des cellules infectées par le BCV était nécessaire pour la formation de cellules multinuclées, ou syncytia. Ce clivage serait dépendant de l'activité enzymatique des cellules-hôtes (Sturman et al., 1985).

La deuxième propriété biologique permettant d'établir une distinction entre les isolats de coronavirus bovin est la capacité qu'ont ces derniers de pouvoir se fixer aux récepteurs Neu5,9Ac2 présents à la surface d'érythrocytes de différentes espèces animales (Schultze et al., 1991a et b;

Storz *et al.*, 1992). Tout dernièrement, certaines différences ont été rapportées en regard des propriétés hémagglutinantes d'isolats de BCV virulents et non-virulents (Storz *et al.*, 1992). Dans le même sens, nous avons démontré que tous les isolats québécois de BCV, qu'ils soient virulents ou non-virulents, de même que les virus TCV des dindes, le virus HEV porcin et le coronavirus humain HCV-OC43 agglutinaient les érythrocytes de rat, mais pas ceux de poulet. L'activité RDE des isolats provenant de cas de diarrhée néonatale, qu'ils soient virulents ou non, ne s'est révélée que très faible comparativement à celle obtenue pour les isolats provenant de cas de dysenterie d'hiver (virulents). Dans ce dernier cas, les isolats étaient très effectifs quant à l'inactivation des récepteurs à la surface des globules rouges de rat. Cependant, lorsque comparés au niveau de leur activité acétyl-estérase respective, tous les isolats de BCV réagissaient de façon similaire à l'exception des isolats BCQ.3 et WD.2590 possédant une activité acétyl-estérase (AE) beaucoup plus faible.

Il a été postulé que les différences au niveau des profils hémagglutinants entre les isolats virulents et non-virulents de BCV seraient déterminées soit par les propriétés de liaison à des récepteurs propres à chaque isolat, soit par les différences possibles entre le récepteurs Neu5,9Ac2 des érythrocytes de poulet ou de souris, soit par l'abondance de

récepteurs sur les érythrocytes murins (Schultze *et al.*, 1991a et b). La restriction cellulaire (St.Cyr-Coats *et al.*, 1988; Storz *et al.*, 1983), les différences entre les épitopes de la glycoprotéine S (Hussain *et al.*, 1991; Michaud et Dea, 1994), ainsi que les substitutions d'acides aminés autant au niveau de la glycoprotéine S que HE (Zhang *et al.*, 1991a, 1991b; Rekik et Dea, 1994) pourraient aussi expliquer les différences observées au niveau des profils hémagglutinants. Cependant, les résultats que nous avons obtenus lors de la comparaison des propriétés hémagglutinantes des isolats virulents associées aux cas de diarrhée néonatale du veau et ceux associés aux cas de dysenterie d'hiver, nous permettent de croire que l'interaction virus-érythrocytes requiert la présence de récepteurs à la surface des cellules, mais que l'affinité pour ces récepteurs est probablement dépendante de l'activité RDE de la glycoprotéine HE. Il existe plusieurs rapports indiquant que l'activité AE du BCV n'est probablement pas directement impliquée durant le processus infectieux (Storz *et al.*, 1991, 1992; Schultze *et al.*, 1991a; Parker *et al.*, 1989; Vlasak *et al.*, 1988). Comme il a été rapporté par Spaan *et al.* (1988), l'attachement du virus à la surface des cellules susceptibles, autant pour les coronavirus hémagglutinants que pour les coronavirus non-hémagglutinants est médié par la glycoprotéine S. Cependant l'activité RDE de la glycoprotéine HE peut jouer un rôle en facilitant le relâchement des virus des cellules infectées,

et ainsi contribuer la dispersion du virus. Une activité RDE élevée pourrait donc expliquer la plus grande contagiosité des isolats de BCV associés aux cas de dysenterie d'hiver et la courte durée du syndrome clinique dans les troupeaux.

Tout comme l'examen en microscopie électronique, les profils polypeptidiques des isolats québécois de BCV ne nous ont pas permis d'établir de distinction entre ceux-ci. Sous des conditions non-réductrices, on retrouve pour chacun quatre protéines structurales majeures tel que décrit précédemment pour la souche de référence du coronavirus bovin (Deregt et al., 1988; King et al., 1985, Hogue et al., 1984). En conditions réductrices, pour tous les isolats, la glycoprotéine de l'hémagglutinine (HE) se scindait en deux polypeptides majeurs de 65K.

Au niveau sérologique, tel que démontré auparavant, les épreuves d'immunofluorescence indirecte et d'immunobuvardage utilisant un antisérum hyperimmun, ont reconfirmé la présence de déterminants antigéniques communs au niveau des protéines structurales des différents isolats québécois de BCV et des souches HCV-OC43, HEV et TCV appartenant tous au sous-groupe des coronavirus hémagglutinants (Hussain et al., 1993; Dea et al., 1990; Hogue et al., 1984; Siddell et al., 1983). Lors des épreuves de séroneutralisation (SN) et d'inhibition de l'hémagglutination (IHA), seul le coronavirus de la dinde et

les isolats de BCV se sont avérés partager des déterminants antigéniques communs. Cependant, aucune variation antigénique n' a pu être observée par ces différentes épreuves parmi les isolats de BCV étudiés.

S'il nous a été impossible en utilisant un antisérum hyperimmun de définir clairement la présence de sérotypes parmi les coronavirus bovins, différentes études démontrent du moins, la présence de variations sérologiques mineures entre les souches (Hussain et al., 1993; El-Ghorr et al., 1989; Dea et al., 1982). Au cours de la présente étude, les résultats des tests d'ELISA compétitive obtenus à l'aide d'anticorps monoclonaux (AcMo) dirigés contre la glycoprotéine S se sont avérés en accord avec ceux rapportés précédemment (Deregt et Babiuk, 1987; Vautherot et al., 1984, 1992). Jusqu'à présent, 7 domaines antigéniques localisés sur la glycoprotéine S du coronavirus bovin ont été identifiés lors d'épreuves de compétition (Vautherot et al., 1992). Quatre domaines ont été localisés sur la sous-unité S1, deux sur la sous-unité S2 et un dernier domaine semble présent sur la glycoprotéine entière gp200. Selon nos résultats, les déterminants antigéniques favorisant la production d'anticorps neutralisants se regroupent en deux domaines localisés sur la sous-unités S1. Tout récemment, certains anticorps monoclonaux (BCB5, BCA3, BCF4 et BCB1) produits dans notre laboratoire et possédant une forte activité

neutralisante ont été identifiés à la sous-unité S1 de la glycoprotéine S. La comparaison des séquences nucléotidiques du gène S d'isolats virulents et non-virulents du coronavirus bovin a révélé l'existence de plus de 98% d'homologies. Cependant, la plupart des substitutions ont été localisées au niveau de la sous-unité S1 de la glycoprotéine S (Zhang et al., 1991; Rekik et Dea, 1994). Il a aussi été démontré que le domaine antigénique II se situant entre les résidus en acides aminés 517 et 661, est fonctionnellement et immunologiquement très important (Yoo et al., 1991); les épitopes de ce domaine induisent la production d'anticorps neutralisants (Vautherot et al., 1992; Yoo et al., 1991). Les régions polymorphiques présentes au niveau de la sous-unité S1 des isolats québécois de BCV se retrouveraient au niveau de ce domaine antigénique (Rekik et Dea, 1994). Malgré le haut degré d'homologie, le fait que ces substitutions se retrouvent pratiquement au niveau de la même région représente une différence significative. Les résultats obtenus dans la présente étude et ceux obtenus par d'autres chercheurs suggèrent que cette région représente un domaine immunodominant qui serait impliqué dans la pathogénicité des BCV, tel que rapporté dans le cas de la région polymorphique du virus MHV-4 (Gallagher et al., 1990).

Selon les résultats obtenus au cours de ce travail, trois sous-groupes antigéniques ont pu être identifiés selon

la réactivité des isolats envers les épitopes appartenant aux domaines antigéniques A, B et C. Les épitopes appartenant au domaine antigénique D, défini par l'anticorps monoclonal BCA7, sont apparus très conservés parmi les isolats de BCV étudiés. Les épitopes non-neutralisants du domaine antigénique A semblent tout aussi bien conservés. Trois isolats québécois de BCV diffèrent des autres par les épitopes localisés sur le domaine antigénique C. Un autre anticorps monoclonal n'ayant pu être associé à l'un ou l'autre des domaines antigéniques mentionnés ci-haut semble être dirigé contre un épitope hautement conservé chez les coronavirus bovins, de même que chez les coronavirus TCV, HEV et HCV-OC43. La souche Minnesota du coronavirus de la dinde, bien que ne pouvant être différenciée du coronavirus bovin par les antisérums hyperimmuns, pouvait être différenciée par les épitopes localisés au niveau du domaine C. Les épitopes des domaines antigéniques A et B, ayant une très forte activité neutralisante, semblent très conservés chez les virus BCV et TCV (Dea et Garzon, 1991; Verbeek *et al.*, 1991; Dea *et al.*, 1990). Quant à la souche humaine HCV-OC43, elle peut être différenciée du coronavirus bovin par les épitopes appartenant au domaine antigénique A. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment par d'autres chercheurs montrant qu'un AcMo non-neutralisant dirigé contre la gp200, site unique localisé sur la sous-unité S2 de la glycoprotéine S, réagit de façon similaire lorsque testé contre différents

coronavirus hémagglutinants (Vautherot et al., 1984). Le coronavirus de hémagglutinants de l'encéphalomyélite porcine se distingue de la souche Mebus du coronavirus bovin par les épitopes neutralisants situés au niveau des domaines antigéniques A, B et C. Ces résultats confirment donc ceux obtenus par Vautherot et al. (1992) démontrant que le virus HEV se différencie des autres coronavirus hémagglutinants selon la réactivité d'épitopes localisés au niveau des domaines antigéniques de la sous-unités S1 de la glycoprotéine S.

Pour l'analyse génomique, trois isolats québécois de BCV (BCQ.3, BCQ.571 WD.2590) ont été sélectionnés en raison de leurs caractéristiques biologiques et sérologiques distinctes de la souche Mebus de référence. L'analyse des séquences nucléotidiques du gène HE de ces trois isolats cliniques a démontré une homologie génomique respective de plus de 98% avec la souche Mebus du BCV. La plupart des variations ont été localisées au niveau des extrémités 3' ou 5' du gène HE. La traduction des séquences nucléotidiques en séquences d'acides aminés a démontré que plus de 50% des variations nucléotidiques consistaient en des mutations silencieuses ou des mutations conduisant à des remplacements par des acides aminés du même groupe. La mutation identifiée au niveau de l'aa5 entre la souche avirulente BCV-Meb et la souche virulente WD.2590 a aussi été rapportée auparavant

pour la souche virulente BCV-LY138 (Zhang *et al.*, 1991). Étant donné que cette substitution se retrouve à l'intérieur du polypeptide signal, elle pourrait altérer la maturation ainsi que le transport cellulaire de la glycoprotéine HE. Une autre mutation rapportée par Zhang *et al.* (1991) au niveau de l'aa367 de la souche virulente BCV-LY138, a aussi été identifiée dans le cas de l'isolat WD.2590. Cependant, la substitution affectant l'aa 53 semble unique à la souche WD.2590, associée à la dysenterie d'hiver. Cette substitution se retrouve aux alentours du site acétyl-estérase FGDS qui est bien conservé chez tous les isolats de BCV. En général, l'analyse des séquences nucléotidiques du gène HE n'a pas permis d'identifier de différences majeures au niveau des séquences d'acides aminés expliquant la variabilité retrouvée entre les différents isolats. Toutefois, il reste à démontrer si les deux substitutions impliquant des résidus proline près de la région acétyl-estérase (aa53) ainsi qu'au niveau de l'extrémité 5' du gène HE (aa367) de l'isolat WD.2590 peuvent expliquer la faible réactivité obtenue en IHA contre l'antisérum produit contre la souche prototype, de même que l'augmentation de l'activité RDE observée avec les érythrocytes de rat. L'inclusion d'une proline dans la séquence d'une protéine entraîne un changement conformationnel pouvant résulter en une modification d'une activité biologique ou enzymatique (Yaron et Naider, 1993). Cet acide aminé peut conférer une structure unique

influençant par exemple la susceptibilité des liens peptidiques aux activités de certaines protéases. Des études supplémentaires sont nécessaires pour démontrer jusqu'à quel point l'insertion d'une proline peut avoir influencé l'activité RDE des souches associées à la dysenterie d'hiver, de même que leur activité hémagglutinante. Certaines variations génomiques ayant été identifiées au cours de cette étude semblent représenter des caractéristiques propres aux isolats de BCV. Considérant le fait que les isolats n'avaient pas été propagés pour plus de 5 passages sur les cellules HRT-18, la possibilité que les substitutions identifiées soient attribuables au fait que les virus aient subi des modifications suite à de nombreux passages en cultures cellulaires peut être exclue.

Dans la présente étude, les relations antigéniques et génomiques existant entre différents coronavirus bovins de même que celles existant entre les coronavirus hémagglutinants de différentes espèces animales, ont été démontrées à l'aide de différentes épreuves sérologiques, de même que par la technique d'hybridation en utilisant une sonde représentant le gène codant pour la glycoprotéine HE. Les niveaux d'homologies sont tels, qu'il est possible de détecter les coronavirus hémagglutinants de différentes espèces animales à l'aide d'une sonde HE dérivée du génome du coronavirus bovin. En optimisant quelque peu la technique,

une telle sonde peut sans contredit représenter un outil de diagnostic valable pour la détection de tous ces virus. La faible réactivité obtenue contre les virus murin MHV-JHM et A-59, appartenant au même sous-groupe antigénique que le virus BCV, a aussi été décrite précédemment par d'autres chercheurs (Verbeek et al., 1991). L'absence de réactivité de la sonde moléculaire utilisée envers le virus TGEV porcin, les différentes souches du virus de la bronchite infectieuse aviaire, tous appartenant à des sous-groupes antigéniques distincts, confirment les résultats récemment rapportés par d'autres (Shockley et al., 1987; Dea et al., 1990). Ces résultats sont aussi en accord avec les travaux de différents auteurs sur la comparaison des séquences nucléotidiques des gènes codant pour les protéines structurales des coronavirus de différentes espèces animales (Spaan et al., 1988).

CONCLUSION

Lors de cette étude, nous avons tenté, par l'analyse et la comparaison d'aspects biologiques, sérologiques et moléculaires propres aux glycoprotéines de surface S et HE des coronavirus bovins, non pas d'élucider mais plutôt d'apporter différentes informations qui aideront à la compréhension de phénomènes aussi complexes que la pathogénicité ou la virulence des coronavirus.

La lignée cellulaire HRT-18 s'est avérée permissive pour tous les isolats québécois de coronavirus bovins étudiés dans cette recherche. En présence de trypsine, trois types d'effet cytopathique ont pu être identifiés. Les isolats de BCV considérés virulents, incluant les isolats associés à des épisodes de dysenterie d'hiver, de même que le coronavirus HEV porcin, étaient généralement hautement fusogéniques induisant la production de syncytia en moins de 72 heures.

Tous les isolats de BCV se sont avérés hémagglutinants lorsque qu'incubés en présence d'érythrocytes de rat cette activité étant très faible lorsqu'évaluée avec des érythrocytes de poulet. Au niveau de leur activité acétyl-estérase, tous les isolats de BCV étaient très comparable. Comparativement aux isolats de diarrhée néonatale, les isolats de dysenterie d'hiver se sont révélés très effectifs quant à l'inactivation des récepteurs à la surface des globules rouges de rat. Ceci expliquerait que ces isolats se

différentiaient des isolats associées à la diarrhée néonatale du veau par leur incapacité à agglutiner les globules rouges de rat à une température d'incubation de 37°C, température optimale pour l'activation de l'enzyme.

La présence de déterminants antigéniques communs localisés sur chacune des protéines structurales des coronavirus hémagglutinants a été reconfirmée par des épreuves d'immunobuvardage et d'immunofluorescence indirecte en présence d'un antisérum hyperimmun. Les épreuves de séroneutralisation et d'inhibition de l'hémagglutination n'ont pas permis l'identification de variants chez les coronavirus bovins associés à la diarrhée néonatale du veau. Toutefois, il nous a été possible de différencier ces derniers de ceux associés à la dysenterie d'hiver par les tests d'inhibition de l'hémagglutination.

Des épreuves d'ELISA compétitives ont permis la caractérisation des épitopes localisés sur la glycoprotéine S. Ces résultats ont démontré la présence d'au moins 4 domaines antigéniques désignés A, B, C, et D. Les domaines antigéniques A et B seraient situés sur la sous-unités S1 de la glycoprotéine S et induiraient la formation d'anticorps hautement neutralisants.

Selon la réactivité des isolats étudiés envers les

épitopes appartenant aux domaines antigéniques A, B et C, trois sous-groupes antigéniques ont pu être identifiés parmi les isolats associés aux épisodes de diarrhée néonatale du veau. Les épitopes appartenant au domaine antigénique D sont apparus très conservés parmi les isolats québécois de BCV. Les épitopes non-neutralisants du domaine antigénique A semblent tout aussi bien conservés. Trois isolats québécois de BCV se sont avérés différents par les épitopes localisés au niveau du domaine antigénique C. Un autre anticorps monoclonal, n'ayant pu être associé à l'un ou l'autre des domaines antigéniques mentionnés ci-haut, semble être dirigé contre un épitope hautement conservé chez les coronavirus bovins, de même que chez les coronavirus TCV, HEV et HCV-OC43. La souche Minnesota du coronavirus de la dinde se différenciait des coronavirus bovins par les épitopes du domaine C. Les épitopes des domaines antigéniques A et B semblent conservés chez les virus BCV et TCV. Les anticorps monoclonaux dirigés contre les épitopes appartenant au domaine antigénique A ont permis de différencier la souche humaine HVC-OC43 du coronavirus bovin, tandis que les épitopes non-neutralisants des domaines antigéniques A, B et C différaient entre le coronavirus hémagglutinant de l'encéphalomyélite porcine et le BCV.

Les analyses moléculaires du gène HE n'ont pas permis de démontrer de différences majeures dans la séquence

d'acides aminés des isolats de BCV associés à la diarrhée néonatale du veau. Cependant, deux variations importantes ont été identifiées chez l'isolat WD.2590 associé à la dysenterie d'hiver comparativement à la souche de référence Mebus du BCV. Ces changements impliquant des résidus proline méritent d'être étudiés en profondeur.

Une sonde moléculaire fabriquée à partir du gène HE de la souche de référence Mebus du BCV a permis l'identification de coronavirus hémagglutinants d'autres espèces animales. L'absence de réactivité de la sonde moléculaire utilisée envers le virus humain 229E, le virus TGEV porcin, différentes souches du virus de la bronchite infectieuse aviaire, les cellules HRT-18 ainsi que d'autres virus hétérologues confirment la spécificité de cette sonde. Les résultats obtenus lors des épreuves d'hybridation moléculaire confirment donc les résultats précédents sur la comparaison sérologique du coronavirus ayant permis le regroupement des coronavirus des mammifères et ceux d'espèces aviaires en trois sous-groupes antigéniques distincts.

REMERCIEMENT

J'aimerais adresser mes remerciements les plus sincères au Dr. Serge Dea, mon directeur de maîtrise, sans qui l'accomplissement de ce travail n'aurait été possible. Je le remercie pour la compréhension dont il a fait preuve à mon égard ainsi que pour l'intérêt qu'il a porté à ce projet jusqu'à la toute fin malgré les nombreux délais. J'ai aussi beaucoup apprécié le sérieux, la disponibilité et de la compétence dont il a fait preuve tout au long de ces années. Serge, merci pour ta confiance, merci d'avoir cru en mes capacités d'achever ce travail. Je te serai toujours redevable de la formation acquise à tes côtés. Merci.

Je tiens aussi à remercier le Dr. Michel Trudel, le Dr. Jean-françois Laliberté, le Dr. Laurent Berthiaume ainsi que Mme Ginette Boulanger pour leur disponibilité, leur aimable collaboration ainsi que leurs précieux conseils.

J'aimerais aussi exprimer toute ma gratitude à mes collègues de laboratoires qui ont participé à la réalisation de ce travail à différents niveaux. Merci à Nicole, Louise, Christianne, Johanne, Ridha, Jean, Roger et Jacques.

Je m'en voudrais de terminer cette liste sans remercier mes parents pour leurs soutien moral tout au long de ces

années. Enfin, j'aimerais exprimer ma reconnaissance à mon ami Richard ainsi qu'à ma fille Vanessa pour leur affection continue.

BIBLIOGRAPHIE

ABRAHAM, S., T.E. KIENZLE, W. LAPPS et D.A. BRIAN. 1991. Deduced sequence of the bovine coronavirus spike protein and identification of the internal proteolytic cleavage site. *Virology* **176**:296-301.

ABRAHAM, S., T.E. KIENZLE, W.E. LAPPS et D.A. BRIAN. 1990. Sequence and expression analysis of potential nonstructural proteins of 4.9, 4.8, 12.7, and 9.5 kDa encoded between the spike and membrane protein genes of the bovine coronavirus. *Virology* **177**:488-495.

ALMEIDA, J.D. et D.A.J. TYRRELL. 1967. The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture. *J Gen Virol* **1**:175-178.

AMSTRONG, J. et S. SMEEKENS, P. ROTTIER. 1983. Sequence of the nucleocapsid gene from coronavirus MHV-A59. *Nucleic Acids Res* **11**:883-891.

ANDRIES, K. et M. PENSEART. 1981. Vomitting and wasting disease, a coronavirus infection of pigs. *Adv Exp Med Biol* **142**:399-408.

ATHANASSIOUS, R., G. MARSOLAIS, R. ASSAF, S. DEA, J.P. DESCOTEAUX, S. DULUDE et C. MONTPETIT. 1994. Detection of bovine coronavirus and type A rotavirus in neonatal calf diarrhea and winter dysentery of cattle in Québec: evaluation of three diagnostic methods. *Can Vet J* **35**:163-169.

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

BENFIELD, D.A. et L. SAIF. 1990. Cell culture propagation of a coronavirus isolated from cows with winter dysentery. *J. Clin Microbiol* **28**:1454-1457.

BINNS, M.M., M.E. BOURSNEILL, F.M. TOMLEY et T.D. BROWN. 1986a. Nucleotide sequence encoding the membrane protein of the IBV strain 6/82. *Nucleic Acids Res* **14**:5558-5562.

BINNS, M.M., M.E. BOURSNEILL, F.M. TOMLEY et D.K. BROWN. 1986b. Comparison of the spike precursor sequences of coronavirus IBV strains M41 and 6/82 with that of IBV Beaudette. *J Gen Virol* **67**:2825-2831.

BINNS, M.M., M.E. BOURSNEILL, D. CAVANAGH, D.J. PAPIN et T.D. BROWN. 1985a. Cloning and sequencing of the gene encoding the spike protein of the coronavirus IBV. *J Gen Virol* **66**:719-726.

BINNS, M.M., M.E.G. BOURSNEILL, I.J. FOULDS et T.D.K. BROWN. 1985b. The use of a random priming procedure to generate cDNA libraries of infectious bronchitis virus, a large RNA virus. *J Virol Methods* **11**:265-269.

BOIREAU, P., M.F. MADELAINE, D. SAULNIER, J. LAPORTE et J.F. VAUTHEROT. 1993. Identification, expression in *E. coli* and insect cells of the non-structural protein NS2 encoded by mRNA2 of bovine coronavirus (BCV). *Adv Exp Med Biol* **342**:69-74.

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. *J Gen Virol* **71**:487-492.

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

BOURSNEILL, M.E.G., M.M. BINNS et T.D. BROWN. 1985a. Sequencing of coronavirus IBV genomic RNA: three open reading frames in the 5' 'unique' region of mRNA. *J Gen Virol* **66**:2253-2258.

BOURSNEILL, M.E.G., M.M. BINNS, I.J. FOULDS et T.D. BROWN. 1985b. Sequences of the nucleocapsid genes from two strains of avian infectious bronchitis virus. *J Gen Virol* **66**:573-580.

BOURSNEILL, M.E.G., T.D. BROWN et M.M. BINNS. 1984. Sequence of the membrane protein gene from avian coronavirus IBV. *Virus Res* **1**:303-313.

BRADBURN, A.F. et D.A.J. TYRRELL. 1971. Coronaviruses of man. *Prog Med Virol* **13**:373-403.

BREDENBEEK, P.J., A.F.H. NOTEN, M.C. HORZINEK et W.J.M. SPAAN. 1990. Identification and stability of a 30kDa non-structural protein encoded by messenger RNA2 of mouse hepatitis virus in infected cells. *Virology* **175**:303-306.

BRIAN, D.A., R.Y. CHANG, M.A. HOFMANN et P.B. SETHNA. 1994. Role of subgenomic minus-strand RNA in coronavirus replication. *Arch Virol Suppl* **9**:173-178.

BRITTON, P., R.S. CARMENES, K.W. PAGE et D.J. GARWES. 1988a. The integral membrane protein from a virulent isolate of transmissible gastroenteritis virus: molecular characterization, sequence and expression in *Escherichia coli* *Mol Microbiol* **2**:497-505.

BRITTON, P., R.S. CARMENES, K.W. PAGE, D.J. GARWES et F. PARRA. 1988b. Sequence of the nucleoprotein gene from a virulent British field isolate of transmissible gastroenteritis virus and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **2**:89-99.

BUDZILOWICZ, C.J. et S.R. WEISS. 1987. In vitro synthesis of two polypeptides from a nonstructural gene of coronavirus mouse hepatitis virus strain A59. *Virology* **157**:509-515.

CAMPBELL, S.G. et C.A. COOKINGHAM. 1978. The enigma of winter dysentery. *Cornell Veterinarian* **68**:423-441.

CAUL E.O., S.I. EGGLESTONE. 1979. Coronavirus-like particles present in simian faeces. *Vet Rec* **104**:168-169.

CAVANAGH, D. 1994. Revision of the taxonomy of the coronavirus, torovirus and arterivirus genera [news]. *Arch Virol* **135**:227-237.

CAVANAGH, D., D.A. BRIAN, M.A. BRINTON, L. ENJUANES, K.V. HOLMES, M.C. HORZINEK, M.M. LAI, H. LAUDE, P.G. PLAGEMANN et S.G. SIDDELL. 1993. The Coronaviridae now comprises two genera, coronavirus and torovirus: report of the Coronaviridae Study Group. *Adv Exp Med Biol* **342**:255-257.

CAVANAGH, D., D. BRIAN, L. ENJUANES, K.V. HOLMES, M.M.C. LAI, H. LAUDE, H. SIDDELL, W. SPAAN, F. TAGUCHI et P.J. TALBOT. 1990a. Revised nomenclature for coronavirus structural proteins, mRNAs and genes. *Adv Exp Med Biol* **276**:1-2.

CAVANAGH, D., D. BRIAN, L. ENJUANES, K.V. HOLMES, M.M.C. LAI, H. LAUDE, H. SIDDELL, W. SPAAN, F. TAGUCHI et P.J. TALBOT. 1990b. Recommendations of the Coronavirus Study Group for the nomenclature of the structural proteins, mRNAs, and genes of coronaviruses. *Virology* **176**:306-307.

CAVANAGH, D. et P.J. DAVIS. 1988a. Evolution of avian coronavirus IBV: sequence of the matrix glycoprotein gene and intergenic region of several serotypes. *J Gen Virol* **69**:621-629.

CAVANAGH, D. et P.J. DAVIS, A.P. MOCKETT. 1988b. Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes. *Virus Res* **11**:141-150.

CAVANAGH, D. et P. DAVIS. 1987. Properties of coronavirus IBV after removal of the S1 subunit of the spike glycoprotein. *Adv Exp Med Biol* **218**:501-507.

CAVANAGH, D., P.J. DAVIS, D.J. PAPIN, M.M. BINNS, M.E. BOURSNEILL 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 polypeptide of IBV strains Beaudette and M41. *Vir Res* **4**:133-143.

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

CHEEVER, F.S., J.B. DANIELS, A.M. PAPPENHEIMER et O.T. BAILEY. 1987. A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myeline. I. Isolation and biologic properties of the virus. *J Exp Med* **90**:181-194.

CHOMCZYNSKI, P. et N. SACCHI. 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction *Anal Biochem* **162**:156-159.

COLLINS, A.R. 1994. Human coronavirus OC43 interacts with major histocompatibility complex class I molecules at the cell surface to establish infection. *Immunol Invest* **23**:313-321.

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

COLLOMB, J., C. FINANCE, S. ALABOUCH et J. LAPORTE. 1992. Radioactive and enzymatic cloned cDNA probes for bovine enteric coronavirus detection by molecular hybridization. *Arch-Virol* **125**:25-37.

CORREA, I., F. GEBAUER, M.J. BULLIDO, C. SUNE, M.F. BAAY, K.A. ZWAAGSTRA, W.P. POSTHUMUS, J.A. LENSTRA et L. ENJUANES. 1990. Localization of antigenic sites of the E2 glycoprotein of transmissible gastroenteritis coronavirus. *J Gen Virol* **71**:271-279.

CORREA, I., G. JIMENEZ, C. SUNE, M.J. BULLIDO et L. ENJUANES. 1988. Antigenic structure of the E2 glycoprotein from transmissible gastroenteritis coronavirus. *Virus Res* **10**:77-93.

COX, G.J., M.D. PARKER et L.A. BABIUK. 1991. Bovine coronavirus non-structural protein "ns" is a phosphoprotein. *Virology* **185**:509-512.

COX, G.J., M.D. PARKER et L.A. BABIUK. 1989. The sequence of cDNA of bovine coronavirus 32K nonstructural gene. *Nucleic Acids Research* **17**:5847-5851.

CYR-COATS, K., J. STORZ, K.A. HUSSAIN et K.L. SCHNORR. 1988. Structural proteins of bovine coronavirus strain L9: Effects of the host cell and trypsin treatment. *Arch Virol* **103**:35-45.

DEA, S. et S. GARZON. 1991a. Identification of coronaviruses by the use of indirect protein-A immunogold electron microscopy. *J Vet Diag Inv* **3**:297-305.

DEA, S., A.J. VERBEEK et P. TIJSSSEN. 1991b. Transmissible enteritis of turkeys: experimental inoculation studies with tissue-culture-adapted turkey and bovine coronaviruses. *Avian-Dis* **35**:767-777.

DEA, S., S. GARZON et P. TIJSSSEN. 1990. Characterization and location of the structural polypeptides of turkey enteric coronavirus using monoclonal antibodies and enzymatic treatments. *Adv Exp Med Biol* **276**:449-455.

DEA, S., A.J. VERBEEK et P. TIJSSSEN. 1990. Antigenic and genomic relationships among turkey and bovine enteric coronaviruses. *J Virol* **64**:3112-3118.

DEA, S., S. GARZON et P. TIJSSSEN. 1989a. Identification and location of the structural glycoproteins of a tissue culture-adapted turkey enteric coronavirus. *Arch Virol* **106**:221-237.

DEA, S., S. GARZON et P. TIJSSSEN. 1989b. Intracellular synthesis and processing of the structural glycoproteins of turkey enteric coronavirus. *Arch Virol* **106**:239-259.

DEA, S., S. GARZON, H. STRYKOWSKI et P. TIJSSSEN. 1989c. Ultrastructure and protein A-gold immunolabelling of HRT-18 cells infected with turkey enteric coronavirus. *Vet Microbiol* **20**:21-33.

DEA, S., S. GARZON et P. TJISSEN. 1989d. Isolation and trypsin-enhanced propagation of turkey enteric (bluecomb) coronaviruses in a continuous human rectal adenocarcinoma cell line. *Am J Vet Res* **50**:1310-1318.

DEA, S. et P. TIJSSSEN. 1989e. Antigenic and polypeptide structure of turkey enteric coronaviruses as defined by monoclonal antibodies. *J Gen Virol* **70**:1725-1741.

DEA, S. et P. TJISSEN. 1988. Identification of the structural proteins of turkey enteric coronavirus. *Arch Virol* **99**:173-186.

DEA, S., R.S. ROY et M.A. ELAZHARY. 1982. Antigenic variations among calf diarrhea coronaviruses by immunodiffusion and counterimmuno-electrophoresis. *Ann Rech Vet* **13**:351-356.

DEA S., R.S. ROY et M.E. BEGIN. 1980. Bovine coronavirus isolation and cultivation in continuous cell lines. *Am J Vet Res* **41**:30-38.

de GROOT, R.J., W. LUIJTES, M.C HORZINEK, B.A.M. VAN DER ZEIJST, W.J. SPAAN et J.A. LENSTRA. 1987a. Evidence for a coiled-coil structure in the spike proteins of coronaviruses. *J Mol Biol* **24**:57-78.

de GROOT, R.J., J. MADURO, J.A. LENSTRA, M.C HORZINEK, B.A.M. VAN DER ZEIJST et W.J. SPAAN. 1987b. cDNA cloning and sequence analysis of the gene encoding the peplomer protein of feline infectious peritonitis virus. *J Gen Virol* **68**:2639-2646.

DELMAS, B., J. GELFI, E. KUT, H. SJOSTROM, O. NOREN et H. LAUDE. 1994. Determinants essential for the transmissible gastroenteritis virus-receptor interaction reside within a domain of aminopeptidase-N that is distinct from the enzymatic site. *J Virol* **68**:5216-5224.

DELMAS, B., J. GELFI, H. SJOSTROM, O. NOREN et H. LAUDE. 1993. Further characterization of aminopeptidase-N as a receptor for coronaviruses. *Adv Exp Med Biol* **342**:293-298.

DELMAS, B. et H. LAUDE. 1990. Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression. *J Virol* **64**:5367-5375.

DELMAS, B., M. GODET, M. GELFI, D. RASSCHAERT et H. LAUDE. 1990a. Enteric coronavirus TGEV: mapping of four major antigenic determinants in the amino half of peplomer protein E2. *Adv Exp Med Biol* **276**:151-157.

DELMAS, B., D. RASSCHAERT, M. GODET, J. GELFI et H. LAUDE. 1990b. Four major antigenic sites of the coronavirus transmissible gastroenteritis virus are located on the amino-terminal half of spike glycoprotein S. *J Gen Virol* **71**:1313-1323.

DELMAS, B., J. GELFI et H. LAUDE. 1986. Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus. II. Domains in the peplomer glycoprotein. *J Gen Virol* **67**:1405-1418.

DEREGT, D., M.D. PARKER, G.C. COX et L.A. BABIUK. 1989. Mapping of neutralising epitopes to fragment of the bovine coronavirus E2 protein by proteolysis of antigen-antibody complexes. *J Gen Virol* **70**:647-658.

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

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* **161**:410-420.

DURHAM, P.J.K., L.E. HASSARD, K.R. AMSTRONG et J.M. TAYLOR. 1989. Coronavirus associated diarrhea (winter dysentery) in adult cattle. *Can Vet J* **30**:825-827.

DVEKSLER, G.S., A.A. BASILE, C.B. CARDELLICHIO, N. BEAUCHEMIN, C.W. DIEFFENBACH et K.V. HOLMES. 1993. Expression of MHV-A59 receptor glycoprotein susceptible and resistant strain of mice. *Adv Exp Med Biol* **342**:267-272.

DVEKSLER, G.S., M.N. PENSIERO, C.B. CARDELLICHIO, R.K. WILLIAMS, K.V. HOLMES. 1991. Cloning the mouse hepatitis virus (MHV) receptor: expression in human and hamster cell lines. *J Gen Virol* **76**:1263-1270.

EL-GHORR, A.A., D.R. SNODGRASS, F.M.M. SCOTT et I. CAMPBELL. 1989. A serological comparison of bovine coronavirus strains. *Arch Virol* **104**:241-248.

ENJUANES, L., C. ANCHEZ, F. GEBAUER, A. MENDEZ, J. DOPAZO et M.L. BALLESTEROS. 1993. Evolution and tropism of transmissible gastroenteritis coronavirus. *Adv Exp Med Biol* **342**:35-42.

ENJUANES, L., F. GEBAUER, I. CORREA, M.J. BULLIDO, C. SUNE, C. SMERDOU, C. SANCHEZ, J.A. LENSTRA, W.P. POSTHUMUS et R.H. MELOEN. 1990. Location of antigenic sites of the S-glycoprotein of transmissible gastroenteritis virus and their conservation in coronaviruses. *Adv Exp Med Biol* **276**:159-172.

ESPINASSE J., M. VISO, A. LAVAL, M. SAVEY et C. LE LAYEC. 1982. Winter dysentery: a coronavirus-like agent in the feces of beef and dairy cattle with diarrhoea. *Vet Res.* **110**:385-388.

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

FRANKEL, M.E. et W. GERHARD. 1979. The rapid determination of binding constants for antiviral antibodies by a radio-immunoassay. An analysis of the interaction between hybridoma proteins and influenza virus. *Mol Immunol* **16**:101-106.

GAGNETEN, S., O. GOUT, M. DUBOIS-DALCO, P. ROTTIER, J. ROSSEN et K.V. HOLMES. 1995. Interaction of mouse hepatitis virus (MHV) spike glycoprotein with receptor glycoprotein MHVR is required for infection with an MHV strain that expresses the hemagglutinin-esterase glycoprotein. *J Virol* **69**:889-895.

GALLAGER, T.M., S.E. PARKER et M.J. BUCHMEIER. 1990. Neutralisation-resistant variants of an enterotropic coronavirus are generated by deletions within the amino-terminal half of the spike glycoprotein. *J Virol* **64**:731-734.

GARWES, D.J., L. BOUNTIFF, G.C. MILLSON et C.J. ELLEMAN. Defective replication of porcine transmissible gastroenteritis virus in a continuous cell line. *Adv Exp Med Biol* **173**:79-93.

GLEDHILL, A.W. et C.H. ANDREWES. 1951. A hepatitis virus of mice. *Br J Exp Pathol* **32**:559-568.

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. *J Virol* **68**:8008-8016.

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

HACHINOHE, S., K. SUGAWARA, H. NISHIMURA, F. KITAME et K. NAKAMURA. 1989. Effect of anti-haemagglutinin-esterase glycoprotein monoclonal antibodies on the receptor-destroying activity of influenza C virus. *J Gen Virol* **70**:1287-1292.

HAMRE D., D.A. KINDIG et J. MANN. 1967. Growth and intracellular development of a new respiratory virus. *J Virol* **105**:810-816.

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

HECKERT R.A., L.J. SAIF et G.W. MYERS. 1989. Development of protein A-gold immunoelectron microscopy for detection of bovine coronavirus in calves: comparison with ELISA and direct immunofluorescence of nasal epithelial cells. *Vet Microbiol.* **119**:217-231.

HEROLD, J., T. RAABE et S. SIDDELL. 1993. Molecular analysis of the human coronavirus (strain 229E) genome. *Arch Virol Suppl.* **7**:63-74.

HERRLER, G., H.J. GROSS, A. IMHOF, R. BROSSMER, G. MILKS et J.C. PAULSON. 1992. A synthetic sialic acid analogue is recognized by influenza C virus as a receptor determinant but is resistant to the receptor-destroying enzyme. *J Biol Chem* **267**: 12501-12505.

HERRLER, G., R. ROTT, H.D. KLENK, H.P. MULLER, A.K. SHUKLA et R.T. SCHAUER. 1985. The receptor-destroying enzyme of influenza C virus is neuraminate-O-acetyesterase. *EMBO J.* **4**:1503-1506.

HIDEYUKI, K., Y.K. YAMADA et F. TAGUCHI. 1994. Localisation of neutralising epitopes and receptor-binding site within the amino-terminal 330 amino acids of the murine coronavirus spike protein. *J Virol* **68**:5403-5410.

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. *Adv Exp Med Biol* **342**:105-109.

HOGUE, B.G., T.E. KIENZLE et D.A. BRIAN. 1989. Synthesis and processing of the bovine enteric coronavirus haemagglutinin protein. *J Gen Virol* 70:345-352.

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

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

HOLMES, K.V. et R.K. WILLIAMS. 1990a. Background paper: functions of coronavirus glycoproteins. [Review] *Adv Exp Med Biol* 276:5-7.

HOLMES, K.V., R.K. WILLIAMS, C.B. CARDELLICHIO, S.R. COMPTON, S.W. STEPHENSEN SNYDER, M.F. FRANA, G.S. IANG, A. SMITH et R.L. KNOBLER. 1990b. Is the 110K glycoprotein the only receptor for MHV and does its expression determine species specificity?. *Adv Exp Med Biol* 276:37-44.

HOLMES, K.V., J.F. BOYLE, D.G. WEISMILLER, S.R. COMPTON, R.K. WILLIAMS, C.B. STEPHENSEN et M.F. FRANA. 1990c. Identification of a receptor for mouse hepatitis virus. *Adv Exp Med Biol* 218:197-202.

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* 115:334-344.

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

HOSHINO, Y. et F.W. SCOTT. 1980. Immunofluorescent and electron microscopic studies of feline small intestinal organ cultures infected with feline infectious peritonitis virus. *Am J Vet Res* 41:672-681.

HUSAIN, K.A., J. STORZ et K.G. KOUSOULAS. 1991. Comparison of bovine coronavirus (BCV) antigens: monoclonal antibodies to the spike protein distinguish between vaccine and wild type strain. *Virology* **183**: 442-445.

JACOBSE-GEELS, H., M.R. DAHA ET M. HORZINEK. 1980. Isolation and characterization of feline C3 and evidence for the immune complex pathogenesis of feline infectious peritonitis. *J Immunol* **125**:1606-1610.

JEONG, Y.S. et S. MAKINO. 1994. Evidence for coronavirus discontinuous transcription. *J Virol* **68**:2615-2623.

JIMENEZ, G., I. CORREA, M.P. MELGOSA, M.J. BULLIDO et L. EUJANES. 1986. Critical epitopes in transmissible gastroenteritis virus neutralisation. *J Virol* **60**:131-139.

KAPIKIAN, A.Z., H.D. jr JAMES, S.J. KELLY, J.H. DEES, H.C. TURNER, K. MCINTOSH, H.W. KIM, R.H. PARROT, M.M. VINCENT et R.M. CHANOCK. 1969. Isolation from man of avian infectious virus "like" viruses (coronavirus) epidemiological observations. *J Infect Dis* **119**:282-290.

KAPKE, P.A., F.Y. TUNG et D.A. BRIAN. 1989. Nucleotide sequence between the peplomer and matrix protein genes of the porcine transmissible gastroenteritis coronavirus identifies three large open reading frames. *Virus Genes* **2**:293-294.

KAPKE, P.A., F.Y. TUNG, B.G. HOGUE, D.A. BRIAN et R.D. WOODS. 1988. The amino-terminal signal peptide on the porcine transmissible gastroenteritis coronavirus matrix protein is not an absolute requirement for membrane translocation and glycosylation. *Virology* **165**:367-376.

KAPKE, P.A., F.Y. TUNG, D.A. BRIAN. 1987. Nucleotide sequence of the porcine transmissible gastroenteritis coronavirus matrix protein gene. *Adv Exp Med Biol* **218**:117-22.

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

KING, B., B.J. POTTS et D.A. BRIAN. 1985. Bovine coronavirus hemagglutinin protein. *Virus Res* **2**:53-59.

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

KING B. et D.A. BRIAN. 1982. Bovine coronavirus structural proteins. *J Virol* **42**:700-707.

KLUMPERMAN, J., J.K. LOCKER, A. MEIJER, M.C. HORZINEK, H.J. GEUZE et P.J. ROTTIER. Coronavirus M proteins accumulate in the Golgi complex beyond the site of virion budding. *J Virol* **68**:6523-6534.

KUBO, H. et Y.K. YAMADA. 1994. Localization of neutralizing epitopes and the receptor-binding site within the amino-terminal 330 amino acids of the murine coronavirus spike protein.

LABONTÉ, P., S. MOUNIR et P.J. TALBOT. 1995. Sequence and expression of the ns2 protein gene of human coronavirus OC43. *J Gen Virol* **76**:431-435.

LAI, M.M.C., C.L. LIAO, Y.J. LIN et X. ZHANG. 1994. Coronavirus: how a large RNA viral genome is replicated and transcribed. *Infect Agents Dis* **3**:98-105.

LAI, M.M.C. 1990. Coronavirus Organization, replication and expression of genome. *Annual Review of Microbiology* **44**:303-333.

LAVIADA, M.D., S.P. VIDEGAIN, L. MORENO, F. ALONSO, L. ENJUANES et J.M. ESCRIBANO. 1990. Expression of swine transmissible gastroenteritis virus envelope antigens on the surface of infected cells: epitopes externally exposed. *Virus Res* **16**:247-254.

LAPORTE, J., P. BOBULESCO et F. ROSSI. 1980. Une lignée particulièrement sensible à la réplication du coronavirus entérique bovin: les cellules HRT-18. *CR Acad Sci (III) Paris* **290D**: 623-626.

LAPPS, W., B.G. HOGUE et D.A. BRIAN. 1987a. Deduced amino acid sequence and potential O-glycosylation sites for the bovine coronavirus matrix protein. *Adv Exp Med Biol* **218**:123-129.

LAPPS, W., B.G. HOGUE et D.A. BRIAN. 1987b. Sequence analysis of the bovine coronavirus nucleocapsid and matrix glycoprotein genes. *Virology* **157**:47-57.

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

LAUDE, H. 1990. Mapping epitopes on coronavirus glycoproteins [Review]. *Adv Exp Med Biol* **276**:139-142.

LAUDE, H., D. RASSCHAERT, B. DELMAS, M. GODET, J. GELFI et B. CHARLEY. Molecular biology of transmissible gastroenteritis virus. [Review] *Vet Microbiol* **23**:147-154.

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

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. *J Gen Virol* **67**:119-130.

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

LAUDE, H., B. CHARLEY et J. GELFI. 1984. Replication of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) in swine alveolar macrophages. *J Gen Virol* :327-332.

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

LIN, J., C.L. LIAO et M.M.C. LAI. 1994. Identification of the cis-acting signal for minus-strand RNA synthesis of a murine coronavirus: implications for the role of minus-strand RNA in RNA replication and transcription. *J Virol* **68**:8131-8140

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

LOMNICZI, B. 1987. Biological properties of avian coronavirus RNA. *J Gen Virol* **36**:531-533.

LUYTJES, W., P.J. BREDENBEEK, A.F. NOTEN, M.C. HORZINEK et W.J. SPAAN. 1988. Sequence of mouse of mouse hepatitis virus A59 mRNA2: identifications for RNA recombination between coronaviruses and influenza C virus. *Virology* **166**:415-422.

LUYTJES, W., L.S. STURMAN, P.J.BREDENBEEK, J. CHARITE, B.A.M. 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* 1987 **161**:479-487.

MAKINO, S., J.G. KECK, S.A. STOHLMAN et M.M.C. LAI. 1986. High-frequency RNA recombination of murine coronaviruses. *J Virol* 1986 **57**:729-737.

MAKINO, S., F. TAGUCHI, M. HAYAMI et K. FUJIWARA. 1983. Characterization of small plaque mutants of mouse hepatitis virus, JHM strain. *Microbiol Immunol* **27**:445-454.

MANIATIS, T., F.F. FRITSCH et J. SAMBROOK. 1992. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

MACHAMER, C.E. et J.K. ROSE. 1987. Aspecific transmembrane domain of a coronavirus E1 glycoprotein is required for its retention in the Golgi region. *J Cell Biol* **105**:1205-1214.

MACNAUGHTON, M.R., H.A. DAVIES et N.V. NERMUT. 1978. Ribonucleoprotein-like structures from coronavirus particle. *J Gen Virol* **39**:545-549.

MAKINO, S., F. TAGUSHI, M. HAYAMI et K. FUJIWARA. 1983. Characterization of small plaque mutants of mouse hepatitis virus, JHM strain. *Microbiol Immunol* **59**:168-171.

MAYER, T., T. TAMURA, M. FALK et H. NIEMANN. 1988. Membrane integration and intracellular transport of the coronavirus glycoprotein E1, class III membrane glycoprotein. *J Biol Chem* **263**:14956-14963.

MC INTOSH, K. 1974. Coronaviruses: a comparative review. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **63**:85-129.

MC INTOSH, K., H.J. DEES, W.D. BECKER, A.Z. KAPIKIAN et R.M. CHANOCK. 1969. Antigenic relationships among the coronaviruses of man between human and animal coronaviruses. *J Immunol* **102**:1109-1118.

MC INTOSH, K., H.J. 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. *Proc Natl Acad Sci* **57**:933-940.

MEBUS, C.A., E.L. STAIR, M.B. RHODES et M.J. TWIEHAUS. 1973. Neonatal calf diarrhoea: propagation, attenuation, and characteristics of coronavirus like agent. *Am J Vet Res.* **34**:145-150.

MENGELING, W.L., A.D. BOOTH, A.E. RITCHIE. 1972. Characteristic of a coronavirus of (strain 67N) pigs. *Am J Vet Res* **33**:297-300.

MICHAUD, L. et S. DEA. 1993. Characterization of monoclonal antibodies to bovine enteric coronavirus and antigenic variability among Quebec isolates. *Arch Virol* **131**:455-465.

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

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

MOUNIR, S. et P.J. TALBOT. 1993b. Molecular characterisation of the S protein gene of human coronavirus OC43. *J Gen Virol* **74**:1981-1987.

MOUNIR, S. et P.J. TALBOT. 1992. Sequence analysis of the membrane protein gene of human coronavirus OC43. *J Gen Virol* **73**:2731-2736.

NAGANO, H., H. HASHIMOTO, Y. TANAKA et Y. FUJISAKI. 1993. Dot-blot hybridization using digoxigenin-labeled cDNA probe complementary to the S1 gene of avian infectious bronchitis virus permits discrimination between virus strains. *J Vet Med Sci* **55**:735-738.

NIEMANN, H., R. GEYER, H.D. KLENK, D. LINDER, S. STERM et M. WIRTH. 1984. The carbohydrate of mouse hepatitis virus (MHV)A-59: structures of the O-glycosidically linked oligosaccharides of glycoprotein E1. *EMBO J* **3**:665-670.

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

NIESTERS, H.G., J.A. LENSTRA, W.J. SPAAN, A.J. ZIJDERVELD, N.M. BLEUMINK-PLUYM, F. HONG, G.J. VAN SCHARRENBURG, M.C. HORZINEK et B.A.M. VAN DER ZEIJST. 1986. The peplomer protein sequence of the M41 strain of coronavirus IBV and its comparison with Beaudette strains. *Virus Res* **5**:253-263.

NIESTERS, H.G., N.M. BLEUMINK-PLUYM, A.D. OSTERHAUS et M.C. HORZINEK. 1987a. Epitopes on the peplomer protein of infectious bronchitis virus strain M41 as defined by monoclonal antibodies. *Virology* **161**:511-519.

NIESTERS, H.G., J.G. KUSTERS, J.A. LENSTRA, W.J. SPAAN, M.C. HORZINEK et B.A.M. VAN DER ZEIJST. 1987b. The neutralization epitopes on the spike protein of infectious bronchitis virus and their antigenic variation. *Adv Exp Med Biol* **218**:483-92.

O'CALLAGHAN, R.J. et D.D. LABAT. 1983. Evidence of a soluble substrate for the receptor-destroying enzyme of influenza C virus. *Infect Immun* **39**:305-310.

OLESZAK, E.L., S. PERLMAN, R. PARR, E.W. COLLISSEON et L.J. LEIBOWITZ. 1993. Molecular mimicry between S peplomer proteins of coronaviruses (MHV, BCoV, TGEV and IBV) and Fc receptor. *Adv Exp Med Biol* **342**:183-188.

PARKER, S.E. et M.J. BUCHMEIER. 1990a. 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.

PARKER, S.E., D. YOO, G.J. COX et L.A. BABIUK. 1990b. Primary structure of the S peplomer gene of bovine coronavirus and surface expression in insect cells. *J Gen Virol* **71**:263-270.

PARKER, M.D., G.J. COX, D. DEREGT, D. FITZPATRICK et L.A. BABIUK. 1989a. Cloning and in vitro expression of the gene for the E3 hemagglutinin glycoprotein of bovine coronavirus. *J Gen Virol* **71**:155-164.

PARKER, S.E., T.M. GALLAGHER et M.J. BUCHMEIER. 1989b. Sequence analysis reveals extensive polymorphism and evidence of deletion within E2 glycoprotein gene of several strains of murine hepatitis virus. *Virology* **173**:664-673.

PATEL, J.R., J. DANIEL, M. MATHAN et V.I. MATHAN. 1984. Isolation and identification of enteroviruses from faecal samples in a differentiated epithelial cell line (HRT-18) derived from human rectal carcinoma. *J Med Virol* **14**:255-261.

PAYMENT, P. et P. TRUDEL. 1989. Manuel de techniques virologiques. Presse de l' Université du Québec.

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

RASSCHAERT, D., M. DUARTE et H. LAUDE. 1990. Porcine respiratory coronavirus differs from transmissible gastroenteritis virus by a few genomic deletions. *J Gen Virol* **1990** **71**:2599-2607.

RASSCHAERT, D. et H. LAUDE. 1987a. The predicted primary structure of the peplomer protein E2 of the porcine coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *J Gen Virol* **68**:1883-1890.

RASSCHAERT, D., B. DELMAS, B. CHARLEY, J. GROSCLAUDE, J. GELFI et H. LAUDE. 1987b. Surface glycoproteins of transmissible gastroenteritis virus: functions and gene sequence. *Adv Exp Med Biol* 218:109-116.

RASSCHAERT, D., J. GELFI et H. LAUDE. 1987c. Enteric coronavirus TGEV: partial sequence of the genomic RNA, its organization and expression. *Biochimie* 69:591-600.

REKIK, M.R. et S. DEA. 1994. Comparative sequence analysis of a polymorphic region of spike protein gene of bovine coronavirus isolates. *Arch Virol* 135:319-331.

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. *Arch Virol* 85: 71-83.

ROSSEN, J.W., C.P. BEKKER, W.F. VOORHOUT, G.J. STROUS, A. VAN-DER-ENDE et P.J. ROTTIER. 1994. Entry and release of transmissible gastroenteritis coronavirus are restricted to apical surfaces of polarized epithelial cells. *J Virol* 68:7966-7973.

ROTT, R., M. ORLICH, H.D. KLENK, M.L. WANG, J.J. SKEHEL et D.C. WILLEY. 1984. Studies on the adaptation of influenza viruses to MDCK cells. *EMBO J* 3:3329-3332.

ROTTIER, P.J.M., W.J.M. SPAAN, M. HORZINEK et B.A.M. Van Der ZEIJST. 1981. Translation of three mouse hepatitis virus (MHV-59H6).

SAIF, L.J., K.V. BROCK D.R. REDMAN et E.M. KOHLER. 1991. Winter dysentery in dairy herds: electron microscopic and serological evidence for an association with coronavirus infection. *Vet Res* 128:447-449.

SAIF, L.J. 1990. A review of evidence implicating bovine coronavirus in the etiology of winter dysentery in cows: an enigma resolved? [editorial]. *Cornell Vet* 80:303-311.

SAIF, L.J., D.R. REDMAN, K.V. BROCK, E.M. KOHLER et R.A. HECKERR. 1988. Winter dysentery in adult dairy cattle: detection of coronaviruses in the feces. *Veterinary Record* **123**:300-301.

SAIF, L.J., D.R. REDMAN, P.D. MOORHEAD et K.W. THEIL. 1986. Experimentally-induced coronavirus infection in calves: Viral replication in the respiratory and intestinal tracts. *Am J Vet Res* **47**:1426-1432.

SANGER, F., S. NICKLEN et A.R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**:5463-5467.

SATO, M. et H. AKASHI. 1993. Detection of bovine coronavirus by enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *J Vet Med Sci* **55**:771-774.

SCHALK, A.F. et M.C. HAWN. 1931. An apparently new respiratory disease of baby chicks. *J Am Vet Med Assoc* **78**:413-422.

SCHMIDT, I., M. SKINNER et S. SIDDELL. 1987. S Nucleotide sequence of the gene encoding the surface projection glycoprotein of coronavirus MHV-JHM. *J Gen Virol* **68**:47-56.

SCHMIDT, O.W., M.K. COONEY et G.E. KENNY. 1979. Plaque assay and improved yield of human coronaviruses in a human rhabdomyosarcoma cell line. *J Clin Microbiol* **9**:722-728.

SCHOCHETMAN, G., R.H. STEVENS et R.W. SIMPSON. 1977. Presence of infectious polyadenylated RNA in coronavirus avian bronchitis virus. *Virology* **77**:772-782.

SCHULTZE, B. et G. HERRLER. 1994. Recognition of cellular receptors by bovine coronavirus. *Arch Virol Suppl* **9**:451-459.

SCHULTZE, B., L. ENJUANES, D. CAVANAGH et G. HERRLER. 1993a. N-acetylneuraminic acid plays a critical role for the haemagglutinating activity of avian infectious bronchitis virus and porcine transmissible gastroenteritis virus. *Adv Exp Med Biol* **342**:305-310.

SCHULTZE, B. et G. HERRLER. 1993b. Recognition of N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid by bovine coronavirus and hemagglutinating encephalomyelitis virus. *Adv Exp Med Biol* **342**:299-304.

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* **189**:792-794.

SCHULTZE, B., K. WAHN, H.D. KLENK et G. HERRLER. 1991a. Isolated HE-protein from hemagglutinating encephalomyelitis virus and bovine coronavirus has receptor-binding activity. *Virology* **180**:221-228.

SCHULTZE, B., H.J. GROSS, R. BROSSMER et G. HERRLER. 1991b. The S protein of bovine coronavirus is a hemagglutinin recognizing 9-O-acetylated sialic acid as a receptor determinant. *J Virol* **65**:6232-6237.

SHARPEE, R.L., C.A. MEBUS et E.P. BASS. 1976. Characterisation of calf diarrheal coronavirus. *Am J Vet Res* **37**:1031-1041.

SHOCKLEY, L.J., P.A. KAPKE, W. LAPPS, D.A. BRIAN, L.N.W. POTGIEVER et R.H. WOODS. 1987. Diagnosis of porcine and bovine enteric coronavirus infections using cloned cDNA probes. *J Clin Microbiol* **25**:1591-1596.

SIDDELL, S., H. WEDGE et V. TER MEULEN. 1983. The biology of coronaviruses. *J Gen Virol* **64**:761-776.

SIDDELL, S., H. WEDGE et V. TER MEULEN. 1982. The structure and replication of coronaviruses. [Review] *Curr Top Microbiol Immunol* **99**:131-163.

SIDDELL, S., H. WEDGE, A. BARTHEL et V. TER MEULEN. 1981. Intracellular protein synthesis and the in vitro translation of coronavirus JHM mRNA. *Adv Exp Med Biol* **142**:193-207.

SIMKINS, R.A., P.A. WEILNAU, J. BIAS et L.J. SAIF. 1992. Antigenic variation among transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus strains detected with monoclonal antibodies to the S protein of TGEV. *Am J Vet Res* **53**:1253-1258.

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

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

SKINNER, M. et S. SIDDELL. 1984. Nucleotide sequencing of mouse hepatitis virus strain JHM messenger RNA 7. Adv Exp Med Biol 173:163-171.

SPAAN, W., D. CAVANAGH et M.C. HORZINEK, 1988. Coronaviruses: structure and genome expression. J Gen Virol 69:2939-2952.

STERN, D.F. et B.M. STEFFON. 1982. Biogenesis of avian infectious bronchitis virus virion protein. J Virol 44:794-803.

STOHLMAN, S.A., J.O. FLEMING, C.D. PATTON et M.M.C. LAI. 1983. Synthesis and subcellular localization of the murine coronavirus nucleocapsid protein. Virology 130:527-532.

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

STOHLMAN, S.A. et L.P. WEINER. 1978. Stability of neurotropic mouse hepatitis virus (JHM strain) during chronic infection of neuroblastoma cells. Arch Virol 57:53-61.

STROBL, B. et R. VLASAK. 1993. The receptor-destroying enzyme of influenza C virus is required for entry into target cells. Virology 192:679-682.

STORZ, J., X.M. ZHANG et R. ROTT. 1992. Comparison of hemagglutinating, receptor-destroying, and acetyl-esterase activities of avirulent and virulent bovine coronavirus strains. Arch Virol 125:193-204.

STORZ, J., G. HERRLER, D.R. SNODGRASS, K.A. HUSSAIN, X.M. ZHANG, M.A. CLARK et R. ROTT. 1991. Monoclonal antibodies differentiate between the haemagglutinating and the receptor-destroying activities of bovine coronavirus strains. J Gen Virol 72:2817-2820.

STORZ, J., R. ROTT et G. KALUZA. 1981. Enhancement of plaque formation and cell fusion of an enteropathogenic coronavirus by trypsin treatment. *Infect Immun* **31**:1214-1222.

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

STURMAN, L.S. et K.V. HOLMES. 1983. The molecular biology of coronavirus. *Adv Vir Res* **28**:35-112.

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

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

STURMAN, L.S. 1977. Structural proteins: effects of preparative conditions on the migration of protein in polyacrylamide gels. *Virology* **77**(2):637-49

SUGAWARA, K., F. KITAME, M. HOMMA et K. NAKAMURA. 1985. An assay for the receptor-destroying activity of influenza C virus. *Microbiol Immunol* **29**:1207-1217.

SUGAWARA, K., H. NISHIMURA, S. HONGO, Y. MURAKI, F. KITAME et K. NAKAMURA. 1993. Construction of an antigenic map of the hemagglutinin-esterase protein of influenza C virus. *J Gen Virol* **8**:1661-1666.

TAGUCHI, F., P.T. MASSA et V. TER MEULEN V. 1986. Characterization of a variant virus isolated from neural cell culture after infection of mouse coronavirus JHMV. *Virology* **155**:267-270.

TAKAHASHI, E., Y. INABA, K. SATO, Y. ITO, H. KUROGI, H. AKASHI, K. SATODA et T. OMORI. 1980. Epizootic diarrhoea of adult cattle associated with a coronavirus like agent. *Veterinary Microbiology* **5**:151-154.

TALBOT, P. et G. LEVY. 1995. State of the art:coronavirus. Trends in Microbiology 3:127-129.

TALBOT, P., 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 132:250-260.

TIJJSSEN, P., A.J. VERBEEK et S. DEA. 1990. Evidence of close relatedness between turkey and bovine coronaviruses. Adv Exp Med Biol 276:457-460.

TOMPKINS, W.A.F., A.W. WATRACH, J.D. SCHMALE, R.M. SCHULTZ et J.A. HARRIS. 1974. Cultural and antigenic properties of newly established cell strains derived from adenocarcinomas of human colon and rectum. J Natl Cancer Inst 52:101-106.

TOOZE, J., S. TOOZE et G. WARREN 1984. Replication of coronavirus MHV-A59 in sac- cells: determination of the first site of budding of progeny virions. Eur J Cell Biol 33:281-293.

TSUNEMITSU, H., H. YONEMICHI, T. HIRAI, T. KUDO, S. ONOE, K. MORI et M. SHIMIZU. 1991. Isolation of bovine coronavirus from feces and nasal swabs of calves with diarrhea. J Vet Med Sci 53:433-437.

TUBOLY, T., E. NAGY, J.R. DENNIS et J.B. DERBYSHIRE. 1994. Immunogenicity of the S protein of transmissible gastroenteritis virus expressed in baculovirus. Arch Virol 137: 55-67.

TYRRELL, D.A.J., J.D. ALMEIDA, C.H. CUNNINGHAM, W.R.. DOWDLE, M.S. HOFSTAD, K. McINTOSH et M. TEJIMA. 1975. Coronaviridae. Intervirology 5:76-82.

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

TYRRELL, D.A.J. et M.L. BYNOE. 1965. Cultivation of novel type of common-cold virus in organ culture. Br Med J 1:1467-1470.

VAUTHEROT, J.F., M.F.MADELAINE, P. BOIREAU et J LAPORTE. 1992. Bovine Coronavirus peplomer glycoprotein:detailed antigenic analysis of S1, S2 and HE. J Gen Virol 73:1725-1737.

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. Adv Exp Med Biol 173:117-132.

VERBEEK, A., S. DEA et P. TIJSSSEN. 1991. Genomic relationship between turkey and bovine enteric coronaviruses identified by hybridization with BCV or TCV specific cDNA probes.

VERBEEK, A., S. DEA et P. TIJSSSEN. 1990. Detection of bovine coronavirus in clinical specimens by hybridization with cDNA probes. Mol Cell Probes 4:107-120.

VERBEEK, A. et P. TIJSSSEN, 1990. Polymerase chain reaction for probe synthesis and for direct amplification in detection of bovine coronavirus. J Virol Methods 29:243-256.

VERBEEK, A. et P. TIJSSSEN. 1988. Biotinylated and radioactive cDNA probes in the detection by hybridization of bovine enteric coronavirus. Mol Cell Probes 2:209-223.

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

WEDGE, H., S. SIDDELL et T. Ver MEULEN. 1982. The biology and pathogenesis of coronaviruses. Cur Top Microbiol Immunol 99:165-200.

WEISMILLER, D.G., L.S. STURMAN, M.J. BUCHMEIER, J.O. FLEMING et K.V. HOLMES. 1990. Monoclonal antibodies to the peplomer glycoprotein of coronavirus mouse hepatitis virus identify two subunits and detect a conformational change in the subunit released under mild alkaline conditions. J Virol 64:3051-3055.

WEISS, S.R., S.A. HUGHES, P.J. BONILLA, J.D. TURNER, J.L. LEIBOWITZ et M.R. DENISON. 1994. Coronavirus polyprotein processing. *Arch Virol Suppl* **9**:349-358.

WILLIAMS, R.K., G.S. JIANG, S.W. SNYDER, M.F. FRANA et K.V. HOLMES. 1990a. Purification of the 110-kilodalton glycoprotein receptor for mouse hepatitis virus (MHV)-A59 from mouse liver and identification of a nonfunctional, homologous protein in MHV-resistant SJL/J mice. *J Virol* **64**:3817-3823.

WILLIAMS, R.K., SNYDER S.W. et K.V. HOLMES. 1990b. MHV-resistant SJL/J mice express a non-functional homolog to the MHV receptor glycoprotein. *Adv Exp Med Biol* **276**:45-50.

YARON, A. et F. NAIDER. 1993. Proline dependant structural and biological properties of peptides and proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **28**:31-80.

YOKOMORI, K. et M.M.C. LAI. 1992. Mouse hepatitis virus utilises two carcinoembryonic antigens as alternative receptors. *J Virol* **66**:6194-6199.

YOKOMORI, K., L.R. BANNER et M.M.C. LAI. 1991. Heterogenicity of gene expression of the hemagglutinin-esterase (HE) protein of murine coronavirus. *Virology* **183**:647-657.

YOO, D., M.D. PARKER, J. SONG, G.J. COX, D. DEREGT et L.A. BABIUK. 1991. Structural analysis of the conformational domains involved in neutralisation of bovine coronavirus using deletion mutants of the spike glycoprotein S1 subunit expressed by recombinant baculoviruses. *Virology* **183**:91-98.

YONG, S.J. et S. MAKINO. 1994. Evidence for coronavirus discontinuous transcription. *J Virol* **68**:2615-2623.

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

ZHANG, X., 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* **183**:397-404.

ZOLTICK, P.W., J.L. LEIBOWITZ, E.L. OLEZAK et S.R. WEISS. 1990. Mouse hepatitis virus ORF2A is expressed in the cytosol of infected mouse fibroblasts. *Virology* **174**:605-607.