



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

1991

GROUPEMENT DE FORMATION DOCTORALE "BIOLOGIE-MEDICAMENT"

THESE

présentée et soutenue publiquement

le 11 Juin 1991

pour obtenir le titre de

DOCTEUR de l'UNIVERSITE de NANCY I

par

Jocelyne COLLOMB



APPROCHE MOLECULAIRE ET PHYSICO-CHIMIQUE DE LA DETECTION
DU CORONAVIRUS ENTERIQUE BOVIN DANS L'ENVIRONNEMENT

MEMBRES DU JURY

Président	Professeur C. FINANCE	(NANCY I)
Rapporteurs	Professeur J.C. BLOCK	(NANCY I)
	Docteur J. LAPORTE	(INRA - PARIS)
Examineurs	Professeur L. SCHWARTZBROD	(NANCY I)
	Docteur M.C. LETT	(IBMC - STRASBOURG)



104 012667 0

MEMBRES DU PERSONNEL ENSEIGNANT

DOYEN : C. VIGNERON

VICE DOYEN : G. CATAU

PROFESSEURS HONORAIRES

M. BERNANOSE André
M^{lle} BESSON Suzanne
M^{lle} GIRARD Thérèse
M. MEUNIER André

M. MIRJOLET Marcel
M. PIERFITTE Maurice
M. RICHARD Georges
M. SOLEIL Jean

MAITRE DE CONFERENCES HONORAIRE

Mme BALDO Suzanne

PROFESSEURS

M. ATKINSON Jeffrey	Pharmacologie
M. BAGREL Alain	Biochimie
M ^{lle} BATT Anne-Marie	Toxicologie
M. BLOCK Jean Claude	Santé et Environnement
M. BONALY Roger	Chimie Biologique - Biochimie microbienne
Mme FINANCE Chantal	Microbiologie appliquée et industrielle
M ^{lle} GALTEAU M. Madeleine	Biochimie
Mme GOULON Chantal	Biophysique et Mathématiques
M. HAYON Jean Claude	Botanique
M. HOFFMAN Maurice	Pharmacie clinique
M. JACQUE Michel	Pharmacodynamie
M. LABRUDE Pierre	Physiologie
M. LALLOZ Lucien	Chimie organique
M. LECTARD Pierre	Biologie végétale et Cryptogamie
M. LEMAY René	Législation et Déontologie pharmaceutiques
M. LOPPINET Vincent	Chimie thérapeutique - Pharmacie chimique
M. MAINCENT Philippe	Pharmacie galénique
M. MARSURA Alain	Chimie thérapeutique - Pharmacie chimique
M. MARTIN Jean Armand	Chimie minérale et Minéralogie
M. MORTIER François	Pharmacognosie
M. NICOLAS Alain	Chimie analytique et Bromatologie
Mme SCHWARTZBROD Janine	Bactériologie - Immunologie - Parasitologie
M. SCHWARTZBROD Louis	Virologie - Immunologie - Parasitologie
M. SIEST Gérard	Biochimie pharmacologique
M. VIGNERON Claude	Hématologie

PROFESSEUR INVITE

M. TAGUCHI Tadao

MAITRES DE CONFERENCES

M. ARTUR Yves	Biochimie
Mme BAGREL Denyse	Biochimie
M. BAUDOT Philippe	Toxicologie
Mlle BENOIT Emmanuelle	Chimie analytique
M. BONNEAUX François	Chimie thérapeutique
Mme CAPDEVILLE - ATKINSON Christine	Pharmacodynamie
M. CATAU Gérard	Pharmacodynamie
M. CHEVIN Jean Claude	Chimie minérale
M. COULON Joël	Chimie biologique
M. DECOLIN Dominique	Chimie analytique
Mlle FRIANT Pascale	Mathématiques - Biophysique
Mme FUZELLIER Marie Claude	Pharmacognosie
Mlle HINZELIN Françoise	Biologie végétale - Pharmacognosie
Mme HOFFMAN M. Antoinette	Pharmacologie clinique
Mlle IMBS Marie Andrée	Bactériologie - Virologie
Mme KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacologie galénique
Mme LEJAILLE Marie France	Chimie analytique
M. LEROY Pierre	Chimie analytique et Bromatologie
Mme LETOT Michèle	Parasitologie
Mme LIVERTOUX M. Hélène	Toxicologie
Mme MARCHAND ARVIER Monique	Immunologie - Hématologie
M. MIGNOT Bernard	Physique
M. MONAL Jean Louis	Chimie thérapeutique
M. NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme PAULUS Francine	Physique - Informatique
Mme PERDICAKIS Christine	Chimie organique
Mme PICHON Virginie	Physique
Mme ROVEL Anne	Immunologie - Hématologie
Mme WELLMAN-ROUSSEAU Maria Monika	Biochimie

MAITRE DE CONFERENCES INVITE

M. GHERMANI Nour-Eddine Biophysique et Mathématiques

ASSISTANTS

Mme ALBERT Monique	Bactériologie - Virologie - Immunologie
Mme BERTHE M. Catherine	Chimie biologique
Mme COLLOMB Jocelyne	Parasitologie
M. DANGIEN Bernard	Botanique
M. MENU Patrick	Physiologie
Mme MOREAU Blandine	Pharmacognosie
Mme MOUREY Michèle	Cryptogamie
Mme PAVIS Annie	Parasitologie
M. TROCKLE Gabriel	Pharmacodynamie
Mme ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

M. MONTIGNY Frédéric	Mathématiques et Informatique Pharmaceutique
Mme MORIN Annick	Hématologie
Mme PONCET Florence	Anglais
M. VISVIKIS Athanase	Toxicologie

ALLOCATAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Mlle STRAZIELLE Nathalie	Biologie cellulaire
Mme THORIN Nathalie	Pharmacothèque

MONITEURS D'INITIATION A L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

M. AUZEIL Nicolas	Chimie thérapeutique
M. BOHR Frédéric	Mathématiques et Statistiques Appliquées - Biologie
Mme LEININGER Brigitte	Biochimie et Biologie Moléculaire
M. THOUAND Gérald	Biologie Cellulaire

DOCTEURS HONORIS CAUSA

M. HEIDELBERGER	NEW JERSEY - U.S.A.
M. BOVET Daniel	ROME - ITALIE
M. BLOCH Konrad E.	MASSACHUSETTS - U.S.A.
M. BETTOLO Marini	ROME - ITALIE
M. GHUYSEN Jean Marie	LIEGE - BELGIQUE
M. KOFOD Helmer	COPENHAGUE - DANEMARK
M. DUTTON Geoffrey J.	DUNDEE - ECOSSE
M. ANDERSON Norman G.	ILLINOIS - U.S.A.
M. PARRIS FARRAS Ramon	BARCELONE - ESPAGNE

PERSONNALITES EXTERIEURES CHARGEES DE COURS

M. AZRIA	Biochimie et Toxicologie
M. BARADEL	Conseils vétérinaires
Mme BLOCH	Conseils en officine - Gynécologie
M. CHARPIGNON	Gestion
M. DANOUX	Comptabilité
M. DEMANGE	Pharmacie hospitalière
Mme FEINTRENIE	Techniques de la communication
M. GAUNEL	Orthopédie
Mme GILGENKRANTZ	Biologie Cellulaire, Génétique
M. GIESENFELD	Pharmacie hospitalière
Mme LABAEYE	Audiologie
M. LAMOTTE	Physique
M. LOUIS	Séméiologie
M. LUCOTTE	Principes généraux de biotechnologie
Mlle MANGIN	Pharmacie hospitalière
M. MAUURY	Séméiologie
Mlle PICAUT	Pharmacie hospitalière
M. RETOURNARD	Physique
M. ROYER	Assurance de qualité
M. SIMON	Audiologie
M. TRECHOT	Pharmacovigilance
M. TURKAWKA	Relations humaines

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué dans les laboratoires de Madame le Professeur C. FINANCE et de Monsieur le Professeur L. SCHWARTZBROD, au département de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Nancy I.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Madame le Professeur C. FINANCE qui m'a accueillie dans son laboratoire et me fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Ce travail lui doit beaucoup. Elle a su m'encourager à persévérer dans ma recherche et me convaincre de l'achever. Ses conseils et son amitié m'ont été de précieux appuis.

Ma reconnaissance va également à Monsieur le Professeur L. SCHWARTZBROD qui a été à l'origine de ce travail et m'a prodigué de précieux conseils pour sa réalisation et la rédaction de ce mémoire. Je lui sais gré d'avoir accepté de siéger parmi les membres de ce jury.

Je souhaite remercier tout particulièrement le Docteur J. LAPORTE, Directeur de Recherche et Adjoint au Directeur Scientifique des Productions animales de l'INRA (Paris), qui m'a reçue dans son laboratoire à maintes reprises, m'offrant de grandes facilités pour mener à bien certaines étapes de ce travail. Il a accepté, malgré ses nombreuses obligations, d'être rapporteur de ce mémoire, je lui en suis profondément reconnaissante.

Je remercie sincèrement Monsieur le Professeur J.C. BLOCK (Laboratoire Santé et Environnement - Faculté de Pharmacie - Nancy I) qui s'est rendu disponible pour juger ce travail et en être le rapporteur.

Le Docteur M.C. LETT (Laboratoire de Microbiologie - Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du CNRS - Strasbourg) a également accepté de faire partie de ce jury. Qu'elle en soit chaleureusement remerciée.

Enfin, je remercie tous ceux qui m'ont aidée :

Le Docteur C. BRANLANT, Directeur de Recherche URA CNRS 457 (Faculté des Sciences - Nancy I) à qui je dois ma formation en génie génétique.

Monsieur le Professeur A. NICOLAS (Laboratoire de Chimie Analytique - Faculté de Pharmacie - Nancy I) pour son aide et ses conseils amicaux.

La Station de Virologie de l'INRA (Jouy-en-Josas), ainsi que le Laboratoire des Services Vétérinaires du département de Meurthe-et-Moselle, qui m'ont procuré les échantillons biologiques nécessaires aux expérimentations.

Madame G. JARZEBSKA qui a assuré avec beaucoup de patience et de gentillesse la frappe de ce mémoire.

Tous mes collègues et amis du laboratoire auprès desquels j'ai trouvé une ambiance de travail amicale.

SOMMAIRE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	1
LES CORONAVIRUS.....	4
I - BIOLOGIE ET PATHOGENIE.....	4
II - ORGANISATION ET STRUCTURE DES CORONAVIRUS.....	10
2.1 L'ARN génomique.....	12
2.2 Les protéines structurales.....	12
III - REPLICATION DES CORONAVIRUS.....	21
3.1 Adsorption et pénétration du virus.....	21
3.2 Synthèse des ARN viraux.....	22
3.3 Synthèse des protéines structurales.....	25
3.4 Assemblage et libération des virions.....	26
CORONAVIROSE BOVINE.....	28
I - PHYSIOPATHOLOGIE.....	29
II - SYMPTOMATOLOGIE.....	30
III- EPIDEMIOLOGIE.....	32
IV - DIAGNOSTIC.....	34
V - PROPHYLAXIE.....	39
BUT DU TRAVAIL.....	42
MATERIEL ET METHODES.....	46
MATERIEL.....	47
I - SOUCHES MICROBIENNES.....	47
1.1 Souches virales.....	47
1.2 Souches bactériennes.....	47
II - CELLULES HRT 18.....	48
III - MILIEUX DE CULTURE.....	48
3.1 Milieu de culture bactérienne.....	48
3.2 Milieu de culture cellulaire.....	48
IV - ENZYMES ET LEUR TAMPON.....	49
V - REACTIFS.....	50

VI - EQUIPEMENT	54
6.1 Appareillage	54
6.2 Petit matériel.....	55
METHODES.....	56
I - PRODUCTION DU CORONAVIRUS ENTERIQUE BOVIN.....	56
1.1 Culture des cellules HRT 18.....	56
1.2 Production du virus	56
1.3 Marquage isotopique des particules virales.....	57
1.4 Titrage du virus par la technique des plages.....	57
1.5 Purification du virus	58
II - PREPARATION DE L'ARN GENOMIQUE VIRAL	58
III - PREPARATION DES AMORCES ALEATOIRES.....	59
IV - CLONAGE DE L'ARN GENOMIQUE VIRAL	60
4.1 Synthèse d'un hétéroduplex ARN-ADNc.....	60
4.2 Insertion de l'hétéroduplex ARN-ADNc dans un vecteur de clonage.....	61
4.3 Transformation de la souche <i>E. coli</i> RR1 par un plasmide.....	63
V - TECHNIQUES DE PREPARATION ET D'ANALYSE DES PLASMIDES.....	64
5.1 Minipréparations	64
5.2 Maxipréparations	64
5.3 Digestion par les enzymes de restriction.....	65
5.4 Electrophorèse en gel d'agarose.....	66
5.5 Electroélution.....	66
VI - TECHNIQUES D'HYBRIDATION MOLECULAIRE.....	67
6.1 Préparation des sondes.....	67
6.2 Préparation des échantillons à hybrider.....	68
6.3 Dépôt des échantillons sur membrane de nitrocellulose.....	70
6.4 Hybridation.....	71
VII - PURIFICATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX SPECIFIQUES DU BECV.....	73
7.1 Précipitation des ascites au sulfate d'ammonium à 50 % de saturation.....	73
7.2 Purification des immunoglobulines sur protéine A-sépharose	73
7.3 Contrôle de la qualité des anticorps monoclonaux purifiés..	74

VIII - CONCENTRATION DES CORONAVIRUS PRESENTS DANS LE MILIEU HYDRIQUE	77
8.1 Concentration par immunoaffinité.....	77
8.2 Concentration par adsorption-élution sur poudre de verre.....	79
RESULTATS - DISCUSSIONS	83
 DEVELOPPEMENT DE SONDES MOLECULAIRES POUR LA DETECTION DU CORONAVIRUS ENTERIQUE BOVIN.....	 85
 I - CLONAGE DE L'ARN GENOMIQUE.....	 85
1.1 Préparation de l'ARNg matriciel.....	87
1.2 Synthèse de l'ADNc.....	87
1.3 Insertion de l'hétéroduplex dans un vecteur de clonage	91
1.4 Clonage des plasmides recombinés dans la souche <i>E. coli</i> RR1.....	93
1.5 Analyse des clones recombinants.....	95
II - DETECTION DU CORONAVIRUS ENTERIQUE BOVIN PAR HYBRIDATION MOLECULAIRE AVEC UNE SONDE D'ADNc.....	95
2.1 Préparation des sondes.....	98
2.2 Hybridation moléculaire avec une sonde d'ADNc marquée au ³² P	99
2.3 Hybridation moléculaire avec une sonde d'ADNc marquée à la peroxydase.....	115
2.4 Application du test d'hybridation moléculaire à la recherche du BECV dans les fécès.....	124
III - DISCUSSION.....	126
3.1 Clonage de l'ARN génomique	126
3.2 Test d'hybridation moléculaire.....	127
 RECHERCHE DU CORONAVIRUS ENTERIQUE BOVIN DANS LE MILIEU HYDRIQUE	 135
 I - DETECTION DU BECV DANS LE MILIEU HYDRIQUE APRES CONCENTRATION PAR IMMUNOAFFINITE.....	 135
1.1 Obtention de l'immunoabsorbant.....	136
1.2 Concentration des coronavirus par immunoaffinité	151
1.3 Discussion.....	156

II - DETECTION DU BECV DANS LE MILIEU HYDRIQUE APRES CONCENTRATION PAR ADSORPTION-ELUTION SUR POUDRE DE VERRE.....	158
2.1 Production et purification du BECV marqué au ¹⁴ C.....	160
2.2 Détermination des conditions optimales d'adsorption-élution.....	162
2.3 Recherche du BECV à partir d'échantillons d'eau.....	174
2.4 Discussion.....	180
CONCLUSION.....	184
ANNEXES	190
BIBLIOGRAPHIE.....	195

FIGURES

Figure	1 : Structure du coronavirus.....	9
	2 : Structure de la glycoprotéine transmembranaire M.....	14
	3 : Structure de la glycoprotéine du péplomère S.....	16
	4 : Mécanisme de réplication du coronavirus.....	20
	5 : Organisation des ARNm viraux.....	23
	6 : Incidence des différentes causes de diarrhée en fonction de l'âge du veau.....	27
	7 : Répartition de 46 cas de coronavirose en fonction de l'âge du veau.....	31
	8 : Evolution du taux des anticorps dans le lait et le colostrum....	38
	9 : Schéma de l'appareil de filtration sur poudre de verre.....	80
	10 : Production de sondes à partir d'un ARN.....	84
	11 : Stratégie de clonage de l'ARNg.....	86
	12 : Analyse des brins d'ADNc synthétisés par électrophorèse en gel d'agarose alcalin.....	88
	13 : Carte de restriction sommaire des clones sélectionnés sur le génome.....	94
	14 : Différentes étapes de la technique d'hybridation moléculaire sur support (<i>dot</i> ou <i>slot blot</i>).....	97
	15 : Essais préliminaires : spécificité de la sonde 174 marquée au ³² P. Détection de l'ARN viral à partir de cultures de cellules infectées.....	101
	16 : Essais préliminaires : sensibilité de la sonde 174 marquée au ³² P. Détection de l'ARNg du BECV.....	103
	17 : Essais préliminaires : influence de différents traitements sur la détection du BECV produit en culture de cellules HRT 18 par la sonde marquée au ³² P.....	105
	18 : Sensibilité de la sonde 174 marquée au ³² P. Détection de l'ARNg du BECV.....	108
	19 : Amplification du signal de détection avec un mélange de sondes radioactives.....	110
	20 : Détection par la sonde 174 marquée au ³² P de l'ARN viral dans le surnageant de culture de cellules infectées.....	112
	21 : Principe du système de détection de gène ECL.....	116

Figure	22 : Sensibilité de la sonde 174 marquée à la peroxydase vis-à-vis de l'ARNg du BECV	118
	23 : Amplification du signal de détection avec un mélange de sondes marquées à la peroxydase.....	120
	24 : Détection par la sonde 174 marquée à la peroxydase de l'ARN viral dans le surnageant de culture de cellules infectées.....	122
	25 : Détection du BECV dans les fécès de veaux par hybridation moléculaire avec la sonde 174 marquée au ³² P	125
	26 : Profil de purification de l'ascite I ₂₀ sur protéine A-sépharose	140
	27 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS des fractions obtenues au cours de la purification des IgG présentes dans une ascite I ₂₀	142
	28 : Caractérisation des IgG isolées après purification sur protéine A-sépharose par double diffusion en milieu gélifié.....	144
	29 : Schéma réactionnel de l'immobilisation des anticorps sur le Magnogel AcA44 par couplage au glutaraldéhyde.....	148
	30 : Capacité d'adsorption de l'immunoabsorbant après plusieurs utilisations successives.....	154
	31 : Purification du BECV. Analyse du gradient après centrifugation isopycnique.....	159
	32 : Adsorption du BECV sur la poudre de verre. Détermination du rendement d'adsorption exprimé en % en fonction du pH de l'eau à analyser.....	161
	33 : Influence de la quantité de poudre de verre et de la présence de AlCl ₃ sur l'adsorption du BECV.....	163
	34 : Rendement moyen d'adsorption	165
	35 : Elution du BECV de la poudre de verre	167
	36 : Influence du pH sur la viabilité du BECV en fonction du temps.....	169
	37 : Influence du pH sur l'adsorption, l'élution, l'infectiosité du BECV	171
	38 : Concentration du BECV par la technique d'adsorption-élution sur poudre de verre. Détermination du rendement par mesure de la radioactivité liée aux virus élués.....	175
	39 : Mise en évidence du BECV dans le milieu hydrique par hybridation moléculaire.....	178

TABLEAUX

Tableau I : Coronavirus : nom, hôte naturel et maladies prédominantes.....	3
II : Classification antigénique des différentes espèces de coronavirus	6
III : Caractères généraux et propriétés physico-chimiques des coronavirus	11
IV : Diagnostic expérimental des entérites néonatales du veau.....	36
V : Rendement de synthèse de l'ADNc en fonction du type d'amorce utilisé	90
VI : Sélection des clones recombinants à l'aide de marqueurs de résistance aux antibiotiques.....	92
VII : Analyse par test ELISA des échantillons fécaux.....	125
VIII : Analyse comparative des résultats obtenus avec les deux types de marquage de la sonde d'ADNc 174	128
IX : Pourcentage d'homologie des séquences nucléotidiques des gènes codant pour les protéines N et M du BECV vis-à-vis de celles d'autres coronavirus	133
X : Etude comparée des techniques de marquage et d'hybridation moléculaire en fonction du type de sonde	132
XI : Spécificité des anticorps monoclonaux anticoronavirus entérique bovin utilisés.....	138
XII : Contrôle de l'activité biologique des IgG purifiées par immunofluorescence indirecte (IFI) et ELISA.....	146
XIII : Concentration du BECV par passage sur immunoabsorbant. Elution par l'eau distillée ou en tampon glycine pH acide.....	150
XIV : Rendement d'adsorption-élution obtenu dans les conditions optimales de pH.....	173

ABREVIATIONS

AA	Acide aminé
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
Amp	Ampicilline
ARNg	Acide ribonucléique génomique
BECV	Coronavirus entérique bovin
BEt	Bromure d'éthidium
BSA	Sérum albumine bovine
CFU	Colonie formant unité
DCP 50	Dose cytopathique 50 %
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	Désoxyribonucléotides (N : A, T, C, G)
DTT	Dithiothréitol
EBDS	Eau bidistillée stérile
ECL	Enhanced chimiluminescence
ECP	Effet cytopathique
EDTA	Acide éthylène diamine tétracétique
IBV	Virus de la bronchite infectieuse aviaire
kb	Kilobases
MHV	Virus de l'hépatite de la souris
MOPS	Acide sulfonique de morpholinopropane
Mr	Masse moléculaire relative
NPP	Nombre le plus probable
NP-40	Nonidet P-40
pb	Paire de bases
pHi	Point isoélectrique
poly dC	Polydésoxycytidine
poly dG	Polydésoxyguanidine
RER	Réticulum endoplasmique rugueux
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
SVF	Sérum de veau foetal
TCA	Acide trichloracétique
TdT	Désoxynucléotidyl transférase terminale
Tet	Tétracycline
TGEV	Virus de la gastroentérite du porcelet
UFP	Unité formant plaque
UV	Ultra-violet



ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Le coronavirus entérique bovin (BECV) est l'un des principaux agents responsables d'entérites néonatales chez le veau. Il appartient à la famille des *Coronaviridae* à laquelle il a été rattaché sur la base de ses caractères morphologiques (STAIR *et al.* - 1972), de ses relations antigéniques (PEDERSEN *et al.* - 1978) et de sa composition polypeptidique (LAPORTE et BOBULESCO - 1981b ; KING et BRIAN - 1982).

La famille des *Coronaviridae* est constituée de virus impliqués dans des maladies très diverses pouvant affecter de nombreuses espèces parmi les oiseaux et les mammifères. Certaines de ces affections sont connues depuis longtemps, comme la bronchite infectieuse aviaire, la gastroentérite transmissible du porcelet ou l'encéphalomyélite démyélinisante de la souris. Cependant, ce n'est qu'en 1968 que ces virus ont été reconnus en tant que groupe taxonomique distinct sous la dénomination de coronavirus. Ce nom a été suggéré par leur morphologie particulière telle qu'elle apparaît en microscopie électronique car ces virus présentent à leur surface une frange de spicules évoquant une couronne solaire ou la couronne d'épines de l'art religieux (*corona spinarum*).

C'est en 1975 que le Comité International de Nomenclature des Virus approuva la création d'une famille nouvelle, famille des *Coronaviridae* comprenant le seul genre coronavirus et dont le prototype est le virus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV) (TYRRELL *et al.* - 1975).

La difficulté d'obtenir *in vitro* la multiplication des coronavirus a été, pendant plusieurs années, un obstacle majeur à la progression dans la connaissance de ce groupe. Ces difficultés permettent d'expliquer que certains coronavirus se multipliant relativement bien *in vitro*, comme le virus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV) ou le virus de l'hépatite murine (MHV), aient été davantage étudiés que d'autres membres du groupe. Toutefois, au cours de ces dernières années, l'utilisation des techniques de génie génétique a permis une meilleure connaissance de la structure, des processus de réplication et de la pathogénie de ces virus. Les problèmes rencontrés pour isoler des coronavirus présents chez des malades continuent cependant, encore actuellement, à retarder les recherches sur l'épidémiologie et la pathogénie des infections à coronavirus.

Tableau I : Coronavirus : nom - hôte naturel et maladies prédominantes

Virus	Désignation *	Hôte	Maladies
Virus de la bronchite infectieuse	IBV	Poulet	Maladies respiratoires - néphrite
Virus de l'hépatite murine	MHV	Souris	Hépatite - encéphalomyélite - entérite - pneumonie
Coronavirus bovin	BCV	Veau	Entérite
Coronavirus humain	HCV	Homme	Maladies respiratoires
Virus de la gastroentérite transmissible	TGEV	Porc	Entérite
Virus hémagglutinant de l'encéphalomyélite	HEV	Porc	Encéphalomyélite - entérite
Coronavirus du rat	RCV	Rat	Pneumonie - rhinotrachéite
Virus de la sialodacryoadénite	SDAV	Rat	Sialodacryoadénite
Coronavirus canin	CCV	Chien	Entérite
Virus de la péritonite infectieuse féline	FIPV	Chat	Péritonite
Coronavirus de l'entérite du chat	FECV	Chat	Entérite
Coronavirus de la dinde	TCV	Dinde	Entérite
Coronavirus du lapin	RbCV	Lapin	Entérite
Membres possibles			
Coronavirus entérique humain	HECV	Homme	Entérite
Coronavirus porcine CV-777	CV-777	Porc	Entérite
Coronavirus de l'entérite du poulain	FECV	Cheval	Entérite
Isolats SD-SK	SD, SK	Souris-Homme	Encéphalomyélite chez la souris

* Les abréviations indiquées sont celles employées dans la littérature en langue anglaise.

Les coronavirus sont reliés entre eux par des caractères morphologiques, structuraux et biologiques communs. Ils développent notamment la même stratégie originale de réplication. Ce sont ces caractéristiques communes qui seront présentées dans la première partie de cette étude bibliographique.

La deuxième partie sera consacrée plus précisément au coronavirus entérique bovin (BECV), à l'étude de son pouvoir pathogène, de son rôle dans l'étiologie de la diarrhée du veau nouveau-né, ainsi qu'aux perspectives en matière de diagnostic biologique et de prophylaxie.

LES CORONAVIRUS

I - BIOLOGIE ET PATHOGENIE

Les membres de la famille monogénérique des *Coronaviridae* sont répandus dans le monde entier et infectent tous des vertébrés, oiseaux et mammifères ainsi que l'homme. Ces coronavirus sont répertoriés dans le tableau I avec mention de leur hôte naturel et des principales maladies qu'ils provoquent chez cet hôte. D'autres coronavirus ont été décrits qui peuvent être ajoutés à cette liste comme membres possibles mais n'ont pas encore été officiellement classés dans la famille des *Coronaviridae*.

Les coronavirus des animaux, en particulier le virus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV) et le virus de l'hépatite murine (MHV), responsable d'entérites mais également d'affections respiratoires et neurologiques, ont servi de modèle pour l'étude de la pathogénicité des coronavirus (WEGE *et al.* - 1982).

Les coronavirus ont un hôte naturel spécifique et cette spécificité d'espèce, en général assez stricte, se retrouve également *in vitro* en culture cellulaire (SIDDELL *et al.* - 1982). Chez cet hôte naturel, la plupart des coronavirus manifestent un tropisme sélectif pour un type de cellule, les organes cibles étant limités à un appareil (PENSAERT et CALLEBAUT - 1978). L'appareil respiratoire pour les virus IBV et RCV, ainsi que le tractus digestif pour le TGEV, BECV, TCV ou CCV et certaines souches du MHV, sont les plus fréquemment touchés.

Les cellules cibles sont des cellules épithéliales : épithélium cilié de la muqueuse nasale, de la trachée, des bronches ou des alvéoles pulmonaires

pour les coronavirus de l'appareil respiratoire, les entérocytes différenciés de la muqueuse intestinale pour les coronavirus entéropathogènes (WEGE *et al.* - 1982). D'autres coronavirus, comme le virus porcin HEV ou certaines souches du coronavirus murin (MHV-JHM) présentent un tropisme marqué pour le tissu nerveux et sont associés à des encéphalomyélites. Toutefois, le coronavirus félin FIPV est capable de se développer dans un grand nombre d'organes. De même, les nombreuses souches du MHV qui ont été isolées présentent des tropismes très divers.

La transmission de ces affections est assurée principalement par les voies respiratoires supérieures ou par la voie oro-fécale. La possibilité d'une infection intra utérine a été rapportée pour l'IBV et certaines souches du MHV (SIDDELL *et al.* - 1983a). La transmission indirecte par l'intermédiaire d'arthropodes vecteurs n'a pas été démontrée bien que le rôle de certaines tiques, dans la contamination d'oiseaux de mer en Norvège, ait été évoqué (TRAAVIK *et al.* - 1977). La transmission par l'intermédiaire du matériel et de vêtements contaminés semble être une source d'infection importante dans le cas des coronavirus bovin (BECV) et aviaire (IBV) (SIDDELL *et al.* - 1983a).

Le site primaire de réplication de toutes les affections à coronavirus semble être l'épithélium respiratoire ou intestinal, et ceci même quand d'autres cellules sont la cible secondaire du virus au cours de l'évolution de la maladie tels que les hépatocytes et les macrophages avec le virus félin FIPV et différentes souches du virus murin MHV ou tels encore les neurones dans le cas du virus porcin HEV ou de certaines souches du MHV (SIDDELL *et al.* - 1983b).

Les coronavirus sont responsables d'affections aiguës qui apparaissent souvent sous forme d'épizooties saisonnières et qui sont d'autant plus sévères qu'elles touchent, en général, de jeunes animaux. Les manifestations physiopathologiques observées ont pour cause principale l'attaque et la lyse des cellules cibles. La réponse immunitaire locale par la production d'anticorps sécrétoires constitue la principale défense des organismes atteints contre l'attaque épithéliale.

Certains coronavirus, comme le MHV et l'IBV, sont à l'origine de maladies persistantes chroniques ou subaiguës (LE PREVOST *et al.* - 1975 ; VIRELIZIER *et al.* - 1975 ; STOHLMAN et WEINER - 1981), qui peuvent s'observer également, *in vitro*, en culture cellulaire (HOLMES et BEHNKE - 1981 ; SORENSEN *et al.* - 1981)

On dispose de peu d'informations sur les processus qui aboutissent à l'installation et au maintien d'affections persistantes. Les seules données dont

Tableau II : Classification antigénique des différentes espèces de coronavirus
(adapté de WEGE *et al.* - 1982 ; HOLMES - 1986)

Groupe antigénique		Virus
MAMMIFERES	I	- HCV-229E et autres souches apparentées - TGEV - CCV - FIPV - FECV
	II	- HCV-OC43 et autres souches apparentées - MHV (nombreux sérotypes) également relié au RCV et SDAV - BCoV - HEV - RbCV
AVIAIRES	III	IBV (nombreux sérotypes)
	IV	TCV
non classés		- HECV - CV-777

nous disposons sur les mécanismes pathogéniques des affections aiguës et chroniques concernent essentiellement le virus MHV et le modèle murin qui sont l'objet de nombreuses études (TER MEULEN - 1987). Plusieurs facteurs ont une incidence sur l'évolution de la maladie. Certains dépendent de l'hôte comme l'âge, la modulation de la réponse immunitaire par l'infection des macrophages (WEGE *et al.* - 1982), les mécanismes génétiques. Ainsi, la sensibilité de la souris au MHV₃ serait sous l'influence d'au moins deux gènes majeurs : l'un concernant les manifestations aiguës, l'autre associé à la région H-2 des gènes responsables des fonctions des cellules T pour les maladies chroniques (STOHLMAN et FRELINGER - 1978 ; LEVY-LEBLOND *et al.* - 1979). D'autres facteurs dépendent du virus telles les propriétés biologiques de la souche utilisée, la dose et la voie d'inoculation ou l'apparition éventuelle de souches mutantes (KNOBLER *et al.* - 1982).

Les infections à coronavirus ne se caractérisent pas toujours par l'apparition de symptômes cliniques. De nombreux virus (MHV, FIPV, TGEV, IBV) sont entretenus et se propagent sous forme d'affections inapparentes, ce qui explique la grande dispersion de ces virus dans la nature, l'hôte naturel étant ainsi le principal réservoir de virus.

L'étude sérologique des coronavirus à l'aide de méthodes d'immunofluorescence, séroneutralisation, ELISA et immunoélectromicroscopie, a permis leur classement en quatre groupes antigéniques distincts (tableau II). Deux de ces groupes concernent les coronavirus des mammifères et les deux autres les coronavirus aviaires. Ces derniers n'ont aucune relation antigénique entre eux ni avec d'autres coronavirus (SIDDELL *et al.* - 1983b ; STURMAN et HOLMES - 1983). Dans chaque groupe, il existe des réactions antigéniques croisées entre les virus, mais ceux-ci diffèrent les uns des autres par leur spécificité d'hôte et les syndromes qu'ils induisent (HOLMES - 1986).

Chez l'homme, le rôle des coronavirus dans le développement des affections des voies respiratoires supérieures est connu depuis longtemps (TYRRELL et BYNOE - 1965 ; ALMEIDA et TYRRELL - 1967). Plusieurs souches de coronavirus respiratoire humain (HCV) ont été isolées et classées en deux groupes en fonction de leurs relations antigéniques : l'un de ces groupes est relié au virus HCV-229E et l'autre au virus HCV-0C43, ces deux souches appartenant à des groupes antigéniques distincts (tableau II).

Ces coronavirus sont associés à un banal rhume de cerveau qui s'observe avec une plus grande fréquence en hiver et au printemps. Des études séroépidémiologiques ont montré que 15 à 20 % des infections des voies

respiratoires supérieures chez l'homme sont dues à des coronavirus (HOLMES - 1986). Le HCV a cependant été retrouvé dans des affections respiratoires plus sévères au cours de pneumonies observées chez l'enfant (Mc INTOSH *et al.* - 1974) et même chez de jeunes recrues militaires (Mc INTOSH - 1990).

Des coronavirus ont également été retrouvés dans des prélèvements fécaux chez l'homme (CAUL et EGGLESTONE - 1977), ce qui n'est pas surprenant si l'on considère le rôle important joué par un grand nombre de coronavirus dans l'apparition d'entérites chez l'animal. Leur implication dans les infections entériques chez l'homme n'est cependant pas clairement établie. Au cours d'études prospectives ou de cas sporadiques de diarrhée, des coronavirus humains ou des particules ressemblant à des coronavirus (CVLPs) ont été fréquemment retrouvés dans les selles d'adultes ou d'enfants dans le monde entier. Une excrétion fécale souvent prolongée est courante, ce qui rend difficile toute estimation du début de l'excrétion et de sa relation avec la maladie. De plus, comme chez l'animal, l'excrétion des coronavirus peut être asymptomatique, ce qui est fréquent dans les pays tropicaux (Mc INTOSH - 1990). L'isolement et la multiplication *in vitro* du coronavirus entérique humain (HECV) est difficile à obtenir et aucun test de diagnostic n'a été développé permettant d'évaluer le rôle de ces virus dans l'étiologie des entérites humaines. Cependant, ces virus ont été associés de façon significative à plusieurs épidémies d'entérocolite ulcéronécrosante du nouveau-né dont l'étiologie était jusque-là inconnue (MOSCOVICI *et al.* - 1980 ; CHANY *et al.* - 1982 ; VAUCHER *et al.* - 1982).

Plusieurs souches du HECV caractérisées par immunomicroscopie électronique seraient reliées, sur le plan antigénique, au HCV-0C43 (Mc INTOSH - 1990).

Des coronavirus pourraient également jouer un rôle dans certaines maladies neurologiques de l'homme. Deux coronavirus ont été isolés du cerveau de patients atteints de sclérose multiple. Ces virus SD et SK auraient des relations sur le plan antigénique et génétique avec le MHV-A59 et le HCV-0C43 (GERDES *et al.* - 1981 ; WEISS - 1983).

Si, dans la nature, les coronavirus manifestent une spécificité d'hôte, leur transmission à d'autres espèces peut cependant être obtenue soit expérimentalement, soit pour certaines souches, par la voie naturelle de l'infection. Cependant, la transmission à d'autres hôtes conduit à des affections inapparentes ou non représentatives de l'affection naturelle observée chez l'hôte spécifique (WEGE *et al.* - 1982). C'est ainsi que les coronavirus aviaires,

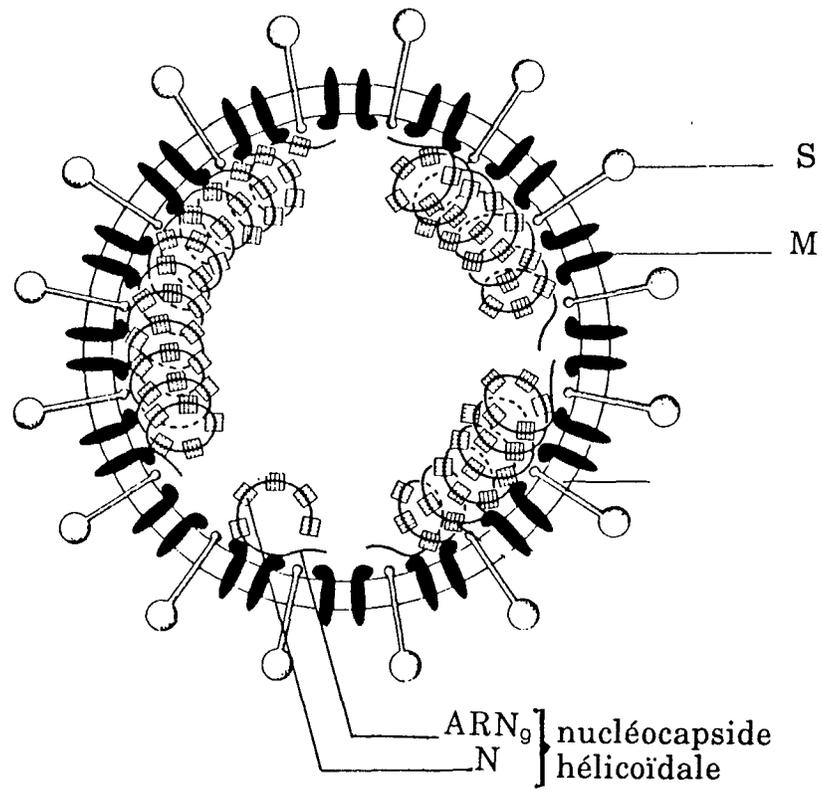


Fig. n° 1 : Structure du coronavirus (d'après HOLMES - 1986).

N : protéine de la nucléocapside

M : protéine de la matrice

S : protéine du péplomère

humains et de nombreux mammifères, sont transmissibles à la souris par inoculation intracérébrale (OSTERHAUS *et al.* - 1978 ; AKASHI *et al.* - 1981 ; ESTOLA - 1967). La spécificité d'hôte semble moins stricte pour les coronavirus entériques que pour les coronavirus respiratoires. Ainsi, le virus porcin TGEV peut se répliquer chez le chien, le renard et le chat (LARSON *et al.* - 1979) et le coronavirus canin (CCV) chez le porc. STORZ et ROTT (1981) ont décrit un cas accidentel de diarrhée chez l'homme provoqué par une infection par le coronavirus bovin (BECV). A l'inverse, le passage du coronavirus entérique humain (HECV) à l'espèce bovine semble possible (PATEL *et al.* - 1982 ; BOBULESCO - 1983).

II - ORGANISATION ET STRUCTURE DES CORONAVIRUS

L'observation en microscopie électronique, après coloration négative de prélèvements cliniques ou de cultures de cellules infectées, révèle la morphologie caractéristique des coronavirus.

Ce sont des particules pléiomorphes, le plus souvent sphériques, de taille comprise entre 60 et 220 nm et présentant fréquemment une dépression centrale opaque aux électrons. Elles sont entourées d'une enveloppe lipoprotéique hérissée de projections de surface (les péplomères), renflées à leur extrémité et d'environ 20 nm de long (SIDDELL *et al.* - 1982).

Des différences morphologiques sont observées selon l'espèce. Le BECV et parfois aussi le MHV ou le HEV possèdent deux types distincts de péplomères, de longueur différente, alors que le TGEV n'en possède qu'un seul type (STURMAN et HOLMES - 1983). Ces péplomères peuvent être facilement dégradés par un traitement à la bromélaïne rendant ces virions non infectieux. Un traitement par des détergents (NP-40 ou triton X100) permet la mise en évidence d'une nucléocapside hélicoïdale interne.

Les nombreuses études réalisées, et concernant surtout le MHV et l'IBV, ont permis d'établir un modèle structural identique pour tous les coronavirus (fig. n° 1). Il comprend :

- une enveloppe virale constituée de deux types de protéines M et S, associées à des glycoaminoglycanes, et implantées dans une double couche de lipides dont la composition reflète le type de cellules dans lequel le virus s'est répliqué.
- une nucléocapside interne qui associe une molécule d'ARN génomique (ARNg) et la protéine de la capsid N.

Tableau III : Caractères généraux et propriétés physico-chimiques des coronavirus

Structure	<ul style="list-style-type: none"> - virion sphérique 100 nm de diamètre - enveloppé, présence de spicules - nucléocapside hélicoïdale 10-20 nm de diamètre
Génome	<ul style="list-style-type: none"> - ARN monobrin de polarité positive - Mr : $5,5.10^6$ en moyenne - polyadénylé, structure cap en 5' - fonctionne comme un ARNm
Protéines structurales	<ul style="list-style-type: none"> - glycoprotéine du péplomère S (180 à 200 k) - glycoprotéine de la matrice M (20 à 30 k) - phosphoprotéine de la nucléocapside N (50 à 60 k)
Propriétés physico-chimiques	<ul style="list-style-type: none"> - densité de 1,16 à 1,23 en saccharose et de 1,23 à 1,24 en chlorure de césium - <u>coefficient de sédimentation</u> variable selon l'espèce : HCV : 380 S ; IBV : 330 S ; TGEV : 495 S - <u>sensibilité au pH</u> : stabilité maximale entre pH 6 et pH 7 Les coronavirus entériques sont stables à pH 2 - <u>sensibilité à la température</u> : inactivation rapide à 56°C, perte d'infectiosité (facteur 100) après séjour de 24 h à 37°C ou de 30 jours à 4°C conservation à - 80°C - <u>sensibilité aux solvants organiques</u> : solubilisés par le chloroforme et l'éther - <u>sensibilité aux antiseptiques et aux détergents</u> : inactivés par l'éthanol 70 %, le SDS et les détergents courants - <u>radiations</u> : inactivés par les rayons UV

2.1 L'ARN génomique

Le génome des coronavirus est constitué d'une molécule d'ARN monobrin, non segmenté, qui est complexé à la protéine de la capsid N pour former une ribonucléoprotéine de structure hélicoïdale (fig. n° 1).

La masse moléculaire du génome varie de $5,4 \cdot 10^6$ pour le MHV (LAI et STOHLMAN - 1978 ; WEGE *et al.* - 1978) à $6,8 \cdot 10^6$ pour le TGEV et le BECV (BRIAN *et al.* - 1980). Cet ARN est de polarité positive et donc infectieux. Il possède une structure "cap" à son extrémité 5' et une chaîne polyadénylique de 70 à 90 résidus adénylate à son extrémité 3' qui en font un ARN messager potentiel (SIDDELL - 1986).

Ces dernières années, la séquence nucléotidique complète de l'ARNg de l'IBV a été déterminée (BOURSNELL *et al.* - 1987) ainsi que les séquences partielles à partir de l'extrémité 3' de l'ARNg d'autres coronavirus comme le MHV, le TGEV ou le BECV (SPAAN *et al.* - 1988). Ces études montrent que le génome viral est constitué de 27 000 à 30 000 nucléotides, ce qui en fait le plus long ARNg connu à ce jour. Il est constitué de 6 ou 7 régions, chacune présentant un ou plusieurs cadres de lecture ouverts, séparés par des séquences intergéniques contenant les signaux pour la transcription de nombreux ARNm subgénomiques. Les cadres de lecture codant pour les protéines structurales M, N et S du virion ont été identifiés. A l'extrémité 5' de l'ARNg de l'IBV, une région constituant les deux tiers de la longueur du génome semble correspondre à un seul gène codant très vraisemblablement pour des ARN polymérase ARN dépendantes.

2.2 Les protéines structurales

Tous les coronavirus possèdent trois protéines structurales majeures :

- la protéine de la nucléocapside (N)
- une glycoprotéine de membrane (M ou E1)
- une glycoprotéine constitutive des spicules (S ou E2)

Un petit nombre de coronavirus possèdent une glycoprotéine supplémentaire (HE, H, HA, E3 ou gp65).

Seules les lettres N - M - S - HE sont actuellement recommandées pour la nomenclature de ces protéines (CAVANAGH *et al.* - 1990).

2.2.1 Structure

Protéine de la nucléocapside N

La protéine N, de masse moléculaire 50 à 60 k, est interne et associée à l'ARN génomique formant ainsi une ribonucléoprotéine constitutive de la nucléocapside (KAPKE et BRIAN - 1986).

Elle est phosphorylée au niveau des résidus sérine. Une activité protéine kinase a été associée à la particule virale du coronavirus murin MHV-JHM purifié. Cette enzyme aurait les caractéristiques d'une protéine kinase AMP cyclique indépendante et pourrait assurer la phosphorylation de la protéine N (SIDDELL *et al.* - 1981).

La séquence en acides aminés de la protéine N est déterminée pour le MHV (AMSTRONG *et al.* - 1983), l'IBV (BOURSNELL *et al.* - 1985), le TGEV (KAPKE et BRIAN - 1986) et le BECV (LAPPS *et al.* - 1987 ; CRUCIERE et LAPORTE - 1988). La protéine est basique avec une région C terminale hydrophile, riche en résidus acides. Les résidus sérine constituent 8 à 10 % du nombre total des acides aminés.

Les résidus basiques sont répartis en cinq domaines au niveau desquels se ferait la liaison protéine-ARNg. l'un de ces domaines est particulièrement riche en résidus sérine.

Une comparaison entre la séquence en acides aminés des différents coronavirus, étudiés à ce jour, met en évidence une forte homologie pour quatre de ces domaines et une homologie moins grande pour la cinquième région basique, riche en résidus sérine.

Ainsi, la liaison de la protéine N avec l'ARNg s'effectuerait au niveau de la région riche en résidus sérine, la stabilisation de cette structure ARNg-protéine étant réalisée par les quatre autres régions basiques (CRUCIERE - 1988).

ROBBINS *et al.* (1986) ont démontré que la protéine N se liait à l'ARNg sous forme d'un trimère, les monomères étant liés par des ponts disulfure.

Glycoprotéine de membrane M

Cette protéine matricielle, de 20 à 30 k, doit son nom à son rôle dans les interactions entre l'enveloppe et la ribonucléoprotéine.

Elle a tendance à former des agrégats par chauffage à 100°C en présence de SDS, ce qui a contribué à rendre son étude difficile. De plus, plusieurs bandes protéiques sont souvent mises en évidence par électrophorèse. Ces

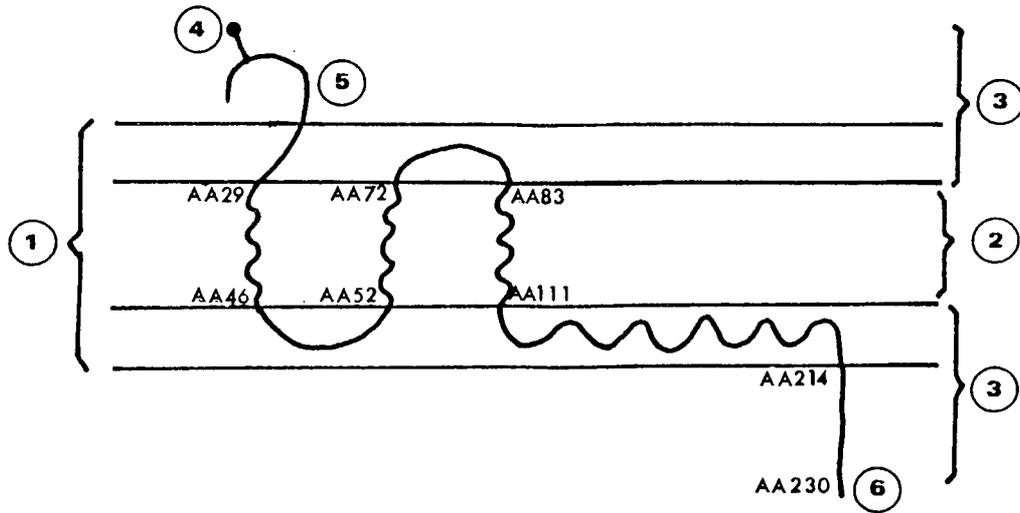


Fig. n° 2 : Structure de la glycoprotéine transmembranaire M.
(adapté de SAVOYSKY *et al.* - 1990 ; ROTTIER *et al.* - 1990)

- 1 : double couche lipidique de l'enveloppe virale
- 2 : région transmembranaire hydrophobe
- 3 : régions hydrophiles
- 4 : sites de glycosylation potentiels
- 5 : région N terminale
- 6 : région C terminale

polypeptides de masse moléculaire différente correspondent à plusieurs degrés de glycosylation de la protéine M (KING et BRIAN - 1982 ; STERN *et al.* - 1982 ; JIMENEZ *et al.* - 1986).

La glycoprotéine M est constituée de trois domaines principaux :

- une petite région N-terminale hydrophile, exposée à la surface externe de l'enveloppe virale et qui est dégradée par traitement par la pronase ou la bromélaïne. Sa synthèse en présence de tunicamycine montre qu'elle est O-glycosylée sur les résidus sérine et thréonine chez le MHV et le BECV (HOLMES *et al.* - 1981 ; STURMAN - 1981), et N-glycosylée chez le TGEV et l'IBV (STERN *et al.* - 1982). Des expérimentations réalisées par NIEMANN et KLENK (1981) ont montré que la fraction glucidique de la molécule était constituée de galactose, N-acétylglucosamine, N-acétylgalactosamine, acide neuraminique et acide sialique.
- une région transmembranaire hydrophobe entièrement intégrée à l'intérieur de la double couche lipidique et riche en ponts disulfure.
- une région C-terminale présente à la surface interne de l'enveloppe et associée à l'ARN de la nucléocapside.

L'analyse de la séquence en acides aminés de la glycoprotéine M du BECV a permis à SAVOYSKY *et al.* (1990) et ROTTIER *et al.* (1990) de dégager certaines propriétés de la molécule et de proposer un modèle de conformation possible de la protéine (fig. n° 2), en accord avec d'autres modèles proposés par plusieurs auteurs pour le MHV, le TGEV et l'IBV (AMSTRONG *et al.* - 1984 ; BOURSNEILL *et al.* - 1984 ; KAPKE *et al.* - 1988).

Selon ces auteurs, la glycoprotéine transmembranaire M est basique et modérément hydrophobe. La région N terminale hydrophile, composée de 23 acides aminés, est enroulée sous forme d'une hélice α à la surface externe de la membrane virale.

La région transmembranaire correspondant au 1/3 de la molécule (AA29 à 111) est constituée de 3 feuillets β hydrophobes, une courte hélice α de 8 acides aminés étant incorporée dans le feuillet médian le plus long (AA52 à 72). Chaque coude entre les feuillets est constitué d'une courte séquence de quelques résidus hydrophiles en contact avec la face interne ou externe de la membrane virale.

La partie C terminale constitue environ la moitié de la molécule (AA111 à 230) et est localisée à la face interne de la double couche lipidique. Elle est constituée d'une longue chaîne amphiphile formée principalement d'une

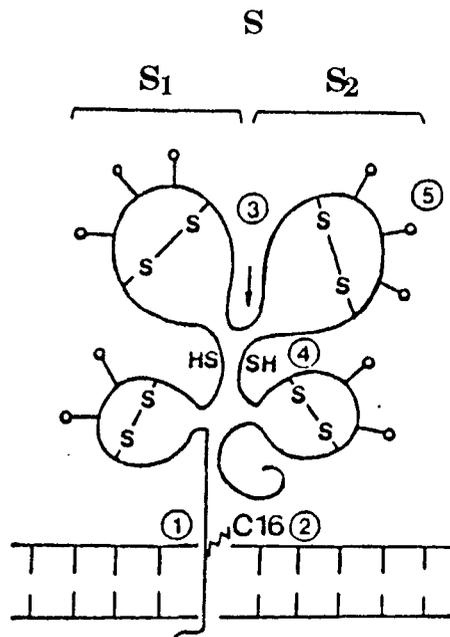


Fig. n° 3 : Structure de la glycoprotéine du péplomère S.
(d'après STURMAN - 1981)

- 1 : attache d'une extrémité de la protéine à l'enveloppe virale
- 2 : liaison covalente à l'acide palmitique
- 3 : site sensible à la trypsine
- 4 : groupements SH et ponts disulfure
- 5 : chaînes oligosaccharidiques latérales

alternance de courts feuilletts β et de coudes. Elle possède une charge globale nettement positive (+ 8) due à sa richesse en résidus basiques, ce qui pourrait favoriser les interactions avec l'ARN viral chargé négativement.

Cette glycoprotéine M possède une structure très conservée au sein des différentes espèces de coronavirus, particulièrement au niveau de la région transmembranaire, et seule la partie N terminale exposée à la face externe montre une hypervariabilité (SAVOYSKY *et al.* - 1990).

Glycoprotéine des péplomères

Cette glycoprotéine de 80 à 200 k constitue les péplomères du virion. Elle émerge totalement de l'enveloppe virale où elle est implantée par l'intermédiaire d'une courte région hydrophobe (fig. n° 3) (STURMAN et HOLMES - 1983). Une molécule d'acide palmitique est fixée par liaison covalente à proximité de cette région transmembranaire. Cette protéine est riche en ponts disulfure interpeptides et en groupements sulfhydryls libres, nécessaires au maintien de la configuration de la molécule (CAVANAGH - 1983).

Il existe au milieu de la glycoprotéine native du virus, un site de clivage sensible à la trypsine. Ainsi, cette protéine peut subir, selon les virus et selon les cellules infectées, une protéolyse post-traductionnelle qui la scinde en deux sous-unités S1 et S2. Ce clivage s'observe, pour la glycoprotéine S de l'IBV (CAVANAGH et DAVIS - 1987) et du BECV (DEREGT *et al.* - 1987), très peu chez quelques souches de HCV (HOGUE et BRIAN - 1986), mais pas dans le cas du TGEV, du FIPV ou du coronavirus canin (HORZINEK *et al.* - 1982). Le clivage de la protéine S du MHV varie de 0 à 100 % en fonction de la souche virale (STURMAN *et al.* - 1985). Ce clivage semble nécessaire à l'infectiosité du virus et à la fusion cellulaire, cependant son caractère inconstant laisse supposer que d'autres mécanismes interviennent dans la fusion. La sous-unité S1 est constituée de la partie la plus externe du péplomère comprenant la région N-terminale, la sous-unité S2, l'autre moitié de la protéine comprenant la région transmembranaire et l'extrémité carboxylée.

Chez tous les coronavirus, la glycosylation de la protéine S est sensible à la tunicamycine. La protéine est riche en mannose, galactose, glucose et N-acétylglycosamine et, contrairement à la protéine M, elle incorpore le fucose. Ces sucres sont fixés aux résidus asparagine de la molécule par une liaison N-glycosidique sous forme de complexes oligosaccharidiques (STERN et SEFTON - 1982 ; STURMAN et HOLMES - 1983).

La séquence complète du gène codant pour la glycoprotéine S est connue pour l'IBV (BINNS *et al.* - 1985a), le MHV (SCHMIDT *et al.* - 1987), le TGEV (RASSCHAERT et LAUDE - 1987), le FIPV (DE GROOT *et al.* - 1987) et le BECV (BOIREAU *et al.* - 1990 ; ABRAHAM *et al.* - 1990).

La protéine comprend 1 400 à 1 800 acides aminés selon l'espèce considérée et présente, dans son ensemble, un profil hydrophobe. Elle possède un peptide signal à l'extrémité aminée, un grand nombre de sites de glycosylation potentiels, un domaine hydrophobe transmembranaire et une région hydrophile de 35 acides aminés riches en cystéine à l'extrémité carboxylée.

La séquence en acides aminés suggère la présence de deux longues chaînes d'hélice α qui interagissent entre elles pour former des structures surenroulées, constitutives de la tige du péplomère sur la moitié de sa longueur, et d'une autre hélice α impliquée dans l'implantation du spicule dans la membrane virale.

La comparaison des séquences de différents coronavirus montre que la sous-unité S1 la plus externe est très peu conservée. Dans S2, plusieurs régions présentent plus de 30 % d'homologie, notamment la région riche en résidus cystéine (SPAAN *et al.* - 1988 ; BOIREAU *et al.* - 1990).

Glycoprotéine HE

Des études récentes ont montré que certains coronavirus humains respiratoires HCV-OC43 et HCV-229E (HOGUE et BRIAN - 1986), de même que le HEV, le MHV-JHM et le BECV (KING *et al.* - 1985 ; DEREGT *et al.* - 1987) possèdent une glycoprotéine supplémentaire de 65 k appelée hémagglutinine-estérase (HE). Cette glycoprotéine serait structuralement indépendante de S (SPAAN *et al.* - 1988).

Après électrophorèse, et en absence de mercaptoéthanol, cette protéine apparaît sous forme d'un dimère de 130 à 140 k.

La séquence en acides aminés de la souche Mébus du BECV a été obtenue. Elle est constituée de 424 acides aminés. L'expression de la protéine HE *in vitro* révèle la présence d'un peptide signal N terminal et une région d'implantation C terminale. La formation de dimères est observée uniquement après expression *in vivo* (HIENZLE *et al.* - 1990).

2.2.2 Fonction

Protéine de la nucléocapside N

Elle intervient dans l'encapsidation de l'ARN génomique, facilitant son incorporation dans le virion en stabilisant la structure en hélice de l'ARNg.

Elle est également impliquée dans le processus de réplication de l'ARN. COMPTON *et al.* (1987) ont montré que l'addition d'un antisérum dirigé contre N (mais pas contre S ou M), dans un système de réplication *in vitro*, inhibait à 90% la synthèse de l'ARN de taille génomique.

Glycoprotéine de membrane M

Son rôle est déterminant dans le bourgeonnement intracellulaire du virus. ROTTIER et ROSE (1987) ont établi que la protéine matricielle contient des informations nécessaires à sa fixation sur les membranes de l'appareil de golgi et que, contrairement à S, elle est indispensable à la détermination du site de bourgeonnement des virions et à la formation de l'enveloppe virale. En effet, en présence de tunicamycine, des virions n'ayant pas incorporé la glycoprotéine S peuvent se former et être libérés. De plus, la glycosylation de la protéine M de l'IBV étant inhibée par la tunicamycine, des virions dépourvus de S et possédant une protéine M non glycosylée sont produits. La glycolysation de M ne serait donc pas essentielle pour la maturation de l'IBV (STURMAN et HOLMES - 1983).

Les interactions entre la glycoprotéine M et la nucléocapside sont mal connues, mais M semble avoir une grande affinité pour l'ARN. En effet, STURMAN *et al.* (1980) ont montré qu'après dissociation de l'enveloppe par le NP-40, et séparation de la nucléocapside et des protéines de l'enveloppe sur un gradient de densité, une réassociation entre M et la nucléocapside était observée à 37°C, avec formation d'un complexe stable. Cette interaction aurait pour but de stabiliser la nucléocapside dans sa forme hélicoïdale.

Glycoprotéine S et HE

Il a été démontré que l'attachement des virions aux récepteurs cellulaires de surface était obtenu par l'intermédiaire de S ou de l'ensemble des deux glycoprotéines S et HE quand cette dernière est présente. Les protéines de la cellule hôte servent probablement de récepteurs car ces cellules sont protégées contre l'infection après incubation avec des anticorps polyclonaux ou

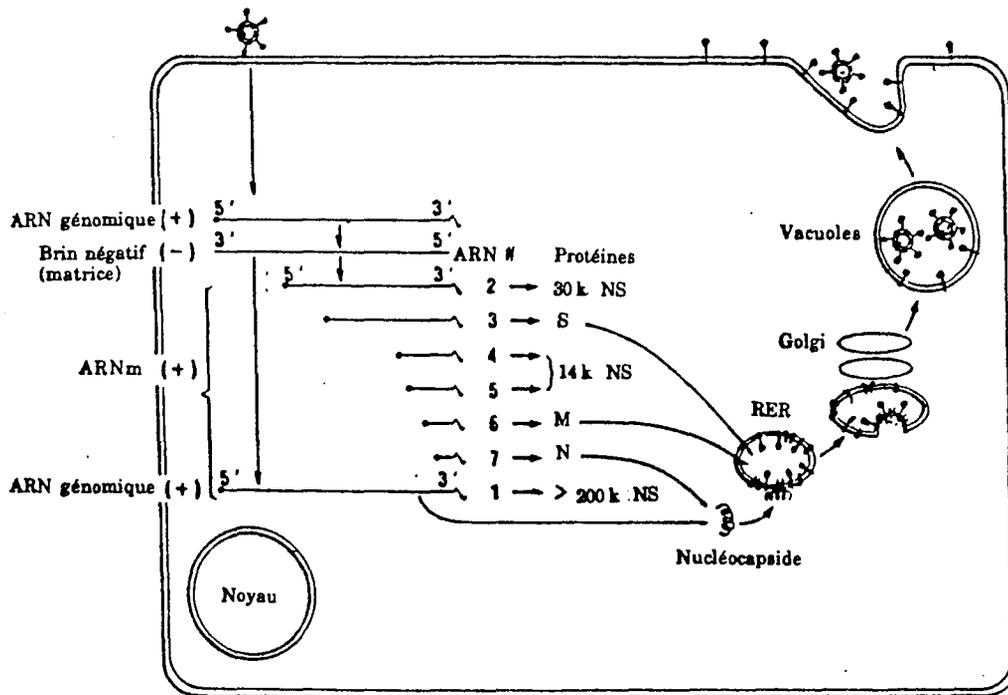


Fig. n° 4 : Mécanisme de répllication du coronavirus (d'après HOLMES - 1986).
 (M : matrice ; N : nucléocapside ; NS : protéines non structurales ;
 RER : réticulum endoplasmique rugueux ; S : péplomère)

monoclonaux homologues (SPAAN *et al.* - 1988). Par ailleurs, les virus dépourvus de spicules sont non infectieux (ROTTIER *et al.* - 1981a).

Des études réalisées avec l'IBV ont montré que l'action de l'urée éliminant la région S1 de la glycoprotéine S supprimait en même temps le pouvoir infectieux et l'activité hémagglutinante du virus (CAVANAGH et DAVIS - 1986). De plus, des anticorps dirigés contre S1 inhibent également cette activité (MOCKETT *et al.* - 1984). S1 serait donc impliqué dans le processus d'hémagglutination, mais pour les virus qui possèdent la glycoprotéine HE, c'est cette dernière qui serait associée à l'activité hémagglutinante (PARKER *et al.*, - 1989). La glycoprotéine HE aurait par ailleurs une activité acétyl estérase (VLASAK *et al.* - 1988 ; PARKER *et al.* - 1990).

La protéine S induit la fusion cellulaire (STURMAN *et al.* - 1985). Le traitement des virions par la trypsine active ce phénomène et pourrait être nécessaire à l'établissement du pouvoir infectieux (CYR-COATS *et al.* - 1988).

Cette protéine induit la formation d'anticorps neutralisants (MAC NAUGHTON *et al.* - 1981 ; STURMAN et HOLMES - 1983).

La glycoprotéine S serait également responsable de la thermolabilité pH dépendante des coronavirus par agrégation de la protéine, cette modification de conformation apparaissant à pH > 6,5 à 37°C (STURMAN - 1981).

III - REPLICATION DES CORONAVIRUS

Les coronavirus développent une stratégie de réplication différente de celle des autres virus à ARN simple brin de polarité positive.

L'ensemble des étapes de la réplication (transcription de l'ARN, synthèse des protéines virales et assemblage des virions) s'effectue dans le cytoplasme des cellules infectées. En effet, la réplication des coronavirus, telle celle du MHV, peut se dérouler normalement dans des cellules anucléées (BRAYTON *et al.* - 1981 ; WILHELMSSEN *et al.* - 1981).

Les différentes étapes de la réplication, schématisées par HOLMES (1986) sont présentées sur la fig. n° 4.

3.1 Adsorption et pénétration du virus

Les coronavirus se fixent sur les récepteurs de la membrane plasmique des cellules sensibles par le sommet de leurs spicules (PATTERSON et BINGHAM - 1976). La pénétration du virus dans la cellule cible se fait soit par fusion avec la membrane plasmique, soit par endocytose. Le fait que l'infection virale soit inhibée par l'emploi de bases liposolubles (chloroquine), qui

augmentent le pH des endosomes, suggère que l'endocytose serait le principal mode d'entrée du virus dans la cellule (MALLUCCI - 1966).

3.2 Synthèse des ARN viraux

Après pénétration dans la cellule et décapsidation, le génome du coronavirus sert de matrice pour la synthèse d'un ARN de polarité négative, de même taille que l'ARNg (LAI *et al.* - 1982). Il s'agit exclusivement d'un intermédiaire de réplication dont le rendement de synthèse diminue 5 à 6 h après le début de l'infection (SAWICKI *et SAWICKI* - 1986).

La synthèse de brins d'ARN de polarité négative nécessite une synthèse protéique continue. Les protéines virales impliquées n'ont pas encore été identifiées. Une activité ARN polymérase ARN dépendante a été détectée dans les cellules infectées par le MHV et le TGEV mais pas dans le virus purifié (DENNIS *et BRIAN* - 1982 ; BRAYTON *et al.* - 1982). Toutefois, les synthèses cellulaires n'interviendraient pas dans la réplication du virus. En effet, l'addition d'actinomycine D dans le milieu de culture des cellules infectées ou la multiplication des virus dans des cellules anucléées n'inhibent pas la synthèse des ARN viraux (WILHELMSEN *et al.* - 1981 ; MAHY *et al.* - 1983). Par ailleurs, des inhibiteurs de la synthèse des protéines, cycloheximide par exemple, empêchent l'incorporation d'uridine tritiée dans les cellules infectées traitées à l'actinomycine D (MAHY *et al.* - 1983).

BRAYTON *et al.* (1982-1984) ont décrit deux activités ARN polymérasiques, l'une précoce 1 h après l'infection, et l'autre plus tardive au bout de 6 h. Ces deux polymérases auraient des propriétés physicochimiques et des activités différentes. L'ARN polymérase précoce agirait à pH 7,5 en présence d'ions potassium et serait impliquée dans la synthèse du brin d'ARN de polarité négative : l'ARN polymérase tardive agirait à pH 8 et assurerait la synthèse de l'ARNg de polarité positive ainsi que celle des ARNm subgénomiques. Cependant, contrairement à BRAYTON *et al.* (1982-1984), MAHY *et al.* (1983) et COMPTON *et al.* (1987) n'ont détecté qu'une seule activité polymérasique.

L'ARN de polarité négative sert ensuite de matrice pour la transcription de l'ARNg et des ARNm subgénomiques.

Dans le cytoplasme des cellules infectées, il est possible de détecter 6 à 7 espèces d'ARN de masse moléculaire s'étageant entre 0,6 et 6.10^6 (SIDDELL *et al.* - 1982). Tous sont monocaténares, polyadénylés, et possèdent une structure cap à l'extrémité 5' (WEISS *et LEIBOWITZ* - 1983). Ces ARN, associés aux

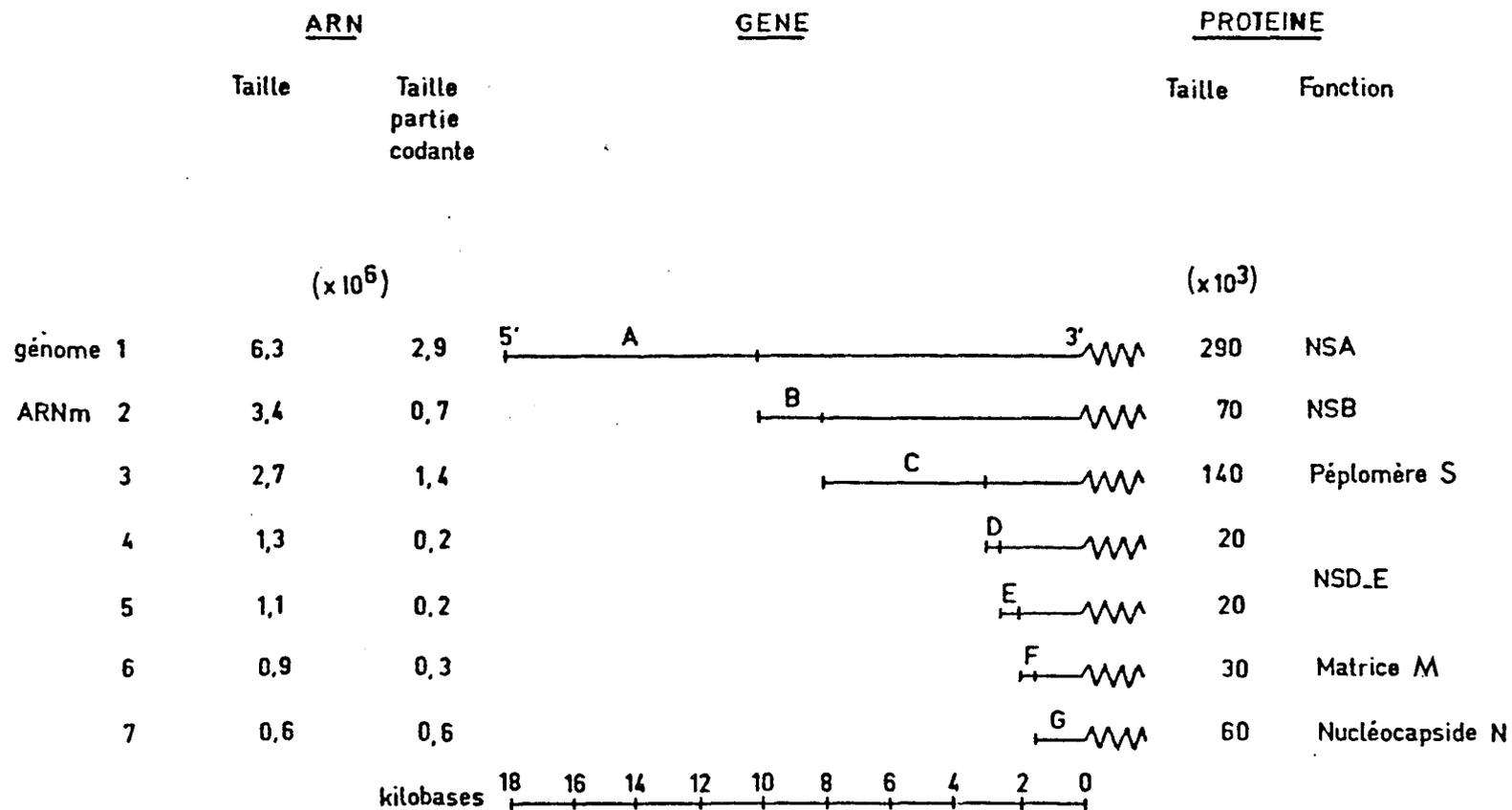


Fig. n° 5 : Organisation des ARNm viraux
(d'après SIDDELL *et al.* - 1982)

polyribosomes et pouvant être traduits *in vivo* et *in vitro*, sont des ARNm. Il est impossible de différencier le plus grand d'entre eux et l'ARNg, et leur longueur totale excède largement celle du génome viral.

Une cartographie par empreintes oligonucléotidiques révèle que l'ARNg et les ARNm forment une structure particulière, dite emboîtée (en anglais, un "nested set"), la séquence de chaque ARNm étant contenue dans l'ARNm de taille supérieure (fig. n° 5). Ces ARNm ont une extrémité 3' commune et s'étendent sur des longueurs variables vers l'extrémité 5' (STERN et KENNEDY - 1980). Seule la "séquence unique", située à l'extrémité 5' de chaque ARNm qui n'est pas contenue dans l'ARN de taille immédiatement inférieure, est utilisée pour la traduction. Ainsi, bien que structurellement polycistroniques, ces ARNm sont fonctionnellement monocistroniques et codent pour la synthèse d'un seul polypeptide. En raison de la nature monocistronique de ces ARNm, le génome des coronavirus, bien que très long, ne code que pour 6 ou 7 protéines.

Par la méthode des empreintes nucléotidiques, une séquence de tête commune (séquence "leader") a été mise en évidence à l'extrémité 5' de tous les ARNm et de l'ARNg. Elle ne se retrouve nulle part ailleurs sur le génome (LAI *et al.* - 1983). Sa mise en évidence directe a été obtenue par analyse de la séquence nucléotidique de l'extrémité 5' des ARNm du MHV et de l'IBV (BROWN *et al.* - 1984 ; LAI *et al.* - 1984). Ces séquences "leader" de 60 nucléotides pour l'IBV et de 72 nucléotides pour le MHV sont transcrites à partir de l'extrémité 3' de l'ARN de polarité négative (SPAAN *et al.* - 1988).

Il a été démontré que les ARNm ne proviennent pas de la fragmentation d'un précurseur de grande taille. Des études d'inactivation, par irradiation aux UV des cellules infectées, ont montré que les ARNm sont transcrits de façon indépendante (JACOBS *et al.* - 1981).

La fusion de la séquence "leader" au corps de l'ARNm pourrait se faire au cours ou après la transcription. Or, la présence de cette séquence "leader" a été mise en évidence sur les chaînes naissantes d'ARNm, associée à un intermédiaire de réplication (BARIC *et al.* - 1983). Cette séquence ne serait donc pas ajoutée après la transcription.

De plus, des homologies ont été mises en évidence entre les séquences nucléotidiques des régions intergéniques de l'ARNg et de la partie 5' non codante des ARNm (BUDZILOWICZ *et al.* - 1985). Ces séquences constitueraient des sites d'attachement pour la séquence "leader" et représenteraient le site de fusion entre la séquence "leader" et le corps de l'ARNm.

Ainsi, un nouveau mécanisme de transcription des ARNm a été proposé dans lequel un ARN "leader" serait synthétisé à partir de l'extrémité 3' de l'ARN de polarité négative. Après dissociation de la matrice, cette séquence "leader" servirait d'amorce pour la transcription des ARNm subgénomiques sur cette même matrice au niveau des différents sites internes d'initiation (BUDZILOWICZ *et al.* - 1985).

Certains auteurs ont suggéré que le degré de complémentarité, entre la séquence "leader" et les différents sites internes d'initiation, pouvait intervenir dans la régulation de l'expression des ARNm (BUDZILOWICZ *et al.* - 1985 ; SHIEH *et al.* - 1987). En effet, les ARNm sont synthétisés en quantités variables les uns par rapport aux autres mais toujours dans les mêmes proportions.

3.3 Synthèse des protéines structurales

La traduction, *in vitro*, des différents ARNm permet d'obtenir, pour chacun d'eux, une seule protéine codée par l'extrémité 5' de l'ARNm (ROTTIER *et al.* - 1981b ; SIDDELL - 1983) (fig. n° 5). Ce mécanisme est très différent des autres virus à ARN de polarité positive pour lesquels les protéines proviennent du clivage protéolytique d'un grand précurseur polypeptidique.

Les protéine de la nucléocapside N et plusieurs protéines non structurales (30 k - 14 k - 200 k) sont produites au niveau des polysomes (SIDDELL - 1983). Il y a accumulation précoce et prépondérante de la protéine N qui doit se complexer à l'ARNg nouvellement synthétisé. Cette protéine est produite sous forme de précurseur qui est rapidement phosphorylé sur ses résidus sérine dans le cytosol (STOHLMAN *et al.* - 1983).

Les protéines de l'enveloppe virale M et S sont toutes deux synthétisées sur les polysomes associés aux membranes du réticulum endoplasmique rugueux (RER). Cependant, leur formation et leur transport dans la cellule s'effectuent différemment.

- la glycoprotéine de membrane M est synthétisée au niveau du RER avant de migrer vers l'appareil de golgi où elle est glycosylée. Ainsi, les oligosaccharides sont ajoutés bien après que la synthèse de la protéine soit terminée (ROTTIER *et al.* - 1984).

Chez le MHV, l'IBV et le BECV, cette protéine est dépourvue de séquence signal à son extrémité N terminale (SPAAN *et al.* - 1988). Or, elle se trouve fixée aux membranes du RER 5 min après l'initiation de la synthèse *in vitro*. Son intégration nécessite une particule reconnaissant un signal d'insertion qui, n'étant pas retrouvé à l'extrémité de la protéine, pourrait être interne (ROTTIER *et al.* - 1985). Ainsi, un ou plusieurs signaux d'insertion pourraient être situés au niveau des domaines hydrophobes transmembranaires (MACHAMER et ROSE - 1987). Cependant, cette caractéristique ne se retrouve pas chez tous les coronavirus ; LAUDE *et al.* (1987) ont mis en évidence à l'extrémité NH₂-terminale de la glycoprotéine M du TGEV un éventuel peptide signal de 17 acides aminés qui n'est pas retrouvé dans la protéine mature.

- la glycoprotéine constitutive des spicules S est synthétisée au niveau du RER où elle est glycosylée. La glycosylation s'effectue par transfert sur les résidus asparagine de la chaîne polypeptidique naissante d'oligosaccharides provenant d'un intermédiaire dolichol phosphate (KLENK et ROTT - 1981).

La protéine glycosylée est ensuite transportée vers l'appareil de golgi où elle est incorporée aux virions. Durant le transfert, elle subit des modifications post-traductionnelles sous l'action des enzymes cellulaires : modification des oligosaccharides et acylation (SCHMIDT - 1982 ; STERN et SEFTON - 1982).

Des études par immunomicroscopie électronique et immunofluorescence ont montré que la protéine S non incorporée aux virions était, à la différence de la glycoprotéine M, transportée au niveau de la membrane plasmique où elle induit la fusion cellulaire (STURMAN *et al.* - 1985).

Les spicules sont formés de 2 ou 3 molécules de glycoprotéine S (CAVANAGH - 1983) mais le site d'assemblage de monomères conduisant à la formation de ces spicules est encore inconnu.

Le clivage de la protéine par les protéases cellulaires de l'hôte se produirait au niveau de l'appareil de golgi ou de la membrane plasmique (STURMAN *et al.* - 1985).

3.4 Assemblage et libération des virions

La nucléocapside hélicoïdale se forme dans le cytoplasme par interaction entre l'ARNg synthétisé et les molécules de la protéine N. Les nucléocapsides des coronavirus sont beaucoup plus fragiles et difficiles à visualiser que celles des orthomyxo et paramyxovirus. Elles constituent des enroulements plutôt lâches et flexibles sensibles aux RNases (MAC NAUGHTON *et al.* - 1978).

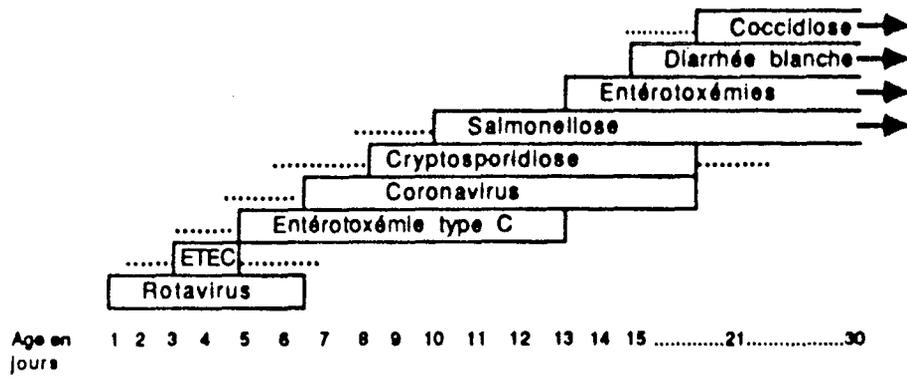


Fig. n° 6 : Incidence des différentes causes de diarrhée en fonction de l'âge des veaux (d'après HUNT - 1985)

- Période prépatente.
- Période de moindre incidence.
- ▭ Période d'incidence maximale.

L'assemblage des virions s'effectue selon un processus de bourgeonnement des membranes du RER et de l'appareil de golgi et non au niveau de la membrane plasmique comme pour les autres virus enveloppés. Le lieu de formation des virus est en effet déterminé par la localisation de la glycoprotéine M mature qui est seule capable de se lier à la nucléocapside. Elle forme des amas serrés sur les membranes intracellulaires définissant ainsi des sites de bourgeonnement. Les nucléocapsides s'aligent au niveau de ces sites. Les virions en formation acquièrent leurs lipides aux dépens de la cellule et les protéines cellulaires des membranes sont remplacées par les protéines virales.

Le bourgeonnement et la maturation intracellulaires des virions s'effectuent à l'abri de toute réponse immunitaire de l'hôte, ce qui peut contribuer à expliquer l'existence d'affections persistantes (HOLMES et BEHNKE - 1981).

Les virions accumulés dans l'appareil de golgi et dans les vésicules d'assemblage intracytoplasmiques sont libérés à l'extérieur par lyse de la cellule ou par fusion des vésicules avec la membrane plasmique. Toutefois, la capacité des coronavirus à être libérés sans lyse de la cellule est un facteur important conduisant à une infection modérée.

CORONAVIROSE BOVINE

La pathologie digestive est certainement la principale cause de mortalité et de morbidité chez le veau. Elle est dominée par les entérites néonatales au cours des 15 premiers jours, le relais étant pris ensuite par les diarrhées blanches, les ulcères de la caillette et les entérotoxémies dues aux différents sérotypes de *Clostridium perfringens* (LAVAL, *et al.* - 1988).

Différents facteurs, infectieux (bactériens, viraux ou parasitaires) et nutritionnels interviennent dans cette pathologie, seuls ou en synergie, leur incidence respective variant avec l'âge (Fig. 6).

Au cours des entérites néonatales, des souches d'*Escherichia coli* dites entérotoxinogènes (ETEC), des rotavirus, des coronavirus et des cryptosporidies sont le plus fréquemment isolés. D'après les enquêtes épidémiologiques réalisées en France (FEDIDA *et al.* - 1983 ; VALLET et NAVETAT - 1988), il semble que la souche *Escherichia coli* K 99 soit la bactérie le plus souvent rencontrée, elle représente 58 % des cas d'entérites. Le rotavirus serait présent, surtout entre le premier et le quatrième jour de la vie,

dans près de 50 % des cas. Le coronavirus est également observé au cours des trois premières semaines, et ceci dans 37 à 50 % des cas.

A côté de ces principaux agents pathogènes, sont également mis en cause des *Salmonella*, des *Campylobacter*, et parfois le virus de la maladie des muqueuses (BVD-MD) ou d'autres virus dont le pouvoir pathogène est mal connu : astrovirus, parvovirus, calicivirus (SNODGRASS *et al.* - 1986 ; LAVAL *et al.* - 1988). Ces agents infectieux interviennent souvent en association, ce qui augmente la gravité de la maladie (MORRIN *et al.* - 1976 ; RUNNELS *et al.* - 1980). Ainsi, les travaux de GOUET *et al.* (1978) ont montré que l'infection simultanée du veau par le rotavirus et *Escherichia coli* K 99, à des doses non pathogènes, entraînait la mort de l'animal.

L'application de mesures sanitaires et les progrès réalisés en thérapeutique permettent de diminuer la fréquence et surtout la gravité de ces entérites. Ces mesures sont cependant insuffisantes pour maîtriser les enzooties, notamment dans les grands élevages. Les conséquences économiques dues à la mortalité, au retard de croissance et au coût thérapeutique, sont considérables.

I - PHYSIOPATHOLOGIE

Le pouvoir pathogène du BECV a été étudié par MEBUS *et al.* (1975) sur des veaux nouveaux-nés gnotobiotiques, infectés expérimentalement.

Alors que, dans l'entérite collibacillaire, l'induction de la diarrhée est liée à un processus d'hypersecrétion (ARGENZIO - 1985), dans le cas des entérites à virus épithéliotropes (coronavirus et rotavirus), il s'agit d'une diminution de l'absorption intestinale.

Le BECV pénètre par voie orale dans le tube digestif, s'adsorbe sur les cellules apicales des villosités intestinales et s'y multiplie activement. La pénétration et le pouvoir infectieux du virus sont sans doute favorisés par l'action des enzymes protéolytiques du tractus intestinal. En effet, des expérimentations ont montré que l'addition de trypsine au milieu de culture augmentait sensiblement la croissance du virus *in vitro* (DEA *et al.* - 1980 ; PAYNE et STORZ - 1988). Toutefois, les particules virales obtenues dans ce cas présentent des projections de surface plus petites que la normale (STORZ *et al.* - 1981).

La destruction des entérocytes est plus massive qu'avec le rotavirus, l'infection se propageant sur toute la longueur des villosités intestinales. En effet, le BECV infecte principalement les cellules épithéliales différenciées mais également les cellules cubiques immatures qui proviennent des cryptes, les

cellules caliciformes, les fibroblastes et les cellules endothéliales de la *lamina propria*. Il s'en suit une abrasion puis une atrophie marquée des villosités qui souvent fusionnent. Les cryptes sont espacées et dilatées (MEBUS *et al.* - 1973a - 1975 ; DOUGHRI et STORZ - 1977 ; TZIPORI - 1981). Ces lésions sont étendues non seulement à l'intestin grêle comme dans le cas du rotavirus, mais également au colon et au rectum, ce qui explique la gravité de l'affection.

La réduction de la surface fonctionnelle de l'épithélium intestinal résultant de l'invasion virale entraîne une diminution notable de sa capacité d'absorption se traduisant par une diarrhée hydro-électrolytique.

De plus, la destruction des entérocytes différenciés entraîne une multiplication accélérée des entérocytes germinaux des cryptes. Ces cellules relativement immatures ont des activités enzymatiques faibles : déficience en enzymes digestifs, activité réduite des transporteurs spécifiques membranaires et de la pompe Na-K-ATPase (THIEBAULT - 1988). Le fonctionnement de la muqueuse intestinale est par conséquent profondément perturbé. On note ainsi une déficience de l'activité lactasique entraînant une incapacité à digérer correctement le lait (MEBUS - 1978). L'accumulation de disaccharides dans la lumière intestinale est à l'origine d'une diarrhée osmotique caractérisée par une inversion du flux liquidien avec perte importante d'eau et d'électrolytes. On constate également une déficience en lysozyme et lactoferrine qui jouent un rôle important dans les défenses antibactériennes locales (LAVAL *et al.* - 1988).

Ainsi, l'entérite provoque des pertes importantes d'eau et d'électrolytes (Na^+ et Cl^- essentiellement) et donc une déshydratation extracellulaire. En cas de trouble prolongé, l'accumulation d'acide lactique, les pertes importantes en ions bicarbonate conduisent à une acidose et à une fuite de potassium intracellulaire. Malgré un déficit global du potassium corporel, on note une élévation de la kaliémie (LEWIS et PHILLIPS - 1972). Dans les accès sévères, l'hypoglycémie est cause de fatigue, léthargie, convulsions et enfin coma. La mort survient des suites du choc hypovolémique (LEWIS et PHILLIPS - 1978).

II - SYMPTOMATOLOGIE

Il est délicat de faire des distinctions précises entre les différentes étiologies des entérites, d'une part, parce qu'il existe de nombreux symptômes communs, et que la symptomatologie dépend, en partie, de l'évolution de la maladie, d'autre part, parce que l'entérite est souvent due à des germes associés. Notamment, il n'est pas possible de distinguer cliniquement une

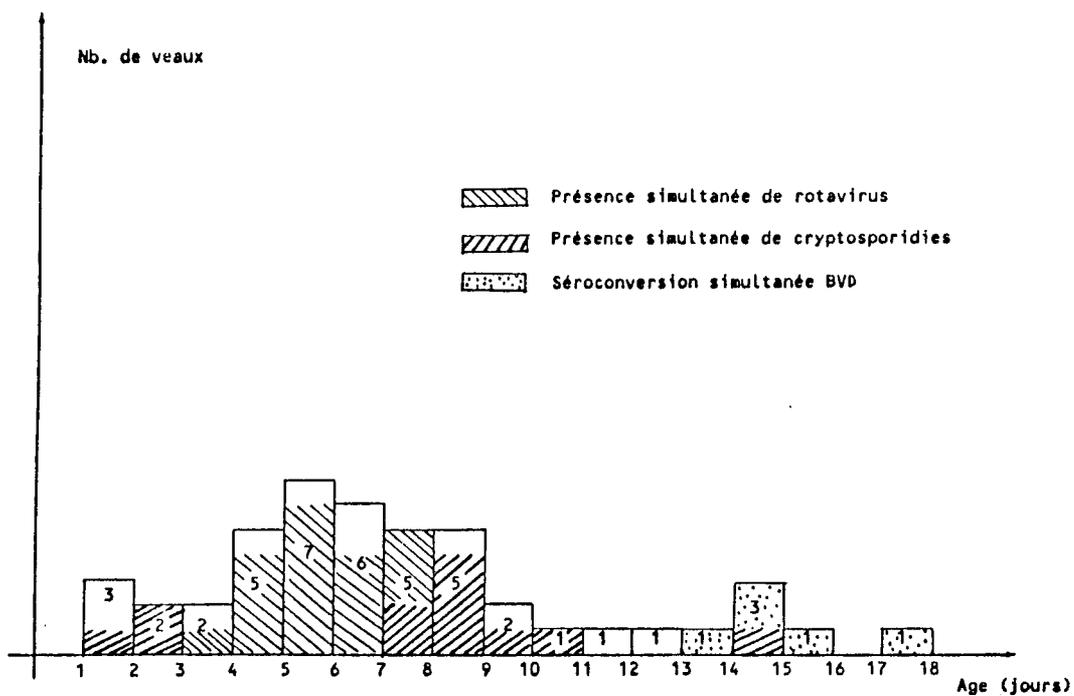


Fig. n° 7 : Répartition de 46 cas de coronavirose en fonction de l'âge des veaux (d'après VALLET et NAVETAT - 1988)

(BVD : virus de la Maladie des Muqueuses)

entérite à BECV d'une entérite à rotavirus. Toutefois, alors que le rotavirus, seul, provoque une maladie généralement bénigne (des signes sévères n'apparaissant que lors d'une infection virale massive), la présence de coronavirus correspond souvent à des cas d'enzooties graves conduisant fréquemment à une issue fatale, même en l'absence d'autres germes (VALLET - 1983). Ces degrés de gravité propres à l'une ou à l'autre étiologie s'observent, au plan clinique, lors d'infections expérimentales de veaux gnotoxéniques (GOUET *et al.* - 1978).

Au cours de ces entérites virales, et contrairement aux colibacillooses, la consistance des matières fécales est rarement liquide mais plutôt molle ou crémeuse. Les fécès contiennent souvent du lait mal digéré, du mucus, leur donnant un aspect "d'omelette baveuse", et, plus rarement, du sang. L'appétit est faible ou nul. Le veau se déshydrate mais plus lentement que lors d'une colibacillose : le globe oculaire est modérément enfoncé mais la sécheresse du pli cutané s'observe après 48 h (VALLET - 1983 ; VALLET et NAVETAT - 1988). Le veau perd du poids et manifeste abattement et faiblesse. La température rectale est normale ou légèrement augmentée au début de l'infection (40 à 40°5 C), puis elle baisse au fur et à mesure de l'évolution.

Dans les cas mortels, la maladie évolue en 3 à 4 jours (GOUET *et al.* - 1978). Les veaux qui la surmontent restent dans un état de dénutrition avancée pendant 4 à 6 semaines en raison sans doute des lésions de la muqueuse intestinale. Ils récupèrent progressivement sans jamais regagner totalement le retard accumulé (WELLEMANS *et al.* - 1977).

III - EPIDEMIOLOGIE

Le coronavirus entérique bovin a été identifié et isolé dans différentes parties du monde. Tout d'abord aux Etats-Unis (STAIR *et al.* - 1972), puis en France (GOUET *et al.* - 1978), aux Pays-Bas, au Danemark, en Grande-Bretagne (BRIDGER *et al.* - 1978) et en Belgique (WELLEMANS *et al.* - 1977 ; BROES *et al.* - 1984). Il est mis en évidence avec une grande fréquence dans les fécès diarrhéiques des veaux nouveaux-nés, le plus souvent en association avec d'autres agents infectieux, au cours des trois premières semaines de la vie (MEBUS *et al.* - 1973a), le pic d'incidence se situant entre le cinquième et le onzième jour, comme le révèlent des enquêtes épidémiologiques réalisées en France, entre 1978 et 1988 (VALLET et NAVETAT - 1988). (Fig. 7).

Le virus trouve un terrain plus propice à sa multiplication chez le veau nouveau-né que chez l'animal plus âgé. Ceci pourrait être lié au fait que les cellules intestinales du nouveau-né sont encore capables d'absorber des

macromolécules par pinocytose et se renouvellent plus lentement que chez l'adulte, facilitant ainsi la pénétration du virus (SCHERRER et LAPORTE - 1983). Cette "perméabilité" de la muqueuse intestinale est maximale à la naissance et diminue rapidement ensuite avec la maturation de l'épithélium intestinal (KRUSE - 1983).

Il existe un grand nombre de cas d'infections inapparentes aussi bien chez le jeune que chez l'adulte. Des enquêtes sérologiques ont montré que plus de 50 % des bovins possédaient des anticorps circulants dirigés contre le BECV (WEGE *et al.* - 1982).

La transmission du virus par la voie oro-fécale semble la plus fréquente. Cependant, des tests d'immunofluorescence ont permis la mise en évidence d'un site de multiplication du coronavirus au niveau de l'épithélium nasal du veau (REYNOLDS - 1983). Ce virus respiratoire serait étroitement relié au BECV. En effet, REYNOLDS *et al.* (1985) ont montré, en infectant des veaux gnotobiotiques par des coronavirus isolés du tractus respiratoire ou intestinal, que ces virus se retrouvaient à la fois au niveau des sécrétions nasales et dans les fécès, laissant supposer un double tropisme pour l'épithélium intestinal et nasal. De plus, l'infection par le BECV induit une immunité vis-à-vis d'une réinfection au niveau respiratoire. Ces coronavirus semblent appartenir au même sérotype, quelle que soit la source des virus. Des observations similaires ont été faites pour le TGEV du porc qui se réplique également dans les tissus respiratoires (UNDERDAHL *et al.* - 1974 ; LAUDE *et al.* - 1984) bien qu'il manifeste une prédilection et une pathogénicité pour l'intestin. Cette constatation est importante au point de vue épidémiologique car, si elle se confirme, elle permet d'envisager la dissémination du BECV aussi bien par aérosol que par transmission oro-fécale (REYNOLDS *et al.* - 1985).

Plusieurs facteurs interviennent dans le développement, la gravité et la fréquence des entérites néonatales, quelle que soit leur étiologie, le plus important étant l'état immunitaire des vaches gestantes, puis des veaux. Ces animaux étant agammaglobulinémiques à la naissance, la transmission passive des défenses immunitaires spécifiques et non spécifiques de la mère au nouveau-né se fait essentiellement par absorption de colostrum (KRUSE - 1983).

Chez les veaux d'élevage ayant reçu une quantité normale de colostrum à la naissance, la période de protection est d'environ 10 jours. Cette protection est toutefois directement liée à l'état immunitaire de la mère et à la quantité de colostrum ingéré. On constate ainsi que les veaux de génisses, dont le colostrum est peu abondant et moins riche en immunoglobulines que celui

des vaches plus âgées, sont plus réceptifs aux infections (LAVAL *et al.* - 1988). Dans tous les cas, ce taux d'immunoglobulines décroît brutalement avec les traites (dès le troisième jour après la mise-bas), si bien que la protection n'intervient qu'en cas d'infections précoces (VALLET et NAVETAT - 1988).

D'autres facteurs non spécifiques jouent un rôle dans le développement de ces entérites comme les conditions climatiques (froid et humidité), le stress, les mauvaises conditions d'hygiène, surtout en période de stabulation caractérisée par une promiscuité favorisant la propagation des agents infectieux.

IV - DIAGNOSTIC

Les travaux de recherche ayant trait au BECV, comme aux autres coronavirus, ont longtemps été limités par le manque de système cellulaire permettant d'obtenir les quantités d'antigène nécessaires à l'expérimentation et à la mise au point de tests.

Le BECV se multiplie très mal dans les systèmes cellulaires classiques si bien que les souches virales ont longtemps été entretenues par passage *in vivo*. Les premiers essais d'adaptation du virus sauvage à des cultures primaires de rein embryonnaire de bovin ont permis d'obtenir, après une vingtaine de passages, des titres de l'ordre de 1.10^5 UFP/ml (MEBUS *et al.* - 1973b ; BRIDGER *et al.* - 1978 ; L'HARIDON *et al.* - 1981).

Tirant parti du tropisme marqué du virus pour les entérocytes de la muqueuse intestinale, LAPORTE *et al.* (1980) ont obtenu, après 5 ou 6 passages seulement, un titre viral infectieux satisfaisant (1 à 5.10^8 UFP/ml) sur cellules provenant d'un adénocarcinome rectal humain (HRT 18) et ceci sans modification apparente des propriétés du virus initial.

Ces cellules HRT 18 (Human Rectal Tumor - 18) présentent à leur surface libre des microvillosités semblables à la bordure en brosse de l'épithélium intestinal. Les complexes joignant ces cellules sont également caractéristiques des entérocytes différenciés. Enfin, ces cellules sont très proches des cellules intestinales par la présence de récepteurs pour le peptide intestinal vaso-actif (VIP) et les prostaglandines E1 et E2 et par la possession d'activités enzymatiques spécifiques des membranes baso-latérales (5' nucléotidase) ou de la bordure en brosse (aminopeptidase) (BOBULESCO - 1983). Ces cellules sont actuellement couramment utilisées pour l'entretien et l'étude de ce virus.

Le diagnostic de la coronavirose bovine est basé essentiellement sur la détection des virus ou des antigènes dans les matières fécales. Les examens sérologiques sont certes applicables mais non utilisés à des fins diagnostiques.

Les anticorps dirigés contre le BECV sont fréquents chez la vache, se retrouvent dans le colostrum et la plupart des veaux sont séropositifs. Par conséquent, seule la mise en évidence d'une montée des anticorps est significative d'une infection, ce qui est trop long pour un diagnostic. L'examen sérologique ne présente de l'intérêt que pour le suivi sérologique des vaches gestantes vaccinées dans le cadre de l'étude de vaccins.

La technique la plus ancienne de détection du BECV dans les échantillons fécaux est l'observation en microscopie électronique après coloration négative (FLEWETT - 1978). C'est d'ailleurs ce procédé qui a permis la découverte du BECV par STAIR *et al.*, en 1972. A la suite de ces observations, le virus isolé a été rattaché au genre coronavirus sur la base de sa morphologie et de ses propriétés (SHARPEE *et al.* - 1976).

Contrairement aux rotavirus, les coronavirus sont difficiles à détecter et à différencier des autres éléments présents sur les préparations microscopiques (matériel membranaire et autres débris frangés) en raison de leur pléiomorphisme et aussi, souvent, parce que les spicules sont plus ou moins détachés. On estime à 30 % le nombre d'échantillons fécaux contenant des particules ressemblant aux coronavirus et qui ne peuvent être identifiées avec certitude (EL-GHORR *et al.* - 1988). Le résultat est ainsi entièrement soumis à l'appréciation de l'observateur. La technique présente l'avantage d'être rapide et se caractérise par une limite de détection de l'ordre de 10^6 particules.

Les techniques plus récentes d'immunomicroscopie électronique utilisant des antisérums spécifiques facilitent et augmentent la précision de la détection. La révélation de l'immunocomplexe utilise des anti-immunoglobulines ou la protéine A marquées à l'or colloïdal (EL-GHORR *et al.* - 1988 ; HECKERT *et al.* - 1989). Ce procédé est spécifique mais présente l'inconvénient d'utiliser des réactifs et un équipement coûteux.

L'immunofluorescence est également employée pour la détection du BECV sur des coupes histologiques d'intestin (MEBUS *et al.* - 1975). Ce test est, par conséquent, limité au diagnostic post-mortem. Le résultat dépend en grande partie de la rapidité avec laquelle les prélèvements sont effectués sur l'animal mort et de l'importance de l'infection (EL-GHORR *et al.* - 1988). L'utilisation de cette technique, pour la détection sur culture de cellules infectées (BARNETT *et al.* - 1975), se montre, quant à elle, beaucoup trop longue.

Les propriétés hémagglutinantes du BECV ont été exploitées dans des tests d'hémagglutination (HA), d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) (SATO *et al.* - 1977), d'hémadsorption-élution-hémagglutination (HEHA)

Tableau IV : Diagnostic expérimental des entérites néonatales du veau
(d'après LAVAL *et al.* - 1988).

Technique	Agent pathogène					
	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	Rotavirus	Coronavirus	BVD-MD*	Cryptosporidies
Culture	+++	+++	+	(+)	0	0
Immunofluorescence	+	0	+++	+++	+++	0
ELISA	+++	0	+++	+++	0	+++
Test du latex	0	0	+++	0	0	0
Histologie	+	+	++	++	+	++
Microscopie électronique	++	++	+++	+++	+++	+++
Coloration (Ziehl Neelsen)	0	0	0	0	0	++
Flottaison au saccharose	0	0	0	0	0	+++

* BVD-MD : Virus de la maladie des muqueuses.

(ELLENS *et al.* - 1978 ; VAN BALKEN *et al.* - 1978-1979) ou encore d'hémagglutination passive réverse (SATO *et al.* - 1984). Ces procédés, en particulier HEHA, donnent parfois lieu à des réactions non spécifiques dues à la nature complexe des fécès (VISCIDI *et al.* - 1984).

La nécessité de disposer de techniques sensibles et appropriées aux enquêtes épidémiologiques et au diagnostic de routine a conduit à la mise au point de techniques immunoenzymatiques. L'ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) a tout d'abord été réalisée avec des anticorps polyclonaux (ELLENS *et al.* - 1978 ; REYNOLDS *et al.* - 1984), sans grand succès, en raison d'un manque de sensibilité et surtout de spécificité. Ces réactions non spécifiques seraient dues, soit à la présence d'anticorps antirotavirus apparus chez l'animal au cours de l'immunisation, soit à une purification insuffisante de la suspension antigénique préparée (CROUCH *et al.* - 1984). L'utilisation plus récente d'anticorps monoclonaux (CROUCH *et al.* - 1984 ; CZERNY et EICHHORN - 1989) a permis d'améliorer la spécificité de la méthode ELISA.

La technique donne des résultats reproductibles et permet de tester un grand nombre d'échantillons. La lecture, réalisée par mesure de l'absorbance, en fait un test objectif si on le compare à la microscopie électronique ou aux techniques HA/IHA.

Des kits de détection sont commercialisés permettant le diagnostic simultané du coronavirus et des agents infectieux qui lui sont souvent associés (*Escherichia coli* entéropathogènes - rotavirus - cryptosporidies) et pour lesquels la technique ELISA est également utilisée (tableau IV).

Grâce aux progrès de la biologie moléculaire et à une meilleure connaissance du génome viral, les techniques d'hybridation moléculaire sont actuellement à l'étude.

SHOCKLEY *et al.* (1987) ont montré que la technique était suffisamment sensible pour permettre la détection du TGEV dans les fécès de porcs infectés expérimentalement. Les premiers essais, réalisés avec du BECV purifié ou présent dans le surnageant de culture de cellules HRT 18, sont prometteurs.

VERBEEK *et al.* (1987 et 1990) ont réalisé les premiers essais de détection du BECV dans les fécès de veaux diarrhéiques. La sensibilité de la technique serait supérieure au test ELISA réalisé en parallèle, mais nécessiterait l'emploi simultané de plusieurs sondes radioactives. Le problème du traitement préalable des échantillons fécaux avant fixation sur la membrane de nitrocellulose est posé. Une extraction au fréon semble faciliter le dépôt et améliorer la détection. L'utilisation de sondes radioactives est un

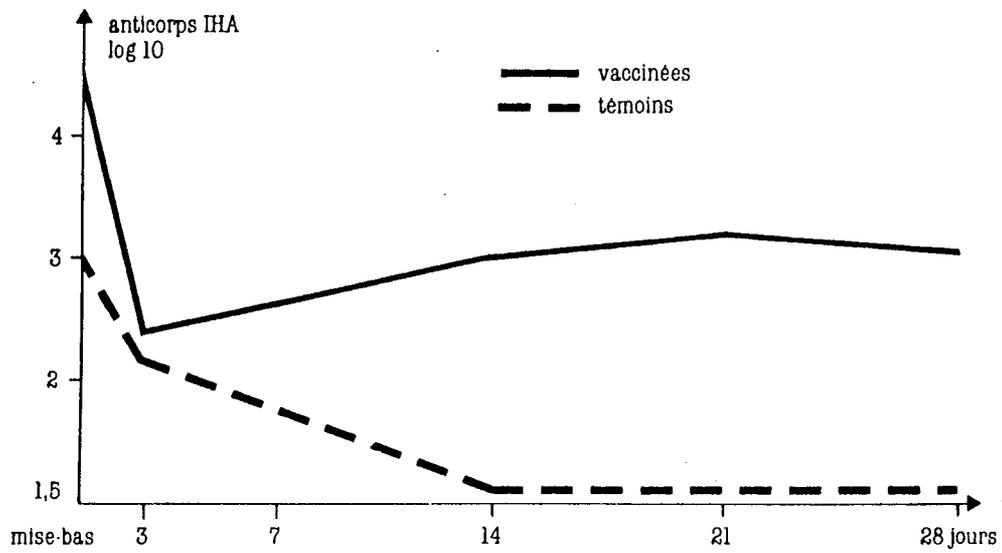


Fig. n° 8 : Evolution du taux des anticorps dans le lait et le colostrum (d'après RHONE MERIEUX - 1984)

inconvéient mais les sondes froides biotinylées donnent un bruit de fond trop important pour pouvoir envisager leur utilisation.

V - PROPHYLAXIE

Le traitement de l'entérite virale consiste essentiellement en une réhydratation entreprise dès l'apparition des premiers signes de la diarrhée et destinée à corriger le déséquilibre hydro-électrolytique, à lutter contre l'acidose et à nourrir l'animal (BRUGERE-PICOUX - 1985). Une antibiothérapie lui est associée dans la mesure où l'intervention des bactéries est quasi constante (WHITLOCK - 1984).

En l'absence de thérapeutique spécifique, la protection du veau passe par conséquent, avant tout, par la prévention.

Prophylaxie sanitaire et vaccinale

Elle porte sur plusieurs points :

- la surveillance de la vache, pendant le tarissement et en fin de gestation, afin de prévenir les mammites et de lui apporter une alimentation équilibrée, riche en vitamines (A et D₃) et en oligo-éléments (LAVAL *et al.* - 1988). La correction de la ration alimentaire permet à elle seule d'augmenter de 20 % le taux de survie des veaux (HUDSON et JOHNSON - 1986).

- l'alimentation du veau nouveau-né : l'administration de colostrum, riche en anticorps spécifiques, est essentielle et doit être précoce, dès la deuxième heure, après la parturition. SANDERS (1985) préconise d'administrer l'équivalent de 8 à 10 % du poids du corps dans les six premières heures. En effet, la perméabilité de l'intestin aux immunoglobulines permettant leur absorption par pinocytose est fugace. Elle serait de, 16 h, 22 h et 27 h pour, respectivement, les IgM, IgA et IgG (LAVAL *et al.* - 1988).

- la vaccination : des vaccins sont actuellement utilisables contre les principaux agents intervenant dans l'étiologie des entérites néonatales et, en particulier, contre les rotavirus et coronavirus. Cependant, l'extrême précocité de ces infections rend aléatoire une tentative de prévention par induction d'une immunité active chez le veau. En conséquence, la prévention repose essentiellement sur l'immunisation des vaches gestantes, suivie du transfert colostrale de l'immunité. En effet, il est possible d'augmenter et de prolonger la sécrétion d'anticorps, non seulement dans le colostrum, mais aussi dans le lait en vaccinant les vaches en fin de gestation (WELLEMANS et VAN OPDENBOSCH - 1979 ; SNODGRASS *et al.* - 1980) (fig. 8).

Un premier vaccin monovalent, destiné à prévenir l'entérite virale des veaux nouveaux-nés, a été élaboré à partir d'une souche de rotavirus (SOULEBOT *et al.* - 1981). Depuis cette date, un vaccin bivalent inactivé et adjuvé associant rotavirus et coronavirus est disponible (BRUN *et al.* - 1982). L'immunisation passive du veau est assurée par absorption du colostrum puis du lait de vaches vaccinées, pendant les trois premières semaines de la vie.

Il existe également un vaccin bivalent rota-corona-virus, constitué de virus vivants modifiés (FREMONT - 1981), pouvant être utilisé, selon l'auteur, avec des efficacités comparables pour la vaccination de vaches gestantes et du veau nouveau-né (FREMONT - 1983). Cependant, la vaccination orale des veaux est discutée en raison du taux d'anticorps colostraux risquant de neutraliser localement les virus vaccinaux.

Hygiène et environnement

La transmission de la maladie s'effectue vraisemblablement par l'intermédiaire des adultes porteurs sains ou atteints d'infections persistantes. Au cours des enzooties, le passage du virus de veau à veau, de mère à veau ou par l'intermédiaire des locaux infectés, peut se faire aisément. En raison de la multiplication intense du virus dans les entérocytes, les fécès des veaux atteints d'entérite aiguë contiennent des quantités très importantes de particules infectieuses (10^{10} particules par gramme), à l'origine d'un ensemencement sévère du milieu extérieur.

Ainsi, il est important de respecter certaines mesures d'hygiène essentielles (isolement et surveillance des veaux, aération convenable et désinfection des locaux après la mise au pré) réduisant la pression d'infection dans l'étable et diminuant la pollution virale de l'environnement, ces mesures pouvant faciliter la maîtrise des enzooties.

Dans le cadre de la mise en place de ces mesures d'hygiène, il est apparu que les responsables professionnels (éleveurs et vétérinaires) semblaient de plus en plus préoccupés par la qualité de l'eau destinée, notamment, à l'abreuvement des animaux (POMMIER et HUMBERT - 1989). Ils attribuent à la mauvaise qualité de l'eau une responsabilité dans divers troubles sanitaires ou zootechniques observés dans les élevages. Les problèmes les plus souvent cités sont d'ordre digestif et concernent les entérites des bovins mais également des porcs, poulets et lapins. Viennent ensuite les troubles de la reproduction et les affections urinaires. Des études épidémiologiques sont de toute évidence souhaitables afin de définir le rôle joué par l'eau et l'environnement dans l'apparition de certaines pathologies et, en particulier, des entérites. Peu

d'études ont été actuellement réalisées dans ce sens, sans doute en raison des difficultés rencontrées, surtout dans le domaine de la virologie.

Les techniques classiques de détection des virus portent sur de faibles volumes d'eau et ne sont pas adaptées à la recherche de particules dispersées dans l'environnement. Il est nécessaire d'utiliser des méthodes de concentration des virus présents dans les échantillons prélevés avant de pouvoir les détecter (BLOCK et SCHWARTZBROD - 1989). Or, ces techniques ont une efficacité limitée et variable suivant les virus concernés. Classiquement, la détection des virus concentrés se fait par mise en évidence de leur effet cytopathogène (ECP) après inoculation à une lignée de cellules sensible, leur dénombrement s'effectuant soit par une méthode de type quantique (nombre le plus probable ou NPP - dose cytopathique 50 % ou DCP 50), soit de type énumératif (technique des plages). Cependant, bon nombre de virus ne peuvent être caractérisés par leur ECP. Leur identification sur culture de cellules nécessite alors l'emploi de méthodes utilisées habituellement en biologie clinique, telles que l'immunofluorescence (SMITH et GERBA - 1982), l'immunoenzymologie ou la radioimmunolocalisation (LEMON *et al.* - 1983 ; LIU *et al.* - 1984).

Dans le cas des virus non cultivables, la seule possibilité réside dans leur mise en évidence directe dans les échantillons concentrés par des méthodes telles que la microscopie ou l'immunomicroscopie électroniques, les méthodes radioimmunologiques, immunoenzymatiques (ELISA) (STEINMANN - 1981), ou l'hybridation moléculaire actuellement à l'étude. Le problème majeur, dans ce cas, est de disposer de techniques suffisamment sensibles pour permettre la détection en absence d'amplification par passage sur culture cellulaire. Pour l'instant, parmi les virus responsables de diarrhée, seuls les rotavirus de groupe A, impliqués dans les gastroentérites de l'enfant, ont été recherchés dans l'environnement (GOYAL et GERBA - 1983 ; DEETZ *et al.* - 1984 ; BOSCH *et al.* - 1988 ; BERIL et SCHWARTZBROD - 1989 ; JOFRE *et al.* - 1989).

Il serait donc souhaitable de disposer de moyens d'étude pour l'ensemble des virus entériques afin d'apprécier leur rôle pathogène respectif dans le développement des entérites et leur diffusion dans l'environnement.

BUT DU TRAVAIL

Ces dernières années, des progrès importants ont été réalisés dans la connaissance de la structure et des mécanismes de réplication des coronavirus. Toutefois, la pathogénie et l'épidémiologie sont encore mal connues. Des études plus approfondies seraient en particulier souhaitables concernant la propagation des enzooties et épizooties, l'influence éventuelle de l'environnement dans leur survenue, l'existence des maladies persistantes ou encore le rôle pathogène des coronavirus dans les maladies entériques humaines. Pour réaliser de telles études, il est indispensable de disposer de tests efficaces et rapides permettant l'identification et la quantification des coronavirus présents chez l'homme, l'animal ou les milieux environnants.

Les techniques de détection des coronavirus sont encore peu performantes et bien des problèmes restent posés. En particulier, aucune étude n'a été publiée à ce jour concernant la recherche des coronavirus entériques dans le milieu hydrique. Ces observations nous ont donc incité à entreprendre des travaux visant à rechercher et améliorer leur détection et leur identification.

Pour atteindre cet objectif, le coronavirus entérique bovin (BECV souche F15) nous a semblé constituer un modèle d'étude intéressant en raison, d'une part, de sa responsabilité dans le développement d'entérites mortelles d'une grande incidence économique pour les élevages bovins et, d'autre part, de sa capacité à se multiplier *in vitro* sur culture de cellules HRT 18 fournissant ainsi les quantités importantes de virions nécessaires à l'expérimentation.

Parmi les nouvelles techniques de diagnostic rapide utilisées en virologie, l'hybridation moléculaire connaît un essor important. C'est pourquoi nous avons employé ce procédé à la fois sensible, spécifique et rapide, dans le but d'améliorer la détection et la caractérisation du BECV.

Ce travail est consacré au développement de sondes nucléiques capables de s'hybrider à l'ARN viral immobilisé sur une membrane par la technique du *dot* ou du *slot blot*.

Sa réalisation a impliqué l'extraction de l'ARN génomique, la préparation d'un ADN complémentaire (ADNc) et son clonage dans *Escherichia coli*, après insertion dans un vecteur. L'analyse de la banque d'ADNc obtenue a permis, après sélection, de disposer de clones convenant, par leur taille et leur position sur le génome, à la préparation de sondes.

L'expérimentation nécessaire à l'étude des conditions d'hybridation et à la détermination de la spécificité et de la sensibilité de la technique a été réalisée à partir de cultures de cellules infectées et de l'ARNg extrait du virus purifié. L'intérêt d'un traitement éventuel des échantillons à hybrider, afin d'optimiser la détection, a été pris en considération. Un marquage radioactif de la sonde nous a semblé préférable dans une première étape. Cependant, peu de laboratoires étant autorisés à manipuler des radioisotopes, une adaptation de la technique comportant le marquage non isotopique de la sonde (marquage enzymatique) a également été réalisée.

Notre but était, par la mise au point de ce test, de disposer d'un outil fiable et efficace pour la détection du BECV dans les prélèvements cliniques ou pour des recherches au sein de l'environnement.

Il s'agissait, en particulier, de pouvoir l'appliquer à la détection du BECV présent dans le milieu hydrique. Toutefois, le nombre des virus présents dans ce milieu étant en général trop faible pour permettre leur détection directe dans un échantillon d'eau à analyser, une étape de concentration, destinée à rassembler sous un faible volume les virus initialement dispersés dans plusieurs litres d'eau, s'avère indispensable avant d'envisager leur mise en évidence.

Les techniques de concentration virale actuellement proposées montrent une efficacité variable suivant les virus concernés, c'est pourquoi nous avons expérimenté deux procédés de concentration du BECV :

- une technique d'immunoaffinité utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre les déterminants antigéniques du BECV. L'objectif était de "capturer" les coronavirus de façon spécifique à l'aide d'un immuno-adsorbant dispersé dans l'eau à analyser. Dans ce but, il a été nécessaire de prévoir la préparation d'une quantité suffisante d'anticorps monoclonaux, leur purification, puis leur couplage à un support adapté à la mise en oeuvre d'une réaction d'affinité réalisée en suspension. L'immuno-adsorbant dispersé a ensuite été rassemblé afin d'effectuer l'élution des virus concentrés.
- une technique de concentration utilisant un procédé physique d'adsorption-élution sur poudre de verre, couramment employée dans le domaine de la virologie des eaux. L'objectif était de déterminer les conditions physico-chimiques précises d'adsorption puis d'élution des coronavirus sur la poudre de verre en utilisant du BECV marqué au ^{14}C afin de faciliter l'expérimentation.

A la suite de ces étapes de concentration, la détection des virus a été étudiée :

- soit par inoculation à un système cellulaire sensible présentant l'avantage de révéler le pouvoir infectieux des particules virales concentrées.

- soit par hybridation moléculaire qui permet, quant à elle, de conclure à une contamination, même si les particules virales ne sont plus infectieuses.

De plus, en cas de faible contamination des échantillons à analyser, le passage en culture cellulaire peut constituer un système d'amplification du matériel viral avant sa détection par hybridation moléculaire.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL

I - SOUCHES MICROBIENNES

1.1 Souches virales

Coronavirus entérique bovin (BECV)

Ce virus a été isolé à la station INRA de Thiverval-Grignon à partir des fécès d'un veau mort de diarrhée aqueuse (GOUET *et al.* - 1978 ; LAPORTE *et al.* - 1980). Deux souches (F15 et G110) provenant de l'adaptation en culture cellulaire du BECV sauvage sont disponibles :

- la souche F15 a été obtenue par la mise en culture du virus sauvage sur la lignée cellulaire HRT 18 (LAPORTE *et al.* - 1979 - 1980). Elle fait l'objet de ce travail.
- la souche G110 provient de l'adaptation du virus sauvage en culture primaire de rein d'embryon de veau (LAPORTE *et al.* - 1979). Ce coronavirus adapté se réplique également en culture de cellules HRT 18. Cette souche a été utilisée pour le titrage des anticorps monoclonaux.

Ces deux souches présentent les mêmes caractéristiques morphologiques et physiques que la souche sauvage. De plus, elles sont toujours pathogènes pour le veau nouveau-né (BOBULESCO - 1983).

Virus de la gastroentérite du porcelet (TGEV) Souche Purdue 115.

Rotavirus simien Souche SA 11.

1.2 Souche bactérienne

Escherichia coli RR1

Cette souche Rec A⁺ est utilisée de préférence à la souche *E. coli* HB 101 Rec A⁻ dont elle dérive. *E. coli* RR1 produit 10 fois plus de recombinants ADNc obtenus par allongement dG - dC que les souches Rec A⁻, alors que l'ADN de pBR 322 intact est transformé par les deux souches avec la même efficacité (PEACOCK *et al.* - 1981).

Cette souche permet l'amplification des plasmides recombinés.

II - CELLULES HRT 18 (Human Rectal Tumor)

Elles proviennent d'un adénocarcinome rectal humain (TOMPKINS *et al.* - 1974 ; LAPORTE *et al.* - 1980).

III - MILIEUX DE CULTURE

3.1 Milieu de culture bactérienne

<u>Milieu L</u>	Tryptone (DIFCO)	10 g
	Yeast extract (DIFCO)	5 g
	NaCl	0,5 g
	H ₂ O	qsp 1 l

- Ajuster à pH 7 avec NaOH 1 M.
- Autoclaver 20 min à 120°C.
- Au moment de l'emploi, ajouter 10 ml de glucose à 20 % (p/v), stérilisé par filtration.

Ce milieu est utilisé liquide ou gélosé (15 g/l d'agar DIFCO)

Il peut être rendu sélectif par addition d'antibiotiques aux concentrations suivantes :

- ampicilline : 100 µg/ml de milieu.
- tétracycline : 12,5 µg/ml de milieu.

3.2. Milieu de culture cellulaire

Le milieu RPMI 1640 (FLOW) est utilisé pour la croissance et l'entretien des cellules HRT 18 ainsi que pour la production et le titrage du BECV. Il est tamponné par NaHCO₃ à raison de 2 g/l, ajusté à pH 7,2, stérilisé par filtration sur membrane 0,22 µm et conservé à + 4°C.

Ce milieu de base est additionné de 20 % de SVF (FLOW) pour la croissance des cellules HRT 18 et de seulement 2 % de SVF pour la constitution du milieu de survie des cellules ou de titrage du virus.

Des solutions d'antibiotiques sont ajoutées au milieu simple ou complémenté de SVF :

- solution de tylosine - lincocine : 1 ml/100 ml de milieu.
- solution de streptomycine - spéicilline : 0,5 ml/100 ml de milieu.

Le milieu gélosé pour le titrage du BECV par la technique des plages est constitué de la façon suivante :

- 1/2 volume d'indubiose 1,2 % (p/v) (PHARMACIA) préparé à ébullition puis maintenu à 45°C.
- 1/2 volume de milieu RPMI 2X à 4 % de SVF additionné de solutions d'antibiotiques 2X (tylosine - lincocine, streptomycine - spécilline) à 37°C.

Ces deux milieux sont mélangés extemporanément.

IV - ENZYMES ET LEUR TAMPON

Les enzymes sont le plus souvent fournies par le fabricant avec un tampon approprié.

Désoxynucléotidyl transférase terminale : Tdt (BRL) 20 U/ μ l

tampon Tdt 5 X : Cacodylate de K 500 mM - CoCl₂ 10 mM - DTT 1 mM.

DNase I pancréatique (PHARMACIA)

Enzyme de restriction Pst I (BRL)

tampon Pst I 10 X : Tris HCl (pH 8) 50 mM - MgCl₂ 10 mM - NaCl 50 mM.

Lysozyme (PHARMACIA) : solution stock à 50 mg/ml dans de l'eau ultrapure répartie en fractions aliquotes de 500 μ l et conservée à - 20°C.

Pronase (SIGMA) : préparée sous forme d'une solution mère à 20 mg /ml en solution aqueuse.

Protéinase K (BOEHRINGER-MANNHEIM) : préparée sous forme d'une solution mère à 20 mg/ml et conservée en fractions aliquotes à - 20°C.

Ribonucléase T₂ (BRL) : 30 U/ μ l.

tampon T₂ : NaCl 500 mM - NaCOOCH₃,3H₂O (pH 4,5) 20 mM.

RNase A pancréatique (sans DNase) (PHARMACIA)

solution à 10 mg de RNase A lyophilisée dans 1 ml de tampon Tris 10 mM (pH 7,5) - NaCl 15 mM, conservée à - 20°C.

RNasine (GENOFIT) : 10 000 U/ml.

Transcriptase réverse (BRL) : 2,5 U/ μ l.

tampon transcriptase réverse 5 X : Tris HCl (pH 8,3) 500 mM - MgCl₂ 50 m M - DTT 50 mM.

V - REACTIFS

Acide trichloracétique (PROLABO)

Acrylamide (BIO-RAD)

Act-Magnogel - AcA 44 (IBF)

ADN :

- de sperme de saumon (SIGMA)

- de thymus de veau - 10 mg/ml (SIGMA)

Agarose pour électrophorèse des acides nucléiques (PHARMACIA)

Amorce oligo dT 12-18 (PHARMACIA)

Solution à 7,5 mg/ml.

Antibiotiques

Solutions stock

* Ampicilline (BOEHRINGER-MANNHEIM) :

solution aqueuse à 25 mg/ml.

* Tétracycline (SIGMA) :

solution hydroalcoolique à 12,5 mg/ml.

* Solution de tylosine-lincocine :

. Lincocine (UPJOHN) 300 mg/ml diluée au 1/6000 20 ml

. Tylosine (BIOMERIEUX) 5 mg/ml diluée au 1/2000 80 ml.

* Solution de streptomycine-spécilline :

. Streptomycine (DIAMANT) 20 mg/ml 50 ml

. Spécilline (SPECIA) $2 \cdot 10^4$ UI/ml 50 ml

Ces solutions sont stérilisées par filtration sur membrane de 0,22 μ m et conservées en fractions aliquotes à - 20°C.

Solution d'antibiotiques pour décontamination des concentrats viraux

. Benzyl pénicillinate de sodium (DIAMANT) 100 000 U/ml

. Néomycine (DIAMANT) 0,015 g/ml

. Sulfate de streptomycine (DIAMANT) 0,1 g/ml

. Amphotéricine B (fungizone) (SQUIBB) 50 μ g/ml

BEt : Bromure d'éthidium (BOEHRINGER-MANNHEIM)

Solution stock à 10 mg/ml. A conserver à 4°C à l'abri de la lumière.

Bisacrylamide (BIO-RAD)

BSA fraction IV : sérum albumine bovine (BRL)

DEPC : diéthylpyrocarbonate (SERVA)

Désoxynucléotides triphosphates (AMERSHAM)

Solutions stock de dATP - dCTP - dGTP - dTTP 10 mM.

DMSO : diméthylsulfoxyde (SIGMA)

Fixateur AL4 (KODAK)Immunsérums (INSTITUT PASTEUR)

- Sérum de mouton anti-IgG de souris marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine.
- Sérum de mouton anti-IgG de souris marqué à la peroxydase.
- Sérum de chèvre anti-IgG de souris de différentes sous-classes (IgG₁ - IgG_{2a} - IgG_{2b} - IgG₃)

Kits de marquage des sondes (AMERSHAM)

- Système ECL de détection de gènes RPN 2100 pour nitrocellulose.
- Marquage radioactif des sondes "Multiprime DNA labelling systems" RPN 1601.

Liquides de scintillation

- Cocktail T - Scintran (BDH)
- Instagel (PACKARD).

Marqueurs de masse moléculaire

- . Pour électrophorèse de protéines (BOEHRINGER-MANNHEIM)
 - Inhibiteur de la trypsine extrait du soja (M_r : 21 500)
 - Sérum albumine bovine (M_r : 68 000)
 - Différentes sous-unités d'ARN polymérase (M_r : 39 000 - 155 000 - 165 000)
- . Pour électrophorèse d'acides nucléiques (BRL)
 - ADN du phage λ coupé par Hind III : 8 fragments de 23 000 à 100 pb
 - ADN du phage Ø X 174 RF coupé par Hae III : 11 fragments de 1 353 à 72 pb
 - ADN du phage λ coupé par Eco RI et Hind III : 11 fragments de 21 700 à 560 pb

NP - 40 : Nonidet P-40 (BRL)

pBR 322 (BRL)

Le plasmide pBR 322 possède deux gènes de résistance aux antibiotiques, l'ampicilline et la tétracycline, permettant la sélection des recombinants en fonction de critères de résistance ou de sensibilité à ces antibiotiques.

pBR 322 - dG coupé par Pst I (BRL)

Ce vecteur est un plasmide pBR 322 coupé par Pst I au niveau du site de résistance à la tétracycline et possédant 16 à 18 résidus dG à chaque extrémité 3'

PEG : polyéthylène glycol 8 000 ou 20 000 (ALDRICH)

Persulfate d'ammonium (MERCK)

Phénol saturé (BRL)

Le phénol bidistillé est fondu à 68°C puis extrait plusieurs fois avec un même volume de tampon Tris 1 M (pH 8), puis Tris 0,1 M (pH 8) jusqu'à ce que le pH de la phase aqueuse soit supérieur à 7,6.

PIPES : Piperazine-N, N'-bis (2-ethanesulfonic acid) ;

1,4-Piperazinediethanesulfonic acid (SIGMA)

Poudre de verre (SOVIREL) : 100 µm < Ø < 200 µm

Protéine A - sépharose CL 4 B (PHARMACIA)

Radioisotopes

- Acides aminés marqués au ¹⁴C (CEA)

Activité spécifique 1,75 mCi/mg

- Désoxycytidine triphosphate marquée au ³²P (AMERSHAM)

[α-³²P] dCTP - solution aqueuse, 3 000 Ci/mmmole - 10 mCi/ml

- Désoxycytidine triphosphate tritiée (AMERSHAM)

[5-³H] dCTP - solution éthanol - eau (v/v) 30 Ci/mmmole

Révéléateur LX 24 (KODAK)Supports de chromatographie

- Séphadex G 50 medium (PHARMACIA)

- DEAE cellulose DE 52 (WHATMAN)

Tampons et solutions d'usage courant

- Acétate de potassium (pH 4,8)

Acétate de potassium 5 M 600 ml/l - acide acétique glacial 115 ml/l

Une solution 3 M en ions potassium et 5 M en ions acétate est obtenue.

- Alcalin (extemporané)

NaOH 0,2 M - SDS 1 %

- Charge (pour électrophorèse)

Glycérol 50 % - bleu de bromophénol 0,25 % (p/v)

- Citrate-phosphate 0,1 M (pH 5)

C₆H₈O₇, H₂O 7,3 g/l - Na₂HPO₄, 12 H₂O 23,84 g/l

Le pH est ajusté en ajoutant de l'acide citrique ou du phosphate disodique.

- Citrate de sodium - acide citrique 0,1 M (pH 6 - 4,5 - 3,5 ou 3)

C₆H₅Na₃O₇, 2H₂O 0,1 M - C₆H₈O₇, H₂O 0,1 M

Mélanger ces deux solutions jusqu'à obtention du pH désiré.

- Denhardt's 100 X

Ficoll 2 % - Polyvinylpyrrolidone 2 % - BSA 2 %

- Dissociation pour électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS

Tris-HCl 124 mM - SDS 6 % - 2-mercaptoéthanol 10 % - glycérol 20 %

- Electrophorèse en gel d'agarose alcalin 10 X

NaOH 300 mM - EDTA 20 mM

- Ethanolamine 0,1 M (pH 8)

Préparer une solution d'éthanolamine 0,1 M en tampon phosphate de potassium 0,1 M (pH 6,8).

Ajuster ce pH à 8 à l'aide d'HCl concentré.

- Formaldéhyde-SSC

Formaldéhyde à 37 % (p/p) 2 v - SSC 20 X 3 v

A préparer extemporanément.

- HCl-glycine 0,2 M (pH 2,8 ou 2,2)

A 100 ml d'HCl 2 M, ajouter une solution de glycine 2 M jusqu'à obtention du pH désiré. Compléter à 1 l avec de l'EBDS.

- Lavage A pour hybridation avec sonde radioactive

SSC 2 X - SDS 0,1 %

- Lavage B pour hybridation avec sonde radioactive

SSC 0,1 X - SDS 0,1 %

- Lavage ECL pour hybridation avec sonde enzymatique

Urée 6M - SSC 0,5 X - SDS 4 g/l

- Ligation 10 X

NaCl 100 mM - Tris-HCl (pH 7,8) 100 mM - EDTA 10 mM

- Lyse bactérienne (extemporané)

Glucose 50 mM - EDTA 10 mM - Tris-HCl (pH 8) 25 mM

lysozyme 4 mg/ml

- Migration pour électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS

Tris 24 mM - glycine 0,19 M (pH 8,3) - SDS 0,1 %

- Orthophénylène diamine pour ELISA

10 mg d'orthophénylène diamine dans 25 ml de tampon citrate 0,035 M - phosphate 0,066 M (pH 5) contenant 0,012% de peroxyde d'hydrogène

- PBS

NaCl 8 g/l - KCl 0,2 g/l - Na₂HPO₄ 12 H₂O 2,9 g/l - KH₂PO₄ 0,2 g/l

- PEG - NaCl

PEG 8000 13 % - NaCl 1,5 M

- Phosphate de potassium 0,1 M (pH 6,8 - 7,6 ou 8)

Ajouter à K₂HPO₄ 0,1 M la quantité nécessaire de KH₂PO₄ 0,1 M pour obtenir le pH désiré.

- Phosphate de sodium 0,14 M (pH 8)

Ajouter à Na_2HPO_4 0,14 M la quantité nécessaire de NaH_2PO_4 pour obtenir un pH égal à 8.

- Préhybridation pour sonde radioactive

Formamide désionisé 50 % - Denhardt's 5 X - SDS 0,1 % - SSC 5 X - ADN hétérologue de thymus de veau dénaturé et soniqué 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

- SSC 20 X

NaCl 3 M - citrate de Na trisodique 0,3 M (pH 7)

- TBE 10 X

Tris 108 g/l - acide borique 55 g/l - EDTA 0,5 M (pH 8) 40 ml/l

Solution de travail 1 X : Tris Borate 0,089 M - EDTA 2 mM (pH 8)

- TE 1 X

Tris-HCl (pH 7,4) 10 mM - EDTA (pH 8) 1 mM

- TNE 2 X

Tris-HCl (pH 8) 20 mM - NaCl 200 mM - EDTA (pH 8) 2 mM

- Trypsination

Trypsine (DIFCO) 2 g/l - EDTA 0,4 g/l dans du tampon PBS

La solution de trypsine est stérilisée par filtration et conservée à 4°C.

- Véronal 0,075 M (pH 8,6)

Acide diéthylbarbiturique 2,76 g/l - diéthylbarbiturate de sodium 15,45 g/l.

Temed : N, N, N', N', Tetramethylethyldiamine (MERCK)

Tween 20 (SIGMA)

L'ensemble des réactifs d'usage courant sont des produits MERCK de qualité Rectapur ou Normapur pour analyse.

VI - EQUIPEMENT

6.1 Appareillage

- Appareil de dépôt en *slot blot* PR 600 (HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENTS)
- Appareil ELGASTAT UHQ (APPLIGENE INSTRUMENTS)
- Appareil ISCO pour fractionnement de gradients
- Compteur à scintillation liquide (KONTRON INTERTECHNIQUE) Modèle SL 3000 équipé d'un système de standardisation externe
- Etuve à atmosphère contrôlée (JOUAN)

- Générateur Stavip 3000 (APELEX)
- Hotte à flux laminaire (ESI-FLUFRANCE)
- Lecteur de microplaques MULTISKAN (TITERTEK)
- Microcentrifugeuse SIGMA-201 M pour tubes Eppendorf (BIOBLOCK)
- Microscope électronique (PHILIPS EM 300)
- Microscope à fluorescence (LEITZ)
- Microscope inversé modèle IMT (OLYMPUS)
- Sécheur de gel (APELEX)
- Spectrophotomètre UV-Visible (VARIAN-TECHTRON)
- Table UV (BIOBLOCK)
- Ultracentrifugeuse (BECKMAN)

6.2 Petit Matériel

- Tubes de dialyse (POLY LABO)
- Cassettes pour autoradiographie (KODAK)
- Ecran intensificateur Dupont Cronex Lightning Plus (DUPONT DE NEMOURS)
- Films radiologiques :
 - . X Omat AR-5 (KODAK)
 - . Hyperfilm-ECL (AMERSHAM)
- Filtres de papier WHATMAN GF/C 24 mm
- Flacons plastiques (75 cm² et 150 cm²), boîtes de Pétri (10 cm de diamètre), plaques 6 puits pour culture cellulaire de 75 cm² (COSTAR)
- Membranes de nitrocellulose BA 85 (SCHLEICHER et SCHUELL)
- Papier WHATMAN 3M
- Saran Wrap (DOW CHEMICAL COMPANY)
- Unités de filtration sur membrane 0,22 µm (SARTORIUS)

METHODES

I - PRODUCTION DU CORONAVIRUS ENTERIQUE BOVIN

1.1 Culture des cellules HRT 18

Les cellules HRT 18 sont cultivées en milieu RPMI 1640 tamponné par NaHCO_3 , additionné de 20 % de sérum de veau foetal (SVF) et en présence d'antibiotiques, spécilline-streptomycine et tylosine-lincocine.

Les tapis de cellules confluentes sont traités par une solution de trypsine-EDTA en tampon PBS. Les cellules sont rapidement lavées avec 5 ml de cette solution, puis mises en contact avec quelques gouttes de cette même solution pendant 3 à 5 min à l'étuve à 37°C. Après dissociation du tapis, les cellules sont reprises dans du milieu RPMI contenant 20 % de SVF.

Les suspensions cellulaires sont réparties dans des flacons plastiques de 75 ou 150 cm^2 à raison de $1,5 \cdot 10^4$ cellules/ cm^2 dans 30 à 50 ml de milieu de croissance. La multiplication cellulaire s'effectue à 37°C sous atmosphère contenant 5 % de CO_2 nécessaire au maintien du pH à 7,2. Un tapis continu de cellules en monocouche est obtenu en 3 à 4 jours. Il peut être maintenu à l'état de survie pendant 1 à 3 semaines si nécessaire, dans un milieu RPMI contenant 2 % de SVF et à la température de 30°C.

La constitution d'un stock de cellules HRT 18 est assurée par congélation de celles-ci à - 80°C dans du milieu RPMI contenant 20 % de SVF, 10 % de DMSO et des antibiotiques en solution deux fois concentrée.

1.2 Production du virus

La production virale est réalisée sur un tapis de cellules HRT 18 confluentes, en flacons de 150 cm^2 . Après élimination du milieu de croissance et rinçage avec du milieu RPMI, les cellules sont inoculées par une suspension virale correspondant à une multiplicité d'infection de l'ordre de 1 UFP/cellule. L'adsorption des particules virales est réalisée pendant 1 h à 37°C, puis les cellules infectées sont recouvertes de 30 ml de milieu RPMI contenant 2 % de SVF et mises à incuber à 37°C sous atmosphère contenant 5 % de CO_2 . Après 3 jours d'incubation, les flacons de culture sont congelés

puis décongelés et la suspension virale ainsi obtenue est répartie en ampoules conservées à - 80°C.

1.3 Marquage isotopique des particules virales

La production du virus s'effectue selon le protocole précédemment décrit. Toutefois, à la fin de la phase d'adsorption, le marquage *in vivo* des protéines virales est réalisé en incorporant au milieu RPMI, complété de 2 % de SVF, un mélange d'acides aminés marqués au ¹⁴C (activité spécifique de 1,75 mCi/mg) à raison de 2 µCi/ml.

1.4 Titrage du virus par la technique des plages

Le titrage du virus produit en culture cellulaire est réalisé par la technique des plages selon le protocole décrit par VAUTHEROT (1981).

Des tapis de cellules HRT 18 confluentes, cultivées en plaques de 6 cupules, sont rincés deux fois avec du milieu RPMI, puis inoculés par des dilutions en série du BECV (de 10⁻⁵ à 10⁻⁹) sous un volume de 500 µl. Deux cupules sont prévues par dilution ainsi que deux témoins cellules non inoculées. L'adsorption est réalisée pendant 1 h à 37°C, puis l'inoculum est éliminé par aspiration. Après deux lavages avec du milieu RPMI, les cellules sont recouvertes par 2 ml de milieu RPMI complété de 2 % de SVF et contenant 0,6 % d'agarose à 42°C, puis placées sous atmosphère contenant 5 % de CO₂ pendant 3 jours à 37°C.

Des plages de lyse circulaires et opalescentes apparaissent progressivement, visibles à l'oeil nu. Il est cependant préférable de les révéler par différentes techniques telles que l'hémadsorption des globules rouges de rat, la coloration au rouge neutre (VAUTHEROT - 1981), ou la coloration au cristal violet (BLOCK et SCHWARTZBROD - 1989). Cette dernière technique présente l'avantage d'être simple et rapide. Elle consiste à fixer les cellules avec une solution d'acide trichloracétique à 10 % pendant 30 min. Après élimination de la couche gélosée, le tapis cellulaire est recouvert de 2 ml d'une solution de cristal violet à 0,15 % pendant 3 à 4 min, puis lavé abondamment à l'eau. Les plages colorées en rose apparaissent nettement sur le fond cellulaire violet.

Après dénombrement des plages, le titre infectieux de la suspension virale est exprimé en UFP/ml. Les titres obtenus sont le plus souvent de

l'ordre de 2 à $4 \cdot 10^8$ UFP/ml. Toutefois, certaines suspensions virales peuvent atteindre un titre de l'ordre de 10^9 UFP/ml.

1.5 Purification du virus

Le protocole suivi est adapté de celui décrit par SHARPEE *et al.* (1976). Le lysat cellulaire obtenu après congélation puis décongélation de deux flacons de culture de cellules HRT 18 infectées est clarifié par centrifugation à $5\,000$ g pendant 15 min. Les particules virales contenues dans le surnageant sont concentrées par ultracentrifugation à $100\,000$ g pendant 90 min à 4°C (rotor 45 Ti). Le culot de virus est homogénéisé dans 5 ml d'eau bidistillée stérile (EBDS), déposé sur un gradient linéaire de concentration en saccharose (20 à 45 % en solution aqueuse) de 34 ml, puis soumis à une centrifugation de zone à $83\,000$ g pendant 120 min (rotor SW 27).

Le gradient est recueilli par fractions de $1,6$ ml au moyen d'un appareil ISCO pour le fractionnement des gradients permettant un enregistrement en continu de l'absorbance à 254 nm. Lorsque la purification est réalisée dans un but essentiellement préparatif, la bande contenant les particules virales, visible sur fond noir et lumière incidente, peut être collectée par simple aspiration à l'aide d'une aiguille reliée à une pompe péristaltique.

La suspension virale recueillie est diluée au demi dans de l'EBDS et centrifugée à $100\,000$ g pendant 90 min (rotor 45 Ti). Le culot de centrifugation est repris dans 2 ml d'EBDS, déposé sur un gradient linéaire de concentration en saccharose (20 à 60 % en solution aqueuse) de 37 ml, puis soumis à une centrifugation isopycnique à $83\,000$ g pendant 18 h à 4°C (rotor SW 27). La bande contenant le virus purifié est collectée selon les méthodes décrites pour la centrifugation de zone.

Le virus purifié est sédimenté par ultracentrifugation, repris dans quelques ml d'EBDS et conservé à -80°C après avoir déterminé la quantité obtenue par mesure de l'absorbance à 256 nm. On utilise pour ce calcul le coefficient d'extinction du coronavirus humain 229E, $E \frac{1\%}{1\text{ cm}} = 54,3$ (HIERHOLZER - 1976).

II - PREPARATION DE L'ARN GENOMIQUE VIRAL

L'extraction de l'ARNg est réalisée à partir de BECV produit en culture de cellules HRT 18, puis purifié. La quantité de virus utilisée pour une extraction correspond à une production de 6 à 8 flacons de 150 cm^2 .

A 1 ml de virus purifié en suspension aqueuse sont ajoutés un volume égal de tampon TNE 2X et 200 µg/ml de protéinase K. Après une incubation de 30 min à 37°C, un égal volume de même tampon contenant 2 % de SDS est à nouveau ajouté. L'incubation est poursuivie 5 min à 50°C, puis 30 min à 25°C.

L'ARNg libéré subit ensuite une double extraction par un mélange phénol-chloroforme à pH 9,5, puis est précipité à l'éthanol (annexes 2 et 3). Après centrifugation, le précipité est lavé à l'éthanol à 70 %, dissous dans 50 µl d'eau ultrapure, puis conservé en fractions aliquotes à - 20°C.

La quantité et la pureté du matériel obtenu est estimée par mesure de l'absorbance à 260 et 280 nm (annexe 4).

Dans le cas d'une conservation de longue durée et afin d'assurer une bonne protection contre l'action des RNases, il est préférable de stocker l'ARNg sous forme de précipité à l'éthanol.

III - PREPARATION DES AMORCES ALEATOIRES

Un gramme d'ADN de thymus de veau en solution dans 30 ml de tampon Tris- HCl (pH 7,4) 20 mM, MgCl₂ 10 mM est incubé 30 min à 37°C en présence de 2 mg de DNase I pancréatique. Après addition de 3 ml de SDS 10 % et 30 mg de pronase, l'incubation est poursuivie à 37°C pendant 45 min. Les protéines sont ensuite extraites deux fois au phénol-chloroforme.

L'ADN digéré est dénaturé par chauffage à 100°C pendant 15 min puis refroidi rapidement dans la glace. La solution est amenée à une concentration en NaCl de 0,1 M puis déposée sur une colonne de 20 ml de DEAE-cellulose (DE 52) équilibrée dans un tampon Tris-HCl (pH 7,4) 5 mM, EDTA 1 mM, NaCl 0,1 M. Le débit d'écoulement est réglé à 50 ml/heure à l'aide d'une pompe péristaltique.

Après lavage avec environ 300 ml de tampon d'équilibrage jusqu'à obtention d'une absorbance à 260 nm inférieure à 0,05 en sortie de colonne, les fragments d'ADN sont recueillis dans du tampon Tris-HCl (pH 7,4) 5 mM, EDTA 1 mM, NaCl 0,3 M sous un volume approximatif de 150 ml. Ils sont ensuite concentrés par précipitation à l'éthanol, dissous dans de l'eau ultrapure à la concentration de 50 mg/ml, puis conservés à - 20°C en fractions aliquotes.

IV - CLONAGE DE L'ARN GENOMIQUE VIRAL

4.1 Synthèse d'un hétéroduplex ARN-ADNc

Conditions de la réaction :

ARNg		2 µg
Amorce oligo dT 12-18		5 µg
ou Amorces aléatoires		10 µg
Tris HCl (pH 8,3)		100 mM
Mg Cl ₂		10 mM
DTT		10 mM
KCl		70 mM
RNasine		1 U/µl
dATP, dGTP, dTTP		1 mM
dCTP		0,5 mM
[α - ³² P] dCTP		10 µCi
Transcriptase réverse		7,5 U/µg d'ARN
H ₂ O	qsp	50 µl

A 2 µg d'ARNg sont ajoutés en solution aqueuse sous un volume de 22,5 µl :

- soit 5 µg d'une amorce oligo dT 12-18
- soit 10 µg d'amorces aléatoires

Après dénaturation par chauffage à 65°C pendant 5 min, le mélange est refroidi rapidement dans la glace. Dans le cas des amorces aléatoires, cette étape est suivie d'une préincubation de 30 min à température ambiante.

Sont ensuite additionnés 27,5 µl du mélange suivant : tampon transcriptase réverse 5X (10 µl), KCl 500 mM (5 µl), RNasine (50 U), mélange des 4 désoxynucléotides (5 µl), [α - ³²P] dCTP (10 µCi), transcriptase réverse (15 U).

Après incubation à 42°C pendant 1 h 30, la réaction est arrêtée par 2 µl d'EDTA 500 mM.

L'hétéroduplex ARN-ADNc ainsi synthétisé est extrait au phénol-chloroforme, puis précipité à l'éthanol.

La quantité d'ADNc synthétisé est estimée en comparant la radioactivité introduite à celle retrouvée après précipitation au TCA d'une fraction aliquote du mélange. On estime que la quantité de dCTP incorporée est proportionnelle à la radioactivité retrouvée sous forme de matériel TCA précipitable.

Sachant que :

- le nombre de dCTP introduits dans le volume réactionnel de 50 μ l est de 25 nM
- la masse molaire du dCTP est d'environ 350
- les dCTP incorporés représentent approximativement le quart des nucléotides de l'ADNc,

la masse d'ADNc synthétisé, exprimée en ng, peut être estimée comme suit :

$$\frac{\text{cpm incorporés}}{\text{cpm introduits}} \times 25 \times 350 \times 4$$

La taille des ADNc obtenus est analysée par électrophorèse en gel d'agarose alcalin à 1 % en présence de marqueurs de masse moléculaire (McDONNELL *et al.* - 1977). Environ 10 000 cpm de la fraction TCA précipitable sont déposés dans un puits. Après migration une nuit sous une tension de 50 V, le gel est neutralisé dans du tampon TE (pH7) pendant 30 min, puis immergé dans une solution de BEt à 0,5 μ g/ml pour mettre en évidence les marqueurs par examen en lumière UV. Après séchage sous vide à + 70°C, le gel est placé en autoradiographie à - 80°C pendant une nuit en présence d'un écran intensificateur (annexe 5).

4.2 Insertion de l'hétéroduplex ARN-ADNc dans un vecteur de clonage

4.2.1 Traitement par la ribonucléase T₂

Le précipité d'ARN-ADNc conservé dans l'éthanol est centrifugé puis repris dans 12,5 μ l d'eau ultrapure et 12,5 μ l de tampon T₂. Après addition de 9 U de ribonucléase T₂, la solution est incubée 15 min à 37°C. La réaction est arrêtée par extraction au phénol-chloroforme, puis le volume est ajusté à 100 μ l par addition de tampon TNE 1X.

Les fragments d'ARN monobrin digérés, ainsi que les dNTPs non incorporés, sont éliminés par filtration sur Séphadex G50 medium tassé par centrifugation à 1 600 g dans une seringue à tuberculine de 1 ml et équilibrée dans du tampon TNE 1X ("spun column") (MANIATIS *et al.* - 1982).

Afin de juger de l'efficacité de la filtration, il est souhaitable de vérifier à la sortie de la colonne, sur une fraction aliquote, que la radioactivité totale est à peu près égale à la radioactivité incorporée.

A la fin de cette étape, l'action de la ribonucléase T2 peut être contrôlée par électrophorèse en gel d'agarose alcalin comme cela a été décrit pour la synthèse de l'ADNc.

L'hétéroduplex ARN-ADNc ainsi traité est concentré par précipitation à l'éthanol puis dissous dans de l'eau ultrapure à la concentration de 10 ng/ μ l.

4.2.2 Addition d'extrémités poly dC

Conditions de la réaction :

ARN-ADNc		100 ng
Cacodylate de K		100 mM
CoCl ₂		2 mM
DTT		0,2 mM
Tris-HCl (pH 6,9)		25 mM
BSA		250 μ g/ml
dCTP		12 μ M
dCTP ³ H		10 μ Ci (19 μ M)
Tdt		10 U
H ₂ O	qsp	20 μ l

A 10 μ Ci de dCTP³H lyophilisé sont ajoutés 10 μ l d'ARN-ADNc en solution aqueuse et 10 μ l du mélange suivant : tampon Tdt 5X 40 % (v/v), Tris-HCl (pH 6,9) 50 mM, BSA 500 μ g/ml, dCTP 25 μ M.

Le mélange est incubé à 37°C pendant 10 min en présence de 10 U de désoxynucléotidyl transférase terminale (Tdt), puis conservé dans la glace. La longueur moyenne des extrémités poly dC synthétisées est alors estimée.

Si l'allongement est suffisant, la réaction est arrêtée par addition de 2 μ l d'EDTA 50 mM, puis le mélange est centrifugé à 10 000 g pendant 2 min. Le surnageant est récupéré en évitant de toucher le culot.

Calcul du nombre de dC additionnés en 3'

- taille moyenne de l'ARN-ADNc synthétisé : Xpb (estimé par électrophorèse)
- Mr moyenne de l'ARN-ADNc : Xpb x Masse molaire d'une pb
- Nombre d'extrémités 3' (picomoles) :

$$\frac{\text{quantité d'ARN-ADNc introduite (ng)} \times 2}{\text{Mr moyenne de l'ARN-ADNc (ng/picomole)}}$$

- Nombre de résidus dC en 3' :

$$\frac{\text{nombre de dCTP introduit (picomoles)} \times \text{cpm incorporés}}{\text{nombre d'extrémités 3' (picomoles)} \times \text{cpm introduits}}$$

4.2.3 Ligation

Une quantité de 100 ng de pBR322-dG est mise en présence de 20 ng d'ARN-ADNc en tampon de ligation sous un volume de 20 µl.

Le mélange est incubé à 65°C pendant 10 min puis le bain-marie est éteint afin de laisser la température descendre lentement au cours de la nuit.

La non-recircularisation du vecteur sur lui-même est contrôlée en l'incorporant seul dans une réaction témoin.

4.3 Transformation de la souche *E. coli* RR1 par un plasmide

4.3.1 Production de bactéries compétentes

Un volume de 10 ml de milieu L estensemencé avec une colonie de la souche réceptrice *E. coli* RR1 et incubé une nuit à 37°C sous agitation.

Ensuite, 40 ml de milieu L sont inoculés avec 400 µl de cette préculture. L'incubation se poursuit sous agitation à 37°C jusqu'à obtention d'une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance. ($A_{550\text{nm}} = 0,4$). La suspension bactérienne est alors placée dans la glace 10 min, puis centrifugée à 3 500 g à 4°C pendant 10 min.

Toutes les opérations suivantes sont réalisées dans la glace. Le culot de bactéries est remis doucement en suspension dans 25 ml de solution CaCl₂ 50 mM, MOPS (pH 7) 10 mM, et laissé 30 min à 0°C. Les bactéries sont à nouveau centrifugées à 3 500 g à 4°C pendant 10 min, remises en suspension dans 4 ml de CaCl₂ 50 mM, puis conservées dans la glace jusqu'au lendemain.

4.3.2 Transformation bactérienne

La suspension de bactéries compétentes (200 µl) est mélangée à 100 ng de plasmide recombiné (soit 20 µl de mélange de ligation).

Sont préparés dans les mêmes conditions, un témoin de compétence avec 100 ng de pBR322, ainsi qu'un témoin de non-recircularisation du vecteur sur lui-même avec 100 ng de pBR322-dG.

Après un temps de contact de 45 min dans la glace fondante, les bactéries subissent un choc thermique de 3 min à 41°C, puis sont remises 3 min au

minimum dans la glace. Elles sont alors diluées dans 500 µl de milieu L, incubées sous agitation douce à 37°C pendant 2 h, puis étalées, à raison de 150 µl par boîte, sur milieu L gélosé additionné de tétracycline.

Après incubation à 37°C pendant 16 à 24 h, les clones résistants à la tétracycline sont dénombrés puis repiqués sur milieu L gélosé additionné, soit d'ampicilline, soit de tétracycline, afin de sélectionner les clones contenant un plasmide recombiné.

Les clones Tet^R Amp^S sont conservés par congélation à - 80°C dans du milieu L additionné de tétracycline et contenant 15 % de glycérol.

V - TECHNIQUES DE PREPARATION ET D'ANALYSE DES PLASMIDES

5.1 Minipréparations (MANIATIS *et al.* - 1982 ; BIRNBOIM et DOLY - 1979)

Du milieu L (5 ml), additionné de tétracycline, estensemencé avec une colonie d'*E. coli* RR1 porteuse du plasmide à amplifier et incubé à 37°C pendant une nuit.

La suspension bactérienne est centrifugée 1 min à 10 000 g, puis le culot est repris dans 100 µl de tampon de lyse froid et laissé 5 min à la température ambiante. Deux cents µl de tampon alcalin sont ajoutés pour dénaturer l'ADN chromosomique et le mélange est maintenu dans la glace 5 min. L'ADN chromosomique et les complexes SDS-protéines sont précipités par addition de 150 µl de tampon acétate de potassium à pH 4,8 (BOFFEY - 1983).

Après un contact de 5 min dans la glace, le mélange est centrifugé à 10 000 g pendant 5 min. Le surnageant contenant l'ADN plasmidique est extrait au phénol-chloroforme et précipité à l'éthanol. Après centrifugation 30 min à 10 000 g, le précipité, lavé à l'éthanol à 70 %, est repris dans 20 µl de TE contenant 20 µg/ml de RNase A.

5.2 Maxipréparations

Cette technique permet d'obtenir en une seule préparation de grandes quantités d'ADN plasmidique.

Du milieu L (20 ml), additionné de tétracycline, estensemencé avec une colonie d'*E. coli* RR1 porteuse du plasmide à amplifier et incubé 2 à 3 h à 37°C sous agitation.

Du milieu L (500 ml), additionné de tétracycline, est ensemencé avec la totalité de cette préculture et incubé à 37°C pendant une nuit sous agitation forte.

La suspension bactérienne est centrifugée à 4°C 10 min à 3 000 g. Le culot est lavé avec 100 ml de tampon TNE (pH 8), mis en suspension dans 10 ml de tampon de lyse bactérienne et laissé à température ambiante 5 min. Vingt ml de tampon alcalin sont ajoutés, puis, après un séjour de 10 min dans la glace, 15 ml de tampon acétate de potassium (pH 4,8). Le mélange est laissé 10 min dans la glace puis centrifugé à 10 000 g.

Le surnageant recueilli est extrait au phénol-chloroforme. La phase aqueuse est récupérée dans des tubes Corex à raison de 18 ml par tube, additionnée de 12 ml d'isopropanol et laissée à température ambiante 30 min. Après centrifugation à 10 000 g pendant 30 min, les précipités sont lavés à l'éthanol à 70 %, séchés, dissous dans 1 ml de TE (pH 8) additionné de 40 µl d'une solution de RNase à 10 mg/ml, puis incubés 30 min à 37°C (GRINSTED et BENNETT - 1984). Le mélange est réparti par fractions de 500 µl dans des tubes Eppendorf. Un égal volume de tampon PEG 8 000-NaCl est ajouté et l'incubation se poursuit 30 min dans la glace. Le PEG est éliminé par deux centrifugations successives de 10 min à 10 000 g. Les culots sont repris dans 100 µl de TE, extraits au phénol-chloroforme et précipités à l'éthanol. Après centrifugation 30 min à 10 000 g, les précipités sont lavés à l'éthanol à 70 %, puis rassemblés dans 100 µl de TE et conservés à - 20°C.

La quantité d'ADN plasmidique obtenue est estimée par mesure de l'absorbance à 260 nm.

5.3 Digestion par les enzymes de restriction

Les enzymes de restriction sont utilisées dans des conditions de température et de tampon conseillées par le fournisseur. Le plus souvent, l'enzyme est livrée avec son tampon concentré 5 ou 10 fois.

La digestion est réalisée à partir, soit de 1 à 2 µg de plasmide purifié, soit de la moitié du matériel obtenu à l'issue d'une minipréparation. La réaction est effectuée en solution aqueuse sous un volume de 40 µl en présence de 4 µl de tampon de l'enzyme concentré 10 fois et de 1 à 2 U d'enzyme. Dans la majorité des cas, il est nécessaire d'utiliser un rapport unités d'enzymes/µg d'ADN plus élevé que celui conseillé par le fournisseur. Après une incubation le plus souvent à 37°C pendant 1 à 2 h, la réaction est arrêtée par

chauffage à 70°C si une deuxième digestion est envisagée, ou par addition de tampon de charge d'électrophorèse avant dépôt sur gel.

5.4 Electrophorèse en gel d'agarose

La concentration du gel en agarose est fonction de la taille des fragments d'ADN à séparer. L'utilisation de gels à 0,8 - 1 ou 1,2 % d'agarose permet l'analyse de fragments de 0,3 à 10 kb (MANIATIS *et al.* - 1982 ; THOMAS - 1984)

Des gels de 5 mm d'épaisseur sont constitués par dissolution de la quantité requise d'agarose dans du tampon TBE. Après refroidissement à 50°C, la solution aqueuse de BEt à 10 mg/ml est ajoutée à la concentration finale de 0,5 µg/ml. Le gel est coulé dans un appareil à électrophorèse horizontal, le peigne étant en place. Après complet refroidissement, le peigne est retiré et les cuves sont remplies de tampon TBE jusqu'à immersion complète du gel.

Les échantillons d'ADN sont additionnés de 1/5 de leur volume de tampon de charge et déposés dans les puits du gel.

L'électrophorèse est réalisée sous une tension de 80-100 V pendant 2 à 3 h ou de 30-40 V durant une nuit.

L'incorporation du BEt au gel permet de localiser les bandes d'ADN par transillumination à 302 nm. Le BEt est un agent intercalant qui se fixe entre les bases des acides nucléiques en donnant une fluorescence sous UV.

5.5 Electroélution

Le procédé permet, après migration électrophorétique, d'extraire l'ADN à partir d'un gel d'agarose. La technique peut être réalisée dans la cuve contenant le tampon TBE ayant servi à l'électrophorèse.

Des tubes de dialyse prétraités (annexe.7) sont rincés à l'eau ultrapure avant emploi.

Les bandes d'ADN localisées par transillumination du gel d'agarose à 302 nm sont découpées au scalpel et placées dans un tube de dialyse avec un peu de tampon TBE. Le tube est fermé en évitant d'emprisonner des bulles d'air et placé dans la cuve remplie de tampon TBE. L'électroélution est réalisée sous une tension de 110 V pendant 1 à 2 h afin de permettre à l'ADN de sortir du gel. Après inversion du courant pendant 2 min pour décrocher l'ADN des parois, l'électroéluat est récupéré avec le tampon de rinçage du tube. Le BEt est éliminé par deux extractions phénol-chloroforme. L'ADN

isolé est précipité à l'éthanol. Après centrifugation, le précipité est repris par 10 µl de TE et conservé à - 20°C.

VI - TECHNIQUES D'HYBRIDATION MOLECULAIRE

6.1 - Préparation des sondes

6.1.1 Marquage radioactif au ^{32}P

La sonde est marquée en utilisant la technique d'amorçage au hasard. Les réactifs utilisés sont fournis par le Kit de marquage "Multiprime DNA labelling systems" commercialisé par AMERSHAM.

Après dénaturation par chauffage à 95°C pendant 5 min et refroidissement dans un bain de glace, 100 à 200 ng d'ADN en solution dans 10 µl d'eau ultrapure sont mis à incuber en présence de 10 µl d'un mélange de désoxynucléotides (dATP, dGTP, dTTP en tampon 5X contenant du Tris-HCl (pH 7,8), du chlorure de magnésium et du 2-mercaptoéthanol), 5 µl d'un mélange d'hexanucléotides en solution aqueuse contenant de la BSA, 5 µCi de dCTP [$\alpha^{32}\text{P}$], 2 U d'ADN polymérase I (fragment de Klenow) sous un volume final de 50 µl.

Après incubation de 30 min à 37°C ou de 1 à 3 h à la température du laboratoire, le pourcentage d'incorporation des nucléotides est estimé en comparant la radioactivité introduite à celle retrouvée après précipitation au TCA d'une fraction aliquote du mélange. Si le taux d'incorporation est satisfaisant (60 à 80 %), la réaction est arrêtée par addition de 5 µl d'EDTA 0,5 M et 1 µl de SDS à 10 % en solution aqueuse. La sonde peut se conserver à - 20°C quelques jours (la demi-vie du ^{32}P est de 14,3 jours) et doit être dénaturée avant hybridation.

L'activité spécifique de la sonde (exprimée en dpm/µg) est estimée selon le calcul suivant :

$$\frac{\text{Radioactivité incorporée (dpm)}}{\text{ADN matrice } (\mu\text{g}) + \text{ADN néosynthétisé } (\mu\text{g})}$$

où la radioactivité incorporée (dpm) =

$$\text{dNTP } (\mu\text{Ci}) \times 2,2 \cdot 10^4 \times \% \text{ incorporation}$$

et ADN néosynthétisé (ng) =

$$\frac{\text{dNTP } (\mu\text{Ci}) \times 13,2 \times \% \text{ incorporation}}{\text{activité spécifique dNTP (Ci/mmol)}}$$

6.1.2 Marquage enzymatique

Nous avons utilisé le protocole et l'ensemble des réactifs fournis par le Kit "ECL gene detection system" (*Enhanced Chemiluminescence*) commercialisé par AMERSHAM .

La quantité d'ADN à marquer (200 ng d'ADN au minimum), diluée à la concentration de 10 ng/ μ l dans de l'eau ultrapure stérile, est dénaturée par chauffage à 95°C pendant 5 min, puis refroidie dans un bain de glace. Un volume équivalent de réactif de marquage (peroxydase), puis de glutaraldéhyde, sont ajoutés à l'ADN dénaturé. Le mélange est incubé 10 min à 37°C. Si l'utilisation n'est pas immédiate, la sonde marquée peut être conservée 10 à 15 min dans la glace ou 6 mois dans du glycérol à 50 % et à -20°C. Le marquage étant très rapide, il est souhaitable de mettre en route le protocole de préhybridation avant la préparation de la sonde.

6.2 Préparation des échantillons à hybrider

6.2.1 ARN génomique viral

Des dilutions successives d'ARNg sont réalisées en tampon TE puis, selon le cas, deux techniques différentes sont employées :

- après dénaturation par chauffage à 95°C pendant 5 min, puis refroidissement dans la glace, les dilutions sont déposées sur la membrane de nitrocellulose, soit directement, soit après addition de 100 μ l de SSC 20 X.
- aux dilutions d'ARNg réalisées sous un volume de 25 μ l est ajouté un égal volume de NP-40 en solution à 1 % dans du tampon TE, puis 50 μ l d'un mélange de formaldéhyde/SSC. Les échantillons sont portés à 60°C pendant 15 min, puis déposés sur la membrane de nitrocellulose (SHOCKLEY *et al.* - 1987 ; WHITE et BANCROFT - 1982).

6.2.2. Virus produit en culture cellulaire

Des cultures de cellules infectées ou non infectées par du virus sont préparées suivant le protocole décrit au paragraphe I et traitées simultanément.

Après trois cycles de congélation-décongélation, la suspension virale est clarifiée par centrifugation à 5 000 g pendant 10 min, puis, selon le cas, différents traitements sont envisagés :

- dépôt direct de la suspension virale sans traitement préalable

Des dilutions successives de la suspension virale sont réalisées dans du tampon TE. Après dénaturation par chauffage à 95°C pendant 5 min, et refroidissement dans la glace, ces dilutions sont déposées sur la membrane de nitrocellulose, soit directement, soit après addition de SSC 1 X (100 µl).

- lyse des virus par le NP-40

Des dilutions successives de suspension virale sont réalisées dans du tampon TE sous un volume de 25 µl, puis un égal volume de NP-40 en solution à 1 % dans du tampon TE est ajouté dans chaque tube. Après une incubation de 10 min à 0°C et addition de 50 µl d'un mélange de formaldéhyde/SSC, les échantillons sont portés à 60°C pendant 15 min, puis déposés sur la membrane de nitrocellulose (SHOCKLEY *et al.* - 1987).

- extraction des acides nucléiques après action de la protéinase K

Les acides nucléiques sont extraits après action de la protéinase K suivant le protocole décrit pour la préparation de l'ARNg viral (paragraphe II). Après extraction et purification, ils sont repris en tampon TE, puis des dilutions successives sont réalisées dans ce même tampon. Après dénaturation, les dilutions sont déposées sur la membrane de nitrocellulose, soit directement, soit après addition de SSC 20 X (100 µl).

- extraction des acides nucléiques au phénol (CRUCIERE - 1988 ; FLORES *et al.* - 1983)

Le protocole suivi est identique à celui décrit précédemment. Toutefois, dans le cas présent, les acides nucléiques sont simplement extraits par un égal volume de phénol, de phénol-chloroforme, puis de chloroforme avant d'être précipités à l'éthanol et repris en tampon TE.

6.2.3 Fécès de veaux

Les prélèvements fécaux en attente d'être traités sont conservés à - 80°C. Une partie aliquote (environ 500 µl) est homogénéisée dans 750 µl de PBS, puis clarifiée par centrifugation à 20 000 g pendant 30 s dans une centrifugeuse pour tube Eppendorf afin de sédimenter les plus gros débris.

Les différents traitements envisagés pour la préparation du virus produit en culture cellulaire (paragraphe 6.2.2) sont appliqués sur 25 µl de surnageant pur ou dilué au 1/10 en tampon TE, ce qui correspond respectivement à 10 et 1 µl de fèces.

6.2.4 Echantillons d'eau

L'éluat récupéré après concentration des virus est centrifugé 1 h à 35 000 t/min en 45 Ti, puis le culot est repris et homogénéisé dans 1 à 1,5 ml d'eau ultrapure. La suspension virale est centrifugée de nouveau pendant 30 s à 20 000 g dans une centrifugeuse pour tube Eppendorf afin de sédimenter les plus gros débris et les traces de poudre de verre. Le surnageant est récupéré, puis l'extraction des acides nucléiques est réalisée après action de la protéinase K suivant le protocole décrit pour la préparation de l'ARNg viral. Après purification et précipitation à l'éthanol, les acides nucléiques sont repris dans 50 µl de tampon TE, puis des dilutions successives sont réalisées dans ce même tampon. Après dénaturation par chauffage à 95°C pendant 5 min et refroidissement dans la glace, 100 µl de SSC 20 X sont ajoutés dans chaque tube, puis les dépôts sont réalisés sur la membrane de nitrocellulose.

6.3 Dépôt des échantillons sur membrane de nitrocellulose

Les échantillons préparés sont déposés sur une membrane de nitrocellulose suivant deux techniques.

6.3.1 Dépôt manuel en *dot blot*

La membrane est imprégnée de SSC 20 X puis séchée à température ambiante. Les échantillons à déposer sont préparés sous le volume le plus petit possible (2 à 10 µl) puis, après dénaturation, sont déposés à l'aide d'un fin capillaire. La membrane est séchée, les acides nucléiques sont ensuite fixés par chauffage au four à 80°C pendant 2 h.

6.3.2 Dépôt par filtration sur un appareil de *slot blot*

L'appareil PR600 *slot blot* HOEFER utilisé est constitué de trois parties principales :

- un bloc supérieur creusé de 24 cupules de dépôt dont le fond est constitué d'une fente étroite de 6 mm x 0,8 mm.
- un bloc médian creusé de fentes identiques à celles du bloc supérieur et servant de support à la membrane de nitrocellulose.
- un bloc inférieur permettant le recueil des liquides écoulés et relié à une trompe à vide

La dépression provoquée par le vide oblige chaque échantillon à passer au travers d'une fente étroite, les acides nucléiques étant retenus sur la membrane.

Un erlenmeyer intercalé entre l'appareil et la trompe à vide permet de récupérer les liquides contaminés.

La membrane de nitrocellulose imprégnée de SSC 20 X est déposée mouillée dans la dépression du bloc médian prévu à cet effet. L'appareil est assemblé et relié à la trompe à vide. Un vide de 5 à 10 mm en pression de mercure est créé puis coupé le temps des dépôts. Les échantillons, après dénaturation, sont déposés sous un volume de 100 µl dans chaque cupule, puis aspirés rapidement. Dans le cas des ARN purifiés, un temps de contact de 30 s est observé avant aspiration (SHOCKLEY *et al.* - 1987). Le vide est maintenu jusqu'à démoulage de la membrane puis, après séchage à l'air, les acides nucléiques sont fixés par chauffage au four à 80°C pendant 2 h.

6.4 Hybridation

6.4.1 Sonde radioactive

- Préhybridation

Les membranes de nitrocellulose préparées sont placées dans un sac plastique thermosoudable et imprégnées de tampon de préhybridation à raison de 4 ml pour 100 cm² de membrane. Une incubation de 1 à 2 h à 42°C sous agitation lente est nécessaire pour saturer les sites non spécifiques de la membrane.

- Hybridation

Après élimination du tampon de préhybridation, les membranes sont incubées une nuit sous agitation lente à 42°C dans le même tampon que

précédemment auquel est ajouté la quantité requise de sonde radioactive, dénaturée par chauffage 5 min à 95°C (0,5 à 1.10⁶ cpm/cm²).

Lavages

Les membranes sont ensuite lavées, sous agitation, dans des solutions de force ionique décroissante (à raison de 1 ml de solution/cm² de membrane) en faisant varier la température des lavages.

C'est ainsi que, en général, deux lavages successifs de 15 min chacun sont réalisés en tampon A à température ambiante, puis deux autres lavages également de 15 min en tampon B à 52°C. L'efficacité des rinçages est suivie, au compteur, entre chaque étape ; en fin de lavage, une activité de l'ordre de 2 à 5 coups/s est enregistrée (DAVID *et al.* - 1989).

- Exposition et détection du signal radioactif

Après séchage à l'air, les membranes sont placées en autoradiographie à -80°C dans une cassette en présence d'un écran intensificateur. Les films sont révélés après 24 à 72 h d'exposition (annexe 5).

6.4.2 Sonde marquée à la peroxydase

Comme pour le marquage enzymatique de la sonde, le protocole et l'ensemble des réactifs fournis par le Kit "ECL gene detection system" commercialisé par AMERSHAM ont été utilisés.

- Préhybridation

Les membranes de nitrocellulose préparées sont placées dans un sac plastique thermosoudable et imprégnées de tampon d'hybridation pour système ECL à raison de 0,25 ml/cm² de membrane. Ce tampon, fourni avec le Kit, est additionné avant emploi de NaCl jusqu'à une concentration finale de 0,5 M. Une incubation de 10 min à 42°C et sous agitation lente est suffisante.

- Hybridation

Une partie du tampon d'hybridation est prélevée, mélangée à la sonde d'ADN marquée à la peroxydase et réintroduite dans le sac thermosoudable. La concentration finale de la sonde doit être de 20 ng/ml de tampon. L'incubation se poursuit pendant une nuit à 42°C sous agitation.

- Lavages

Les membranes sont lavées deux fois dans du tampon de lavage ECL (2 ml de tampon/cm² de membrane) pendant 20 min à 42°C sous agitation lente, puis deux fois dans un même volume de SSC 2X pendant 5 min à température ambiante. Cette deuxième série de lavages est simplement destinée à éliminer toute trace de réactif avant l'étape de détection.

- Détection du signal

Cette étape se déroule entièrement en chambre noire et à température ambiante.

Les membranes encore humides sont recouvertes d'un mélange à volume égal des réactifs de détection I et II (0,125 ml/cm² de membrane). L'incubation dure exactement 1 min. Après élimination de l'excès de tampon, les membranes sont enveloppées dans une feuille de polyéthylène (Saran-Wrap), puis placées le plus rapidement possible à l'obscurité dans une cassette au contact d'un film radiologique (hyperfilm ECL). Au bout d'un temps d'exposition de 1 min, le film est retiré et développé immédiatement tandis qu'un deuxième film est placé dans la cassette au contact de l'hybride. Des temps d'exposition de 1, 2, 5, 10 min ou plus sont ainsi effectués et analysés. Le temps d'exposition total ne peut excéder 1 h.

VII - PURIFICATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX SPECIFIQUES DU BECV

7.1 Précipitation des ascites au sulfate d'ammonium à 50 % de saturation

L'ascite de souris, diluée de moitié dans de l'eau physiologique, est additionnée d'un égal volume d'une solution saturée de sulfate d'ammonium. Après 30 min d'incubation, la suspension est centrifugée à 10 000 g pendant 15 min. Le culot de centrifugation est repris dans un volume de PBS égal au volume initial de l'ascite, puis dialysé contre ce même tampon pendant 48 h.

7.2 Purification des immunoglobulines sur protéine A-sépharose

Une colonne de protéine A-sépharose CL4B est préparée à partir de 0,5 g de gel dans 15 ml de tampon phosphate de potassium 10 mM (pH 8). Le gel est lavé avec 10 à 15 ml de tampon citrate de sodium/acide citrique 0,1 M (pH 3), puis équilibré dans un tampon phosphate de potassium 0,14 M (pH 8).

La préparation contenant les anticorps, obtenue après précipitation par le sulfate d'ammonium, est équilibrée dans du tampon phosphate de sodium 0,14 M (pH 8), puis 2 ml de cette solution sont déposés sur la colonne de protéine A-sépharose (débit de filtration 0,1 ml/min). La colonne est ensuite lavée avec 50 ml de tampon phosphate de sodium 0,14 M (pH 8) jusqu'à ce que l'absorbance de l'éluat à 280 nm soit inférieure à 0,02.

L'élution des IgG fixées sur la protéine A est réalisée par un gradient de pH discontinu constitué de tampon citrate de sodium/acide citrique 0,1 M de pH décroissant : pH 6, 4,5 et enfin 3,5. L'éluat est recueilli par fractions de 1,5 ml dans des tubes contenant du tampon Tris-HCl 1 M (pH 8,5) afin de le neutraliser rapidement. Le débit de filtration est de 0,5 ml/min.

Pour chaque pH d'élution, les fractions correspondant à un pic d'absorption de la lumière à 280 nm sont rassemblées dans un tube de dialyse, concentrées sous vide ou en présence de PEG 20 000, dialysées contre du PBS à 4°C pendant une nuit, puis conservées à - 20°C.

L'estimation de la concentration en IgG purifiées de la solution est calculée comme suit : $1,5 \text{ UA}_{280 \text{ nm}} = 1 \text{ mg/ml d'IgG}$.

La colonne de protéine A-sépharose est ensuite régénérée par lavage à l'aide de tampon citrate de sodium/acide citrique 0,1 M (pH 3), puis rééquilibrée dans le tampon phosphate de sodium 0,14 M (pH 8) contenant 0,05 % d'azide de sodium.

7.3 Contrôle de la qualité des anticorps monoclonaux purifiés

7.3.1 Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS

La technique utilisée est celle décrite par LAEMMLI (1970) avec un appareil confectionné suivant le modèle de STUDIER (1973).

Le gel, préparé en plaque de 1 mm d'épaisseur, est constitué d'un gel de séparation, de 14 cm de long (acrylamide 12,5 % - bisacrylamide 0,33 % en tampon Tris-HCl 375 mM pH 8,8 - SDS 0,1 %) surmonté d'un gel de concentration, de 1 cm de long (acrylamide 5 % - bisacrylamide 0,13 % en tampon Tris-HCl 125 mM pH 6,8 - SDS 0,1 %). Le gel est coulé en présence de 10 µl de Temed et de 120 µl de persulfate d'ammonium en solution à 10 % qui en assurent la polymérisation en 30 à 45 min à 37°C. Le tampon de migration est un tampon Tris-glycine (pH 8,3) contenant 0,1 % de SDS.

Les échantillons à analyser, de même qu'un mélange de marqueurs de poids moléculaire, sont additionnés d'un égal volume de tampon de dissociation puis dénaturés par chauffage pendant 2 min à 100°C. Du bleu de bromophénol à la concentration de 0,001 % est ajouté à chaque préparation avant dépôt sur le gel.

La migration s'effectue d'abord sous un courant de 12 mA (50V) dans le gel de concentration, puis de 24 mA lorsque l'indicateur coloré de migration

(bleu de bromophénol) atteint le gel de séparation. Après 3 à 4 h (12 cm de migration), le gel est démoulé puis coloré.

La coloration est réalisée par la technique aux sels d'argent décrite par MERRIL *et al.* (1980). Le gel est tout d'abord fixé par un mélange méthanol 50 %-acide acétique 12 % pendant 20 min, puis l'excès de SDS est éliminé par trois lavages successifs de 10 min avec un mélange éthanol 10 %-acide acétique 5 %. Il est ensuite placé pendant 5 min dans une solution d'acide nitrique 3,2 mM-bichromate de potassium 3,4 mM, lavé quatre fois dans de l'eau désionisée puis recouvert d'une solution de nitrate d'argent 12 mM pendant 30 min.

La révélation s'effectue en plaçant le gel dans une solution de carbonate de sodium 0,28 M contenant 0,5 ml/l de formaldéhyde. Quand l'intensité de la coloration souhaitée est atteinte, le développement est arrêté par immersion du gel dans une solution d'acide acétique à 1 %. Après lavage à l'eau désionisée et séchage sous vide, l'électrophorogramme peut être photographié.

7.3.2 Caractérisation des immunoglobulines purifiées par la technique d'Ouchterlony

Un gel d'indubiose à 2 % préparé en tampon véronal est coulé sur une plaque de verre. Après solidification de l'agarose pendant une nuit à 4°C, une série de puits sont confectionnés à l'emporte-pièce.

Le dépôt des échantillons à tester est effectué dans les puits disposés à la périphérie à raison de 10 µl par échantillon. Le sérum anti-IgG de souris est déposé dans le puits central. La diffusion est réalisée en chambre humide pendant 24 à 48 h à température ambiante.

Après précipitation, les plaques sont lavées pendant 1 à 2 jours dans de l'eau physiologique puis recouvertes de papier-filtre et séchées complètement à l'étuve à 37°C pendant une nuit. Elles sont ensuite colorées pendant 30 à 60 min au bleu de Coomassie à 2 ‰ en solution aqueuse contenant 10 % d'acide acétique glacial et 40 % de méthanol, puis lavées à l'acide acétique à 10 % jusqu'à décoloration complète du fond de la préparation.

Les plaques sont alors observées afin de déceler la présence éventuelle d'arcs de précipitation.

7.3.3 Titrage des anticorps

7.3.3.1 Technique d'immunofluorescence indirecte

Des plaques de 96 cupules à fond plat, présentant un tapis continu de cellules HRT 18, sont inoculées avec du BECV souche G 110 purifié, à raison de 100 UFP par cupule. Après une incubation de 48 h à 37°C, en atmosphère enrichie en CO₂, les cellules sont fixées par un mélange éthanol 75 %-acétone 25 %. Les plaques ainsi préparées peuvent être conservées à - 20°C.

Des dilutions appropriées de chaque solution à titrer sont réalisées dans du tampon PBS (pH 7,2) contenant 0,05 % de Tween 20 sous un volume de 100 µl, puis distribuées dans les cupules. Après incubation 1 h à 37°C, les cellules sont lavées trois fois avec du tampon PBS-Tween 20 0,05 %. Un conjugué fluorescent dilué au 1/100 (sérum de mouton anti-IgG de souris marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine) est réparti dans chaque cupule sous un volume de 100 µl. Après contact 1 h à 37°C, suivi de trois lavages successifs avec du tampon PBS-Tween 20 0,05 %, les tapis cellulaires sont observés en microscopie à fluorescence.

Le titre des solutions analysées est exprimé par l'inverse de la dernière dilution permettant d'obtenir une fluorescence intracytoplasmique.

7.3.3.2 Technique ELISA

Des plaques de 96 cupules à fond plat sont sensibilisées par dépôt dans chaque cupule de 0,5 µg de BECV souche G 110 purifié, en suspension dans 100 µl de tampon PIPES 50 mM-NaCl 150 mM (pH 6,4). Après une nuit d'incubation à 37°C, les plaques sont lavées 4 fois dans du tampon PBS-Tween 20 0,05 %, puis saturées avec une solution de gélatine à 1 % dans du tampon Tris 50 mM-NaCl 150 mM (pH 7), à raison de 100 µl par cupule. Après 1 h d'incubation, les plaques sont de nouveau lavées 4 fois avec du tampon PBS-Tween 20 0,05 %.

Des dilutions appropriées de chaque solution à titrer sont réalisées dans du tampon PBS-Tween 20 0,05 % sous un volume de 100 µl, puis distribuées dans les cupules. Après incubation 75 min à 37°C, suivie de 4 lavages en tampon PBS-Tween 20 0,05 %, 100 µl de conjugué marqué à la peroxydase et dilué au 1/1000 (sérum de mouton anti-IgG de souris) sont répartis dans chaque cupule. Les plaques sont placées 75 min à 37°C puis lavées 3 fois avec

du tampon PBS-Tween 20 0,05 % et 1 fois avec du tampon citrate-phosphate 0,1 M (pH 5).

Le substrat de l'enzyme (100 μ l d'une solution d'orthophénylène diamine préparée extemporanément) est ensuite ajouté. Après 12 min d'incubation, la réaction colorée est arrêtée par addition de 50 μ l d'une solution d'acide sulfurique à 20 %.

La lecture est réalisée par mesure de l'absorbance à 510 nm. Le titre des solutions est exprimé par l'inverse de la plus forte dilution présentant encore une absorbance égale à 0,2.

VIII - CONCENTRATION DES CORONAVIRUS PRESENTS DANS LE MILIEU HYDRIQUE

8.1 Concentration par immunoaffinité

8.1.1 Préparation de l'immunoadsorbant

La préparation est réalisée dans un dispositif filtrant permettant d'effectuer l'ensemble des opérations dans le même récipient sans avoir à transvaser.

L'immobilisation des anticorps spécifiques sur le support préactivé au glutaraldéhyde (ACT-Magnogel-AcA 44) se déroule en 4 étapes successives :

- Un volume de 10 ml d'ACT-Magnogel-AcA 44 est introduit sur le filtre, lavé avec 5 à 10 volumes d'eau déminéralisée afin d'éliminer toute trace de glutaraldéhyde libre, puis équilibré dans 2 à 3 volumes de tampon de couplage (tampon phosphate 0,1 M pH 7,6) ne contenant aucun groupement NH_2 .

- Le gel est ensuite mis en suspension dans un égal volume de ce même tampon contenant 5 mg/ml d'anticorps spécifiques, puis placé sous agitation rotative lente, une nuit à température ambiante.

- Après fixation des IgG, la solution est éliminée par filtration sous pression. Le filtrat est recueilli et l'absorbance à 280 nm mesurée afin de déterminer la quantité d'immunoglobulines non fixées. L'immunoadsorbant est lavé avec 8 à 10 volumes de tampon de couplage et mis en suspension dans un égal volume d'éthanolamine 0,1 M tamponnée pH 8 afin de bloquer les groupements réactionnels restant éventuellement disponibles. Après agitation douce pendant 1 à 2 h à température ambiante, la solution est éliminée par filtration sous pression et l'immunoadsorbant est de nouveau lavé avec 8 à 10 volumes de tampon phosphate 0,1 M (pH 7,6).

- Avant utilisation, l'immunoabsorbant est testé par un tampon de dissociation des liaisons Ag-Ac afin de contrôler l'état de fixation des immunoglobulines sur la matrice. Le gel est traité par 2 volumes de tampon HCl-glycine 0,2 M (pH 2,2) pendant 15 min à 4°C sous agitation rotative. L'absorbance à 280 nm du filtrat est contrôlée afin de s'assurer que les immunoglobulines ne sont pas éluées. Après neutralisation avec une solution de KH_2PO_4 1 M, le gel est lavé avec 2 à 3 volumes de PBS (pH 7,4). L'immunoabsorbant est prêt à l'emploi. Il peut être conservé à 4°C en suspension dans du PBS en présence de 0,02 % d'azide de sodium. Entre chaque utilisation, le gel est régénéré par lavage avec du tampon HCl-glycine 0,2 M (pH 2,2) jusqu'à ce que l'absorbance à 280 nm soit voisine de 0, neutralisé, puis conservé à 4°C en PBS comme indiqué précédemment.

8.1.2 Concentration des virus sur immunoabsorbant

8.1.2.1 Phase d'adsorption

Les expérimentations ont été réalisées en mettant en suspension 3 ml d'immunoabsorbant dans 20 ml de PBS contaminé expérimentalement par du BECV. Après 1 h de contact sous agitation rotative à température ambiante, le gel est immobilisé au fond du tube à l'aide d'un aimant afin de recueillir le surnageant, puis lavé 3 à 4 fois avec un égal volume de PBS. Le surnageant et les eaux de lavage sont rassemblés, additionnés du 1/10 de leur volume de milieu RPMI 10 X contenant des antibiotiques, puis titré par la technique des plages en même temps qu'une fraction aliquote de la suspension virale de départ.

8.1.2.2 Phase d'éluotion

- Elution par l'eau distillée : après la phase d'adsorption, le gel est lavé 2 fois avec un égal volume d'EBDS puis laissé au repos pendant un temps variable suivant les essais. L'éluotion est enfin réalisée dans 2 volumes d'EBDS sous agitation rotative lente à température ambiante. Le gel est ensuite immobilisé par un aimant au fond du tube, l'éluat est recueilli puis additionné de 1/10 de son volume de milieu RPMI 10 X contenant des antibiotiques. Une fraction aliquote est titrée par la technique des plages afin de déterminer le nombre des virus élués. Le reste de l'éluat est soumis à une ultracentrifugation à 100 000 g pendant 60 min à 4°C afin de sédimenter les

particules virales. Le culot de centrifugation contenant les particules virales est observé en microscopie électronique (annexe 6).

- Elution en tampon glycine pH acide : après la phase d'adsorption et lavage dans du PBS, le gel est remis en suspension dans 2 volumes de tampon HCl-glycine 0,2 M (pH 2,8), puis soumis à une agitation rotative douce à 4°C pendant 10 min. Après recueil de l'éluat, le gel est à nouveau mis en suspension dans 2 volumes d'HCl-glycine 0,2 M (pH 2,2) sous agitation pendant 10 min. Les deux éluats recueillis sont immédiatement neutralisés avec une solution de K_2HPO_4 1 M et mélangés. Une fraction aliquote est utilisée pour un titrage par la technique des plages, la fraction restante étant, comme précédemment, observée en microscopie électronique après concentration.

8.2 Concentration par adsorption-élution sur poudre de verre

8.2.1. Détermination des conditions optimales d'adsorption-élution

L'adsorption du BECV sur la poudre de verre est réalisée selon les conditions opératoires suivantes :

- eau bidistillée stérile (EBDS) : 10 ml
- BECV marqué au ^{14}C et purifié : 50 μ l
- poudre de verre : 1 ou 5 g (suivant les expérimentations)
- $AlCl_3$ 0,5 M : 10 μ l (présent dans certaines expérimentations)

Les tubes sont agités doucement pendant 5 min par un mouvement de bascule afin de maintenir la poudre de verre en suspension dans l'eau, puis laissés à sédimenter pendant 10 min. Le surnageant est prélevé et la radioactivité correspondant à la quantité de BECV non fixée sur la poudre de verre est mesurée. Connaissant la radioactivité introduite dans chaque tube, on obtient par différence la quantité de radioactivité localisée au niveau de la poudre de verre et, par conséquent, le pourcentage de matériel viral adsorbé.

L'élution du BECV de la poudre de verre est ensuite réalisée avec l'une des deux solutions éluantes suivantes :

- solution de glycine 0,05 M pH 3 à 11
- solution d'extrait de boeuf 3 % pH 3 à 9

Chaque tube contenant le virus adsorbé sur la poudre de verre reçoit 4 ml de la solution éluante à un pH donné, puis est soumis à une agitation douce

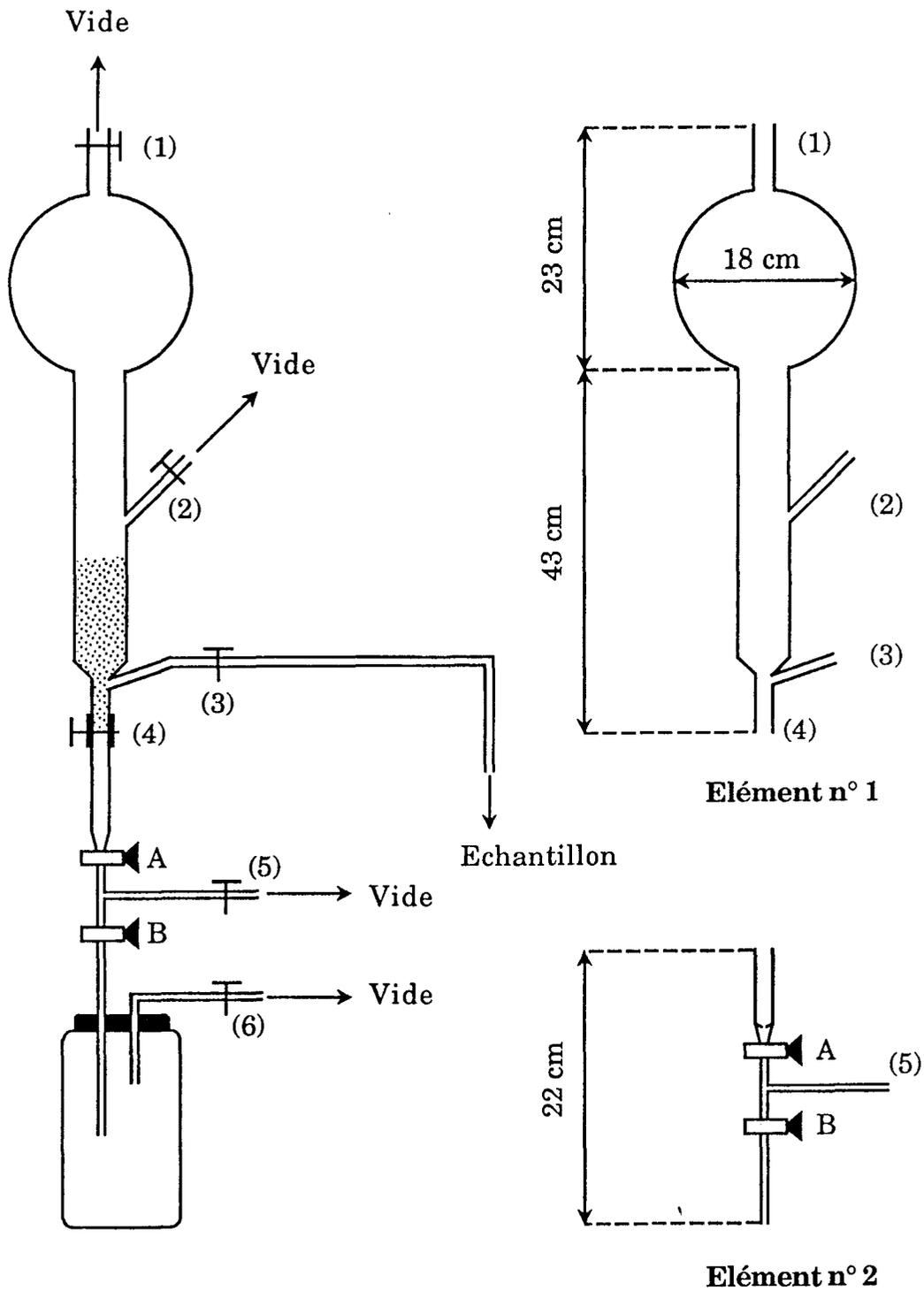


Fig. n° 9 : Schéma de l'appareil de filtration sur poudre de verre.
(d'après SCHWARTZBROD et LUCENA-GUTIERREZ - 1978)

pendant 5 min pour faciliter l'élution. Après décantation de la poudre de verre, la radioactivité de chaque éluant est déterminée. Pour chacune des solutions éluantes sont ensuite calculés :

- le pourcentage de virus élués par rapport au nombre de virus fixés sur la poudre de verre définissant ainsi le rendement d'élution.
- le pourcentage de virus élués par rapport au nombre de virus introduits au début de l'expérimentation définissant ainsi le rendement global d'adsorption-élution.

8.2.2 Concentration des coronavirus présents dans un grand volume d'eau

L'appareil utilisé dans ce but est celui décrit par SCHWARTZBROD et LUCENA-GUTIERREZ (1978) et présenté sur la fig. n° 9.

Il est constitué de deux éléments :

- l'élément n° 1 formé par une colonne en verre pyrex prolongée à sa partie supérieure par une chambre d'expansion munie d'une tubulure d'évacuation (1) et de deux tubulures latérales (2 et 3).
- l'élément n° 2 composé d'une tubulure en verre pyrex comprenant à sa partie supérieure un rétrécissement destiné à supporter un tampon de coton, 2 robinets (A et B) et une tubulure latérale (5).

Les éléments n° 1 et 2 sont réunis par l'intermédiaire d'un joint caoutchouté souple (4). L'élément n° 2 est relié à un flacon de 125 ml muni d'un bouchon percé à deux entrées. Toutes les tubulures sont équipées de tuyaux en caoutchouc bouchés à leur extrémité par du coton cardé, puis 150 g de poudre de verre sont introduits dans l'élément n° 1 et l'ensemble est stérilisé à 120°C pendant 20 min.

L'échantillon d'eau à analyser est amené à pH 3,3 et additionné de chlorure d'aluminium ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,5 M) de façon à obtenir une concentration finale en ions Al^{+++} de $5 \cdot 10^{-4}$ M.

L'appareil est alors connecté d'une part, au réservoir d'eau à analyser par l'intermédiaire de la tubulure (3) et d'autre part à une source de vide par l'intermédiaire des tubulures (1) (2) (5) et (6). Ces dernières sont fermées à l'aide de pinces de Mohr.

Les tubulures (1) puis (3) sont ouvertes, l'eau est aspirée dans l'appareil entraînant la poudre de verre qui se met rapidement en suspension pour former un filtre dynamique s'étendant sur toute la hauteur de la colonne et jusqu'au tiers inférieur de la chambre d'expansion. Le débit de filtration est de 60 l/h.

Quand tout l'échantillon d'eau à analyser a ainsi filtré au travers de la poudre de verre, la tubulure (3) est fermée rapidement en évitant l'aspiration d'air et la tubulure (1) est mise en communication avec l'atmosphère. La poudre de verre décante dans le bas de l'élément n° 1.

La tubulure (2) est ouverte. La plus grande partie de l'eau subsistant dans la colonne et la chambre d'expansion est alors éliminée, aspirée par le vide. Le reste de l'eau s'écoule par la tubulure (5), le robinet (A) ainsi que les pinces (4) et (5) étant ouverts.

L'éluion des virus adsorbés sur la poudre de verre peut être réalisée suivant deux protocoles :

- 100 ml de liquide d'éluion sont introduits par la tubulure (1). Lorsque le front de l'éluant arrive à la partie inférieure de la colonne, la tubulure (5) est fermée et le robinet (B) ouvert de façon à recueillir le liquide d'éluion dans le flacon de récupération qui est alors connecté au vide par la tubulure (6). Le liquide d'éluion ainsi recueilli est immédiatement neutralisé.

- l'ensemble des tubulures situées sous la pince (4) est retiré et remplacé par un simple flacon à large col. Cent ml de liquide d'éluion sont introduits par la tubulure (1). La pince (4) est ouverte permettant le recueil de la totalité de la poudre de verre et de l'éluant. L'ensemble est soumis à une agitation magnétique lente pendant 5 min puis filtré sur büchner afin d'extraire le liquide d'éluion qui est immédiatement neutralisé. Après ultracentrifugation à 100 000g pendant 90 min (rotor 45 Ti), le culot de centrifugation, contenant les virus, est homogénéisé dans 5 ml de milieu RPMI à 2 % de SVF.

Dans tous les cas, l'éluat est décontaminé par addition d'une solution antibiotique et antifongique à raison de 0,1 ml/ml, puis incubé à 37°C pendant 3 h avant d'être soumis à une analyse virologique.

RESULTATS - DISCUSSIONS

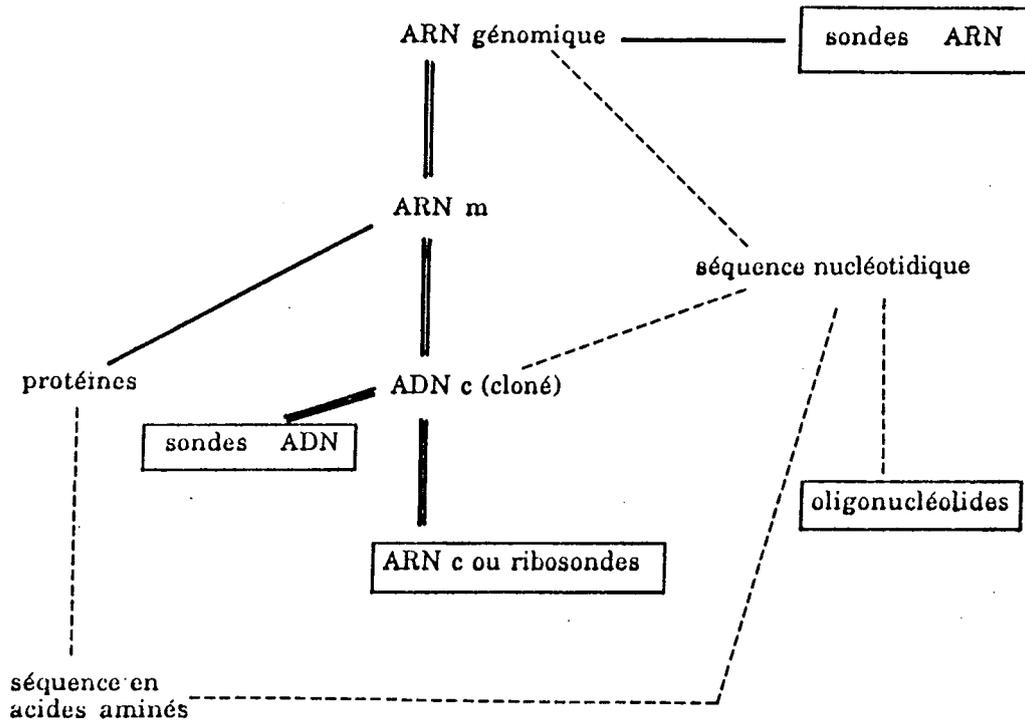


Fig. n° 10 : Production de sondes à partir d'un ARN.
(d'après MIFFLIN - 1989)

- ==== Voie principale de production de sondes.
- Voie mineure de production de sondes.
- Détermination de banques de séquences peptidiques et nucléotidiques permettant la synthèse d'oligonucléotides.

DEVELOPPEMENT DE SONDAS MOLECULAIRES POUR LA DETECTION DU CORONAVIRUS ENTERIQUE BOVIN

Ce travail est consacré au développement de sondes d'ADNc permettant la détection du BECV par hybridation moléculaire.

La préparation de sondes à partir de l'ARNg peut être envisagée selon différentes voies schématisées sur la fig. n° 10 (LANDRY et FONG - 1986 ; MIFFLIN - 1989).

Parmi elles, les techniques récemment proposées sont la synthèse d'oligonucléotides et la préparation de ribosondes (BAILY *et al.* - 1983 ; MELTON *et al.* - 1984 ; ALBRETSON *et al.* - 1988). Leur obtention suppose toutefois le clonage préalable de l'ARNg et une connaissance, même partielle, de sa séquence nucléotidique. Par ailleurs, les sondes ARN sont très sensibles à l'action des RNases et leur emploi impose des précautions particulières rendant leur utilisation délicate (annexe 1).

Au moment où nous avons commencé ce travail, aucune information sur la séquence nucléotidique de l'ARNg du BECV n'avait été publiée. La voie la plus simple par conséquent était d'envisager le clonage de cet ARNg. La constitution d'une banque d'ADNc cloné dans *Escherichia coli* devait permettre la production de sondes capables de détecter les ARN viraux du BECV présents dans divers échantillons.

I - CLONAGE DE L'ARN GENOMIQUE

L'ARN matriciel, étant polyadénylé à son extrémité 3', le procédé le plus fréquemment utilisé dans ce cas, pour son clonage, consiste à amorcer la synthèse d'ADNc par une courte chaîne d'oligo dT à partir de laquelle s'effectue la transcription (BOURSNELL *et al.* - 1984 ; KAPKE et BRIAN - 1986 ; LAPPS *et al.* - 1987).

Cependant, le clonage d'un ARN de grande taille pose un certain nombre de problèmes : une dégradation partielle de l'ARN peut empêcher l'initiation (extrémité poly A trop courte) ou bloquer l'élongation de la synthèse (ARN coupé ou dégradé en 5'). Cette élongation peut également s'arrêter

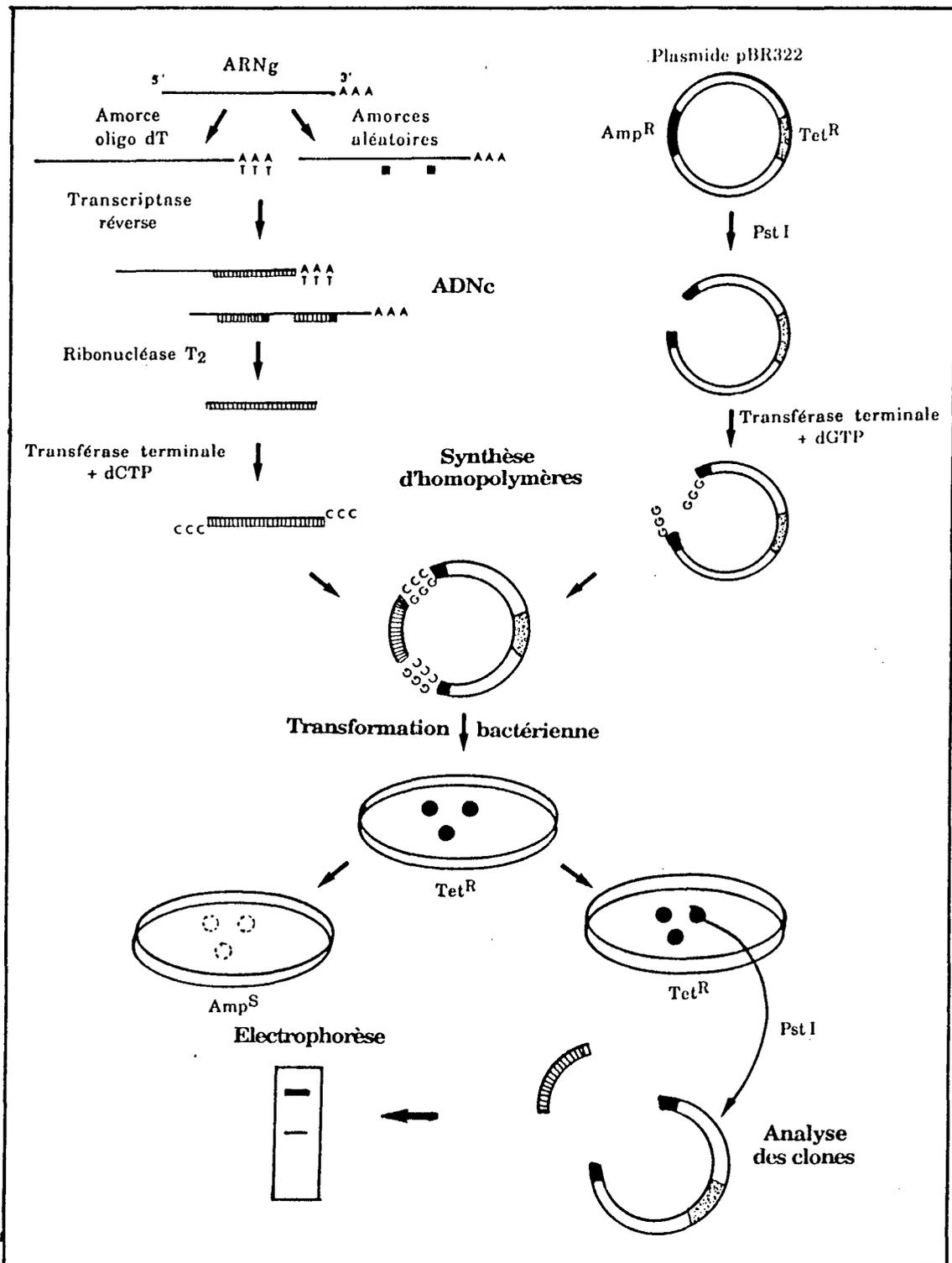


Fig. n° 11 : Stratégie de clonage de l'ARNg.

spontanément ou être interrompue par la présence de structures secondaires entraînant des zones d'arrêt de transcription.

Pour pallier à ces inconvénients, il est possible d'employer d'autres amorces : il s'agit, soit d'oligonucléotides de synthèse reproduisant une séquence nucléotidique connue du génome, soit d'un mélange d'oligonucléotides assurant l'initiation de la transcription au hasard, tout le long de l'ARN matriciel.

Le clonage, puis le séquençage, de la totalité de l'ARNg du virus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV) a pu être réalisé en utilisant ces trois procédés (BINNS *et al.* - 1985b ; BOURSNEILL *et al.* - 1984-1987).

En conséquence, afin de constituer une banque de clones la plus complète possible, nous avons testé deux types d'amorces :

- une amorce oligo dT (12-18), d'une part
- un mélange d'amorces aléatoires préparées par digestion de l'ADN de thymus de veau, d'autre part.

La constitution de la banque d'ADNc s'est déroulée en cinq étapes successives (fig. n° 11).

1.1 Préparation de l'ARNg matriciel

L'extraction de l'ARNg a été réalisée à partir de BECV cultivé et purifié suivant le protocole décrit dans "Matériel et Méthodes" (SPAAN *et al.* - 1981).

La technique utilise l'action conjointe de la protéinase K et du SDS. Le SDS contribue à amplifier l'action protéolytique de l'enzyme (HILZ *et al.* - 1975) et assure une protection contre l'action de ribonucléases.

A partir d'une suspension de 1 mg de virus purifié, titrant $1,5 \cdot 10^9$ UFP/ml, nous avons obtenu, suivant les préparations, 40 à 50 µg d'ARNg. La détermination d'un rapport A_{260}/A_{280} (annexe 4) voisin de 2 nous a permis de constater que l'ARNg extrait était suffisamment pur pour servir de matrice à la synthèse de l'ADNc.

1.2 Synthèse de l'ADNc

La synthèse de l'ADNc est catalysée par la transcriptase réverse (ADN polymérase ARN dépendante extraite du virus myéloblastique aviaire) à partir de l'ARNg, d'une amorce complémentaire (oligo dT ou amorces aléatoires) et de triphosphonucléotides précurseurs (RETZEL *et al.* - 1980).

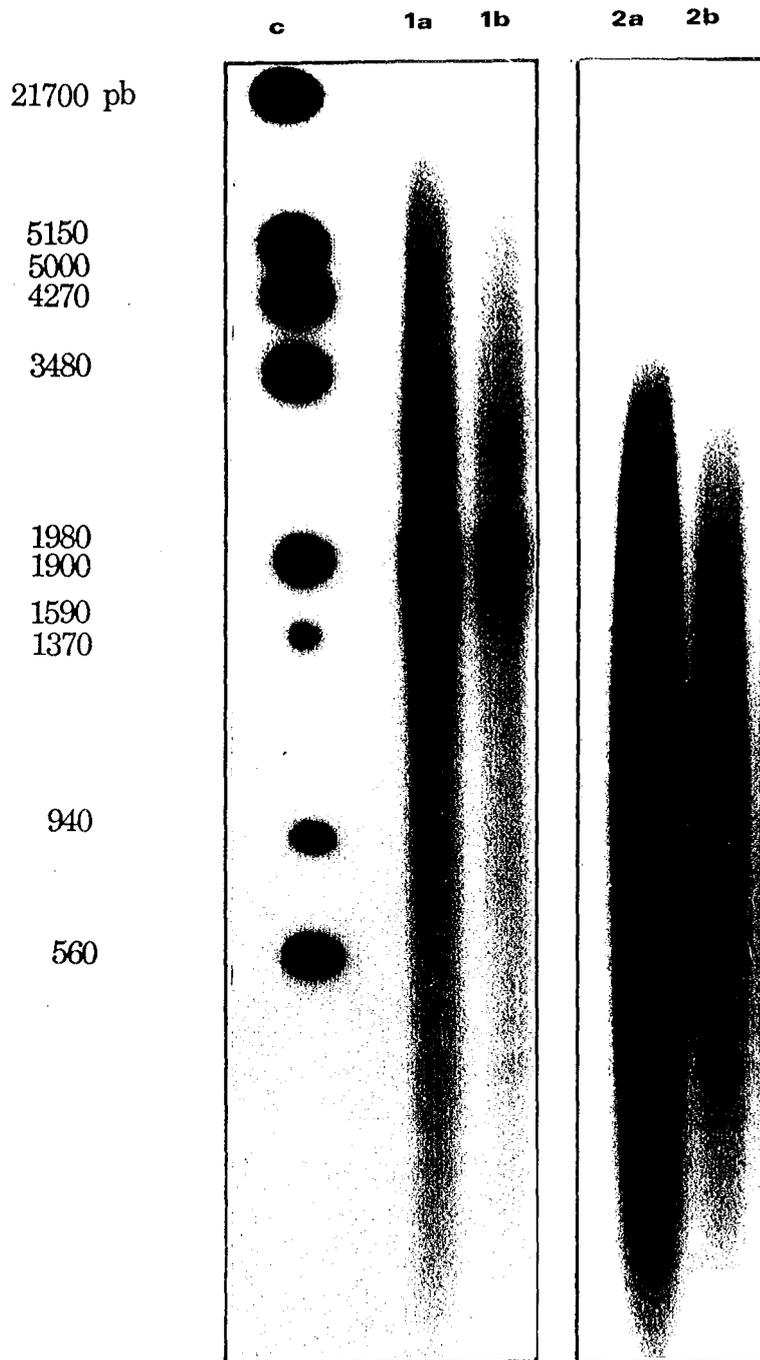


Fig. n° 12 : Analyse des brins d'ADNc synthétisés par électrophorèse en gel d'agarose alcalin.

- 1 - ADNc obtenu à partir d'une amorce oligo dT
- 2 - ADNc obtenu à partir d'amorces aléatoires

- a - Taille de l'ADNc avant action de la RNase T₂
- b - Taille de l'ADNc après action de la RNase T₂

- c - Marqueurs de masse moléculaire (ADN du phage λ coupé par EcoRI et Hind III)

Le protocole suivi est décrit dans "Matériel et Méthodes". La RNasine a été ajoutée au milieu réactionnel afin d'inhiber l'activité ribonucléasique de type RNase H associée à la transcriptase réverse qui dégrade l'ARN des hybrides ARN-ADNc par une attaque exonucléasique.

Nous nous sommes limités à la synthèse du premier brin d'ADNc et à l'obtention d'un hétéroduplex ARN-ADNc comme cela a été décrit pour le clonage de l'ARNg du virus de la gastroentérite transmissible du porcelet (TGEV) (LAUDE *et al.* - 1987 ; RASSCHAERT et LAUDE - 1987) sans chercher, suivant la technique classique, à synthétiser le deuxième brin d'ADNc (EFSTRATIADIS et VILLA-KOMAROFF - 1979 ; GUBLER et HOFFMAN - 1983 ; FORDE - 1983a ; WATSON et JACKSON - 1985).

Les amorces aléatoires ont été préparées par digestion de l'ADN de thymus de veau par la DNase I pancréatique et fractionnement sur résine échangeuse d'ions en augmentant la force ionique du tampon d'élution (MANIATIS *et al.* - 1982).

A partir de 1 g d'ADN, nous avons obtenu environ 60 mg d'amorces aléatoires. Bien que le rendement de la technique soit faible (6 %), ceci est suffisant pour réaliser un grand nombre de synthèses. Nous avons constaté par électrophorèse sur gel d'agarose, en présence de marqueurs de masse moléculaire, que la population d'oligonucléotides obtenue était de taille homogène et inférieure à 70 pb (taille du plus petit marqueur).

Des essais préliminaires, réalisés au laboratoire, ont montré que 2 µg d'ARNg suffisaient pour une réaction de synthèse (SAVOYSKY - 1989). Les résultats obtenus avec les deux amorces sont présentés sur la fig. n° 12 et le tableau V.

L'analyse des ADNc en gel d'agarose alcalin, après autoradiographie, révèle une grande hétérogénéité de la taille des molécules synthétisées. La grande majorité des transcrits sont incomplets.

Dans le cas d'amorces oligo dT, le taux d'incorporation des dCTP³²P est relativement faible, ce qui se traduit par un rendement de synthèse de 16 %. Sur l'ensemble des expériences réalisées, dans le meilleur des cas, nous n'avons jamais dépassé un rendement de 30 % (rendement moyen 15 à 20 %). La taille des ADNc synthétisés varie de 0,5 à 10 kb.

Dans le cas des amorces aléatoires, le taux d'incorporation des dCTP³²P, très élevé, permet d'atteindre un rendement de synthèse de 70 %. L'intensité

Tableau V : Rendement de synthèse de l'ADNc en fonction du type d'amorce utilisé.

	ADNc synthétisé à partir d'une amorce oligo dT	ADNc synthétisé à partir d'amorces aléatoires
Quantité d'ARNg utilisée	2 µg	2 µg
Radioactivité introduite (dCTP ³² P, 3 000 Ci/m mole-10 mCi)	16 210 700 cpm	17 500 000 cpm
Radioactivité incorporée	151 000 cpm	724 250 cpm
Quantité d'ADNc synthétisé	0,326 µg	1,4 µg
Rendement de synthèse du premier brin	16,3 %	70 %
Quantité d'hétéroduplex ARN-ADNc obtenue	0,652 µg	2,8 µg
Radioactivité détectée après action de la RNaseT ₂ et de la "spun column" : - totale - TCA précipitables	200 400 cpm 86 000 cpm	533 160 cpm 425 520 cpm
Rendement après action de la RNaseT ₂ et passage sur "spun column"	56 %	58 %
Quantité d'ARN-ADNc récupérée	0,365 µg	1,6 µg
Rendement global de synthèse de l'ARN-ADNc	18 %	80 %

de la bande observée en autoradiographie confirme ce résultat. Cependant, les brins d'ADNc synthétisés sont moins longs que ceux obtenus avec une amorce oligo dT, leur taille variant entre 0,2 et 3 kb.

Par ailleurs, les amorces aléatoires peuvent, dans une certaine mesure, servir de matrice à la synthèse d'ADNc. Afin d'estimer l'importance de ce bruit de fond, nous avons réalisé une réaction de synthèse témoin en absence d'ARNg matriciel. Le rendement de synthèse comparé, par rapport à la même expérience réalisée en présence de matrice, est de 0,6 %. Ce taux, qui selon MANIATIS *et al.* - 1982 doit être inférieur à 1 %, est acceptable.

Après synthèse de l'ADNc, les fragments d'ARN monobrin qui subsistent sur la matrice ont été coupés par l'action de la ribonucléase T₂ puis éliminés, ainsi que les nucléotides précurseurs non incorporés, par filtration sur "spun column". Une électrophorèse de contrôle réalisée après ce traitement n'a révélé aucune modification sensible de la taille des ADNc synthétisés. Un peu moins de la moitié de la radioactivité incorporée au cours de l'étape de synthèse est ainsi éliminée au cours de l'opération de purification.

1.3 Insertion de l'hétéroduplex dans un vecteur de clonage

La construction des plasmides recombinés a été réalisée par appariement de chaînes homopolymériques (ROYCHOUDBURY *et al.* - 1976).

Le vecteur de clonage employé est le plasmide pBR322 linéarisé par ouverture du site Pst I et dont les extrémités 3' ainsi générées sont complétées par des chaînes de 15 à 20 résidus dG (pBR322-dG). Ceci présente l'avantage de restaurer le site Pst I et ainsi permettre, par la suite, d'exciser facilement le fragment inséré.

En parallèle, les molécules d'ARN-ADNc linéaires ont été allongées par des chaînes d'oligo dC complémentaires. Cette réaction est catalysée par la désoxynucléotidyl transférase terminale, en présence de cobalt et de désoxynucléotides triphosphates précurseurs. Le protocole suivi est décrit dans "Matériel et Méthodes".

Après plusieurs essais, nous avons estimé à 10 min le temps nécessaire à l'addition de 20 à 40 résidus dC aux extrémités 3' de l'hétéroduplex.

Tableau VI : Sélection des clones recombinants à l'aide de marqueurs de résistance aux antibiotiques.

	clones préparés à partir d'une amorce oligo dT	clones préparés à partir des amorces aléatoires
nombre de clones Tet ^R	233	299
nombre de clones Tet ^R - Amp ^S	178	205
Taille des inserts	0,3 < T ≤ 2,2 kb	≤ 0,3 kb

Exemple de calcul du nombre de résidus dC ajoutés :

- Taille moyenne de l'ARN-ADNc	2 kb
- Mr moyenne de l'ARN-ADNc	1400 ng/picomoles
- Quantité de dCTP ³ H introduite	380 picomoles
- Quantité de dCTP froid introduite	240 picomoles
- Radioactivité introduite (dCTP ³ H, 30 Ci/mme)	217 610 cpm
- Radioactivité incorporée	1 694 cpm
- Extrémités 3'	0,14 picomole
- Nombre de dC additionnés	34 résidus

Ce nombre de résidus est estimé suffisant pour un appariement avec le vecteur pBR322-dG, la ligation s'effectuant selon le protocole décrit dans "Matériel et Méthodes".

1.4 Clonage des plasmides recombinés dans la souche *E. coli* RR1

Les plasmides recombinés ont été utilisés pour transformer la souche *E. coli* RR1 rendue compétente (Matériel et Méthodes).

La compétence n'est pas un état naturel chez *E. coli*. Elle peut s'acquérir par un traitement au chlorure de calcium (MANDEL et HIGA - 1970 ; COHEN *et al.* - 1972). L'efficacité du traitement a été contrôlée par un témoin de compétence réalisé avec un pBR322 circulaire. Le taux de transformation est environ de 2.10^6 CFU/ μ g de pBR322. L'efficacité de la transformation est cependant beaucoup plus faible avec les plasmides recombinés, de l'ordre de 10^2 CFU/ μ g de plasmide.

Grâce aux marqueurs de sélection portés par pBR322, les bactéries ayant incorporé un plasmide ont été sélectionnées en présence de tétracycline. Ces clones Tet^R ont ensuite été testés pour leur résistance simultanée à la tétracycline et à l'ampicilline. Les clones recombinants (Tet^R -Amp^S) ont été retenus. En effet, une insertion dans le site Pst I entraîne une inactivation du gène de la bêta-lactamase qui confère la résistance à l'ampicilline. Les clones non recombinants (Tet^R - Amp^R) sont dus à la transformation par des plasmides non coupés ou linéarisés.

Les résultats obtenus avant et après sélection sont présentés dans le tableau VI. Après sélection, 205 clones préparés à partir des amorces aléatoires et 178 clones préparés à partir d'une amorce oligo dT ont été retenus et analysés.

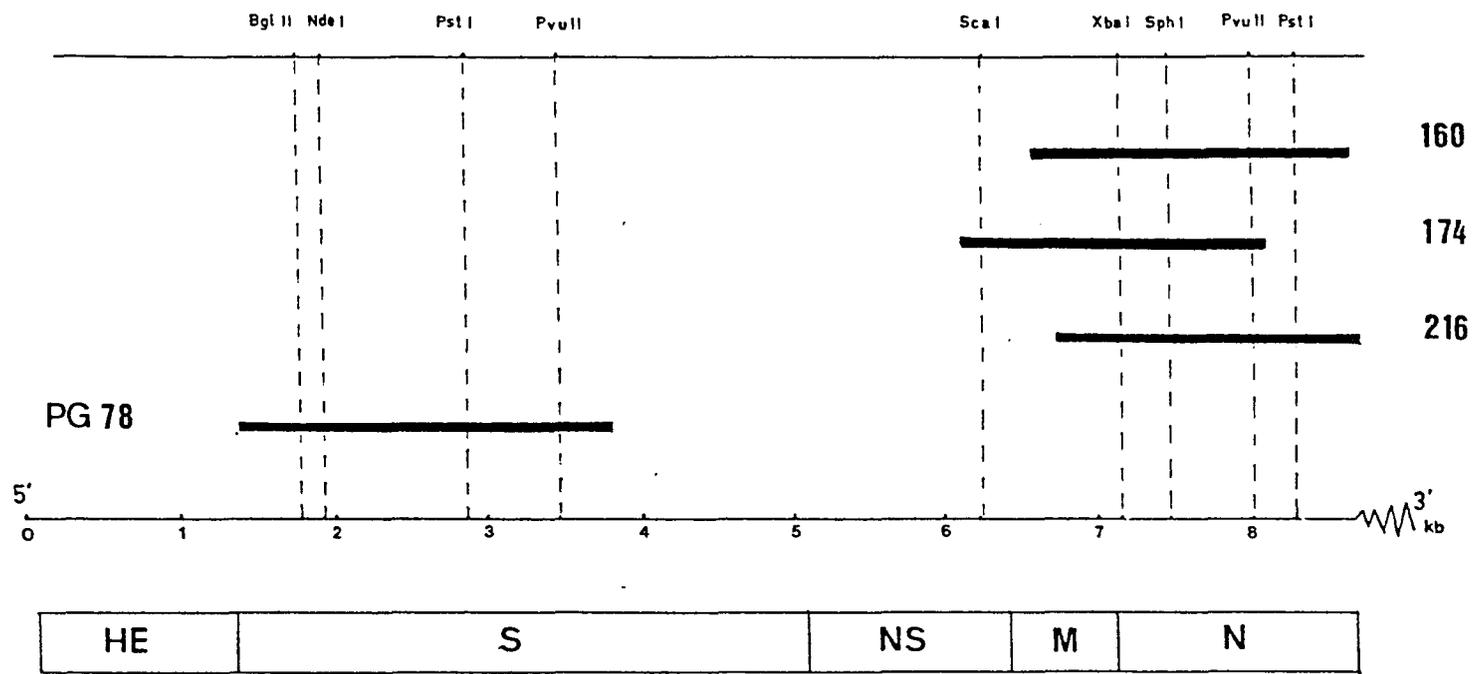


Fig. n° 13 : Carte de restriction sommaire des clones sélectionnés sur le génome.
 (HE : hémagglutinine - estérase ; M : matrice ; N : nucléocapside ; NS : protéines non structurales ; S : péplomère)

1.5 - Analyse des clones recombinants

Une étude a été entreprise afin de déterminer la taille des fragments d'ARN-ADNc clonés.

Les plasmides recombinés ont été amplifiés et purifiés par la technique des minipréparations qui permet d'obtenir rapidement un ADN plasmidique suffisamment pur ($A_{260}/A_{280} = 2$) pour effectuer une digestion par des enzymes de restriction.

Les inserts ont été excisés des plasmides recombinés par action de l'enzyme de restriction Pst I (site de clonage de l'hétéroduplex dans le pBR322) et analysés par électrophorèse sur gel d'agarose en présence de BEt. Leur taille a été déterminée par comparaison à celle du pBR322 et de marqueurs de masse moléculaire.

Les inserts issus des clones Tet^R - Amp^S préparés à partir des amorces aléatoires sont tous de très petite taille, inférieure à 0,3 kb. Un bon nombre d'entre eux sont trop petits pour pouvoir être détectés sur le gel.

Les inserts issus des clones Tet^R - Amp^S préparés à partir d'une amorce oligo dT sont de taille variable :

- 27 sont de très petite taille, inférieure à 0,3 kb
- 123 ont une taille comprise entre 0,3 et 1 kb
- 24 ont une taille comprise entre 1 et 2,2 kb. De plus, 6 d'entre eux présentent un site interne Pst I

A la suite de cette étape de sélection, il apparaît donc que les clones Tet^R - Amp^S, obtenus avec les amorces oligo dT, sont exploitables. Ainsi, les 24 clones de taille comprise entre 1 et 2,2 kb devraient permettre la préparation de sondes de sensibilité satisfaisante.

II - DETECTION DU CORONAVIRUS ENTERIQUE BOVIN PAR HYBRIDATION MOLECULAIRE AVEC UNE SONDE D'ADNc

Les 24 clones sélectionnés ont été étudiés dans notre laboratoire dans le cadre d'un travail de recherche consacré à l'étude du génome du BECV. Parmi eux, les clones 160, 174 et 216 (fig. n° 13) ont été retenus en raison de leur taille et de leur position sur le génome, puis sous-clonés dans le phage M13 et séquencés par la méthode de SANGER. Ces travaux ont permis la

détermination des séquences nucléotidique et protéique de la glycoprotéine de la matrice M, ainsi que l'étude de sa structure (SAVOYSKY *et al.* - 1990).

Ces clones, de séquence nucléotidique connue, et dont la taille est comprise entre 1,8 et 2 kb, conviennent parfaitement pour la préparation de sondes. Ils sont constitués des gènes codant pour la nucléocapside N et la protéine de matrice M. Ces deux protéines dont l'une, la nucléocapside est interne, et l'autre, la protéine M est dans sa majeure partie intramembranaire, ont été particulièrement bien conservées au cours de l'évolution. Seule la partie N-terminale de la protéine M, exposée à la face externe du virion, présente une hypervariabilité observée chez les coronavirus des mammifères ou aviaires. Une étude comparative de la souche F15 du BECV isolée en France (GOUET *et al.* - 1978) et de la souche MEBUS isolée aux Etats-Unis (MEBUS *et al.* - 1973a), montre qu'il n'existe que des différences mineures au niveau de la séquence de la protéine N (CRUCIERE - 1988).

On n'observe par ailleurs que deux mutations ponctuelles dans la séquence nucléotidique de la protéine M n'entraînant aucune modification de la séquence en acides aminés (LAPPS *et al.* - 1987 ; SAVOYSKY *et al.* - 1990). Par conséquent, l'ADNc correspondant à la séquence nucléotidique codant pour ces protéines devrait permettre de détecter par hybridation moléculaire différentes souches de BECV et de mettre au point un test de diagnostic.

Dans l'ensemble de ce travail, les sondes ont été préparées essentiellement à partir de l'insert 174. Ce fragment cloné a l'avantage, contrairement aux fragments 160 et 216, de ne pas présenter de site interne Pst I (fig. n° 13) et peut donc être excisé facilement du plasmide recombiné, sans fragmentation (le site Pst I correspond au site de clonage de l'ADNc dans le plasmide). L'analyse de la carte de restriction du génome, réalisée à l'aide du programme Microgénie de BECKMAN, n'a pas permis de sélectionner d'autres enzymes de restriction permettant l'excision des inserts 160 et 216 des plasmides recombinés sans coupures internes ou délétions, de façon plus satisfaisante que l'enzyme Pst I.

Par ailleurs, des essais d'amplification du signal de détection d'hybridation nous ont amené, pour certaines expérimentations, à utiliser également le clone PG 7-8 (banque d'ADNc - INRA - BOIREAU *et al.* - 1990). Ce clone mesure 2,3 kb et se situe à l'extrémité 5' du gène codant pour la protéine des péplomères S (fig. n° 13). La digestion par l'enzyme de restriction

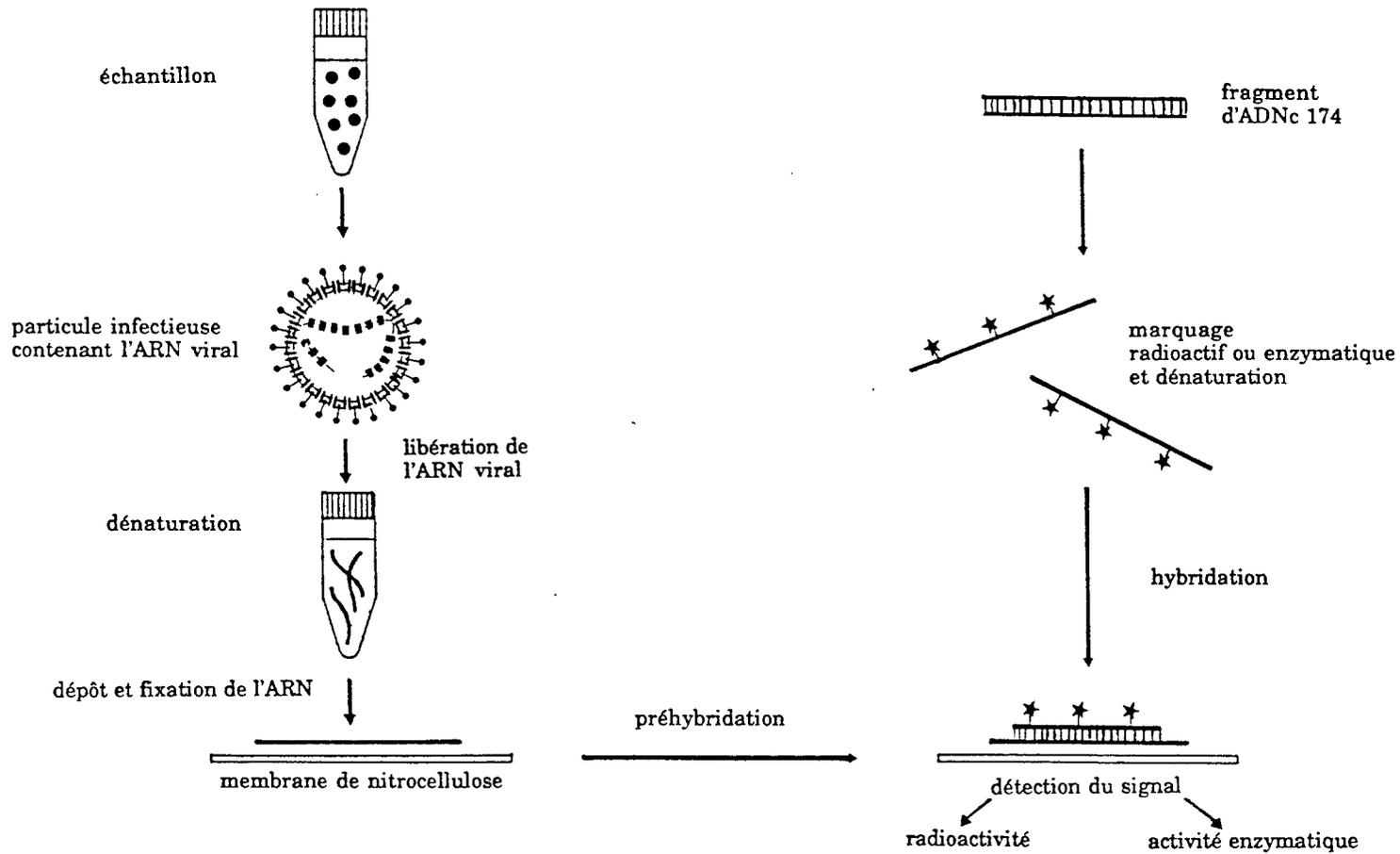


Fig. n° 14 : Différentes étapes de la technique d'hybridation moléculaire sur support (*dot* ou *slot blot*).

Pst I permet d'obtenir deux fragments, PG 7-8a de 1,3 kb et PG 7-8b de 0,8 kb, utilisés comme sondes.

Deux types de marquage des sondes ont été testés :

- marquage radioactif au phosphore 32, la détection étant réalisée par autoradiographie.
- marquage enzymatique par couplage à la peroxydase et détection par chimiluminescence.

La technique d'hybridation moléculaire utilisée est dite de *dot blot* ou de *slot blot*. Elle consiste à immobiliser les échantillons sur un support solide avant hybridation avec la sonde en solution (GILLESPIE et SPIEGELMAN - 1965 ; THOMAS - 1980). Des membranes de nitrocellulose ont été choisies comme support.

Le protocole d'hybridation comporte plusieurs étapes décrites dans le chapitre "Matériel et Méthodes" et schématisées sur la fig. n° 14 :

- la préparation des échantillons et leur dépôt, après dénaturation, sur la membrane de nitrocellulose.
- la fixation irréversible des acides nucléiques immobilisés sur la membrane.
- une préhybridation destinée à saturer les sites de fixation aspécifiques de la sonde sur la membrane.
- l'hybridation spécifique de la sonde marquée et dénaturée avec l'ARN viral immobilisé.
- les lavages destinés à éliminer la sonde non fixée.
- la détection du signal émis par la sonde.

2.1 Préparation des sondes

La préparation de sondes nécessite la production de grandes quantités d'ADN.

Les plasmides recombinés 174, 160 et PG 7-8, clonés dans la souche bactérienne *E. coli* RR1, ont été amplifiés puis purifiés par la technique des maxipréparations.

A partir d'une culture de 500 ml, nous avons obtenu, en moyenne, après purification, 250 à 300 µg de plasmide recombiné.

Les inserts 174, 160 et PG 7-8 ont été excisés des plasmides par digestion par l'enzyme de restriction Pst I. Après séparation des fragments de digestion par électrophorèse sur gel d'agarose, chaque insert a été extrait du gel par électroélution puis purifié. La digestion de 24 µg de plasmide recombiné permet ainsi d'obtenir environ 3 µg d'insert 174 purifié.

2.2 Hybridation moléculaire avec une sonde d'ADNc marquée au ³²P

L'ARN viral a été immobilisé sur membrane de nitrocellulose par la technique du *dot blot* ou du *slot blot*, puis hybridé à la sonde 174 marquée au phosphore 32 et dénaturée.

L'hybridation s'est déroulée, suivant la technique classique, à 42°C, en tampon contenant 50 % de formamide. Un des facteurs intervenant dans la cinétique de la réaction d'hybridation est la réassociation possible des deux brins complémentaires de la sonde en solution. Une forte concentration en formamide, de l'ordre de 50 à 65 % (VERBEEK et TIJSEN - 1988) permet une hybridation optimale avec formation préférentielle d'hybrides ARN-ADN plutôt que de duplex ADN-ADN. Cette diminution du taux de réassociation a pour conséquence une augmentation de la concentration relative de la sonde disponible pour l'hybridation ARN-ADN (CASEY et DAVIDSON - 1977 ; KAFATOS *et al.* - 1979 ; ANDERSON et YOUNG - 1988).

Les lavages ont été effectués en faisant varier la température et la concentration en sels du tampon afin d'éliminer la sonde en excès et de dissocier les hybrides instables. La sélection des hybrides présentant un haut degré d'homologie peut être obtenue en augmentant la température des lavages jusqu'à 65°-70°C. Après quelques essais, nous avons constaté qu'une température de 50°-55°C était suffisante pour éliminer toute hybridation non spécifique.

Le protocole détaillé du marquage de la sonde, de la préparation des échantillons et de l'hybridation est décrit dans "Matériel et Méthodes".

2.2.1 Marquage radioactif de la sonde 174

Le marquage de la sonde au phosphore 32 a été réalisé par la technique d'amorçage au hasard décrite par FEINBERG et VOGELSTEIN (1983). Ce procédé permet d'obtenir des sondes d'activité spécifique élevée, de l'ordre de 0,7 à 4.10⁹ dpm/µg (l'activité spécifique des sondes préparées par translation de coupure est de l'ordre de 10⁸ dpm/µg).

La technique consiste à hybrider, après dénaturation, l'ADN simple brin avec des hexanucléotides dont la séquence est déterminée au hasard. Ces hexanucléotides servent d'amorce pour la synthèse d'un brin complémentaire catalysée par l'ADN polymérase I (fragment de Klenow) en présence de desoxynucléotides triphosphates marqués en alpha par du ^{32}P .

Les premiers essais de préparation de sonde ont été réalisés à partir de 25 ng d'insert suivant le protocole proposé par AMERSHAM. Dans ces conditions, le taux d'incorporation des nucléotides s'est avéré très insuffisant, de l'ordre de 10 à 20 %. Nous avons alors augmenté la quantité d'insert introduite dans le milieu réactionnel. Après plusieurs essais, il a été établi que 100 à 200 ng d'ADN matriciel étaient nécessaires pour obtenir un taux d'incorporation satisfaisant, de l'ordre de 60 à 80 %. Ce sont ces conditions qui ont été adoptées au cours des différents marquages.

Nous avons ainsi préparé des sondes dont l'activité spécifique variait de 2 à 5.10^8 dpm/ μg .

2.2.2 Essais préliminaires d'hybridation par la technique du *dot blot*

L'expérimentation a porté sur l'étude de la spécificité, puis de la sensibilité de la technique.

2.2.2.1 Etude de la spécificité

Afin de détecter une éventuelle hybridation non spécifique liée à la reconnaissance par la sonde de séquences nucléotidiques d'origine cellulaire, la spécificité de la sonde radioactive 174 a tout d'abord été testée vis-à-vis d'une suspension de cellules HRT 18 non infectées et, en parallèle, vis-à-vis d'une quantité équivalente de cellules infectées par du BECV et titrant $2,1.10^8$ UFP/ml.

De plus, deux souches virales, également responsables d'entérites et susceptibles d'être présentes dans les selles ou dans le milieu hydrique, seules ou associées au BECV, ont également été testées. Ce sont :

- le virus de la gastroentérite du porcelet (TGEV souche Purdue 115), coronavirus appartenant à un groupe antigénique différent de celui du BECV. La suspension virale utilisée, titrant 5.10^7 UFP/ml, a été obtenue par culture du virus sur cellules rénales de porc de la lignée RP.

UFP A B C D

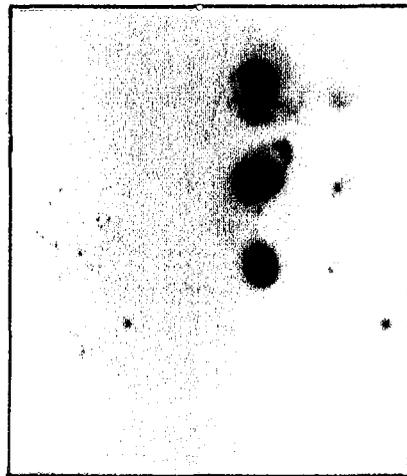
5,25.10⁶2,62.10⁶1,31.10⁶6,66.10⁵3,25.10⁵

Fig. n° 15 : Essais préliminaires : spécificité de la sonde 174 marquée au ³²P.
Détection de l'ARN viral à partir de cultures de cellules infectées.

A : TGEV
B : rotavirus
C : BECV
D : cellules HRT 18 non infectées

- le rotavirus (souche SA 11) cultivé sur cellules MA 104, la suspension virale utilisée titrant $2,5.10^8$ UFP/ml.

Différentes dilutions de ces suspensions virales clarifiées ont été réalisées sous un volume de 10 μ l (25 μ l pour les échantillons non dilués) puis déposées sur une membrane de nitrocellulose après dénaturation par la chaleur. L'hybridation a été réalisée avec la sonde 174 marquée au 32 P. Ainsi, des quantités de $5,25.10^6$ à $3,25.10^5$ UFP ont été testées pour le BECV et le rotavirus et de $1,3.10^6$ à $3,25.10^5$ UFP dans le cas du TGEV (fig. n° 15).

La lecture de l'autoradiogramme permet de dégager les points suivants :

- un très léger bruit de fond est observé aux concentrations les plus élevées avec les cellules HRT 18 non infectées. Toutefois, le signal est très faible.
- avec les cellules infectées par le BECV, le signal d'hybridation est beaucoup plus intense et permet la détection du virus jusqu'à la dilution correspondant à $1,31.10^6$ UFP.
- aucune hybridation n'est constatée ni avec le rotavirus, ni avec le TGEV, dans les conditions de notre expérimentation.

2.2.2.2 Etude de la sensibilité

La sensibilité a tout d'abord été déterminée par hybridation avec l'ARNg du BECV. Nous avons ensuite étudié l'influence de la préparation des échantillons à hybrider sur la sensibilité de la détection du BECV produit en culture de cellules HRT 18.

a - Détection de l'ARN génomique purifié

La sensibilité de la réaction d'hybridation a été étudiée en déterminant la plus petite quantité d'ARNg pouvant être détectée par hybridation avec la sonde 174 radioactive. Ainsi, des quantités de 360 à 0,7 ng d'ARNg, purifié, sous un volume de 4 μ l, ont été déposées par *dot blot* sur la membrane de nitrocellulose avant hybridation avec la sonde dénaturée.

ng d'ARNg

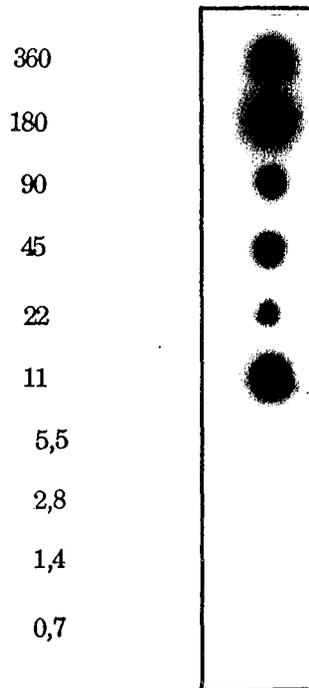


Fig. n° 16 : Essais préliminaires : sensibilité de la sonde 174 marquée au ^{32}P .
Détection de l'ARNg du BECV.

Les résultats sont portés sur la fig. n° 16.

Un signal est encore observé en présence de 11 ng d'ARNg mais aucun spot n'est plus détectable avec 5,5 ng.

La sonde reconnaît donc bien les régions homologues de l'ARNg et permet de détecter une quantité minimale d'ARN viral de 11 ng. Considérant que la masse moléculaire du génome du BECV est de $6,9 \cdot 10^6$ (MAC NAUGHTON - 1978 ; BRIAN *et al.* - 1980), la sonde 174 marquée au ^{32}P serait donc capable de détecter 10^9 copies du génome.

b - Détection du BECV produit en culture de cellules HRT 18 : influence de différents traitements

Afin de s'hybrider, l'ARN viral doit être accessible à la sonde. Les protéines et macromolécules présentes dans la suspension de cellules infectées, de même que les protéines virales de l'enveloppe et de la nucléocapside, peuvent perturber l'hybridation. Pour pallier à ces inconvénients, nous avons extrait les acides nucléiques des suspensions de cellules infectées avant dépôt sur membrane. En effet, il est à prévoir que de tels traitements soient à envisager avec certains prélèvements, tels les fécès, fortement chargés en protéines et en pigments colorés.

Deux procédés d'extraction ont été testés :

- traitement par la protéinase K puis extraction des acides nucléiques au phénol-chloroforme et précipitation à l'éthanol.
- simple extraction au phénol, puis au phénol-chloroforme et précipitation à l'éthanol.

Dans les deux cas, des dilutions des acides nucléiques extraits ont été réalisées dans un très petit volume de tampon TE (4 μl) puis déposées sur la membrane de nitrocellulose après dénaturation. Des dépôts correspondant à des quantités de virus comprises entre $2,1 \cdot 10^7$ et $4 \cdot 10^4$ UFP ont été ainsi effectués. En parallèle, des quantités équivalentes de suspension virale non traitée et simplement dénaturée par chauffage ont été déposées à titre de comparaison.

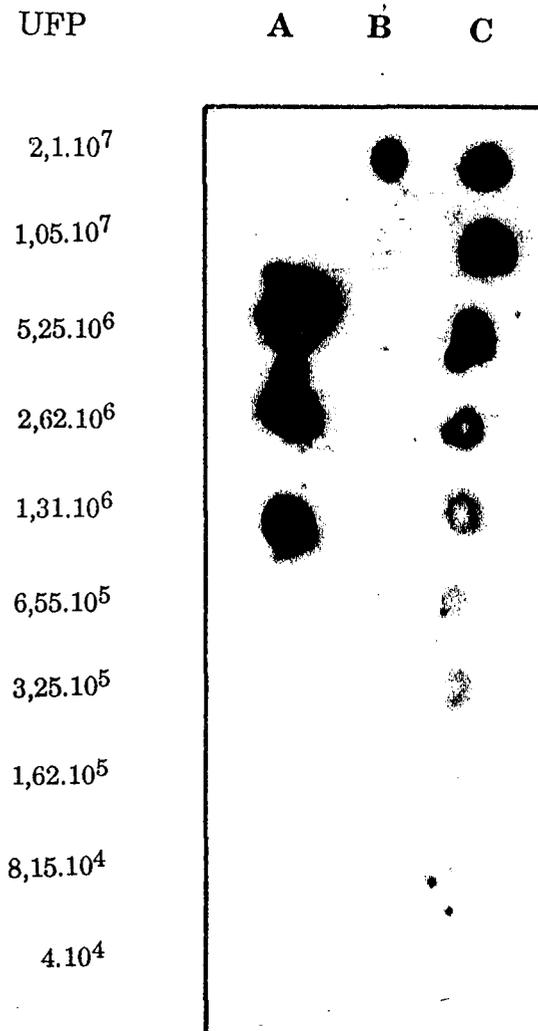


Fig. n° 17 : Essais préliminaires : influence de différents traitements sur la détection du BECV produit en culture de cellules HRT 18 par la sonde 174 marquée au ^{32}P .

A : suspension virale non traitée

B : acides nucléiques extraits par le phénol

C : acides nucléiques extraits par le phénol après traitement par la protéinase K

L'autoradiogramme obtenu est présenté sur la fig. n° 17.

En absence de traitement, comme nous l'avons constaté précédemment, nous observons un signal d'hybridation jusqu'à une dilution de la suspension de cellules HRT 18 infectées correspondant à $1,31.10^6$ UFP.

La technique d'extraction au phénol est peu satisfaisante avec une détection de $2,1.10^7$ UFP. Une diminution de la sensibilité d'un facteur 20 par rapport à un dépôt direct des suspensions virales ne peut s'expliquer que par la perte importante du matériel nucléaire au cours de la manipulation due, sans doute, à une extraction inefficace.

Dans le cas du traitement par la protéinase K, suivi de l'extraction des acides nucléiques, nous détectons un signal d'hybridation jusqu'à une dilution correspondant à $3,25.10^5$ UFP. La sensibilité de la détection est donc 4 fois plus grande que lors du dépôt direct de la suspension virale.

En conclusion, les résultats des expérimentations préliminaires montrent que la sonde d'ADNc 174 peut être utilisée pour la détection du BECV. La limite de détection obtenue est de 11 ng d'ARNg, ce qui correspond à 10^9 copies du génome.

Les résultats sont en accord avec ceux obtenus par CRUCIERE (1988) qui atteint une sensibilité de 15 ng par hybridation de l'ARNg du BECV F15 avec une sonde correspondant au gène de la nucléocapside N. Cependant, des seuils de sensibilité de 25 pg (SHOCKLEY *et al.* - 1987) ou de 1 pg (VERBEEK et TIJSSEN - 1988) ont été récemment obtenus pour la détection du coronavirus entérique bovin (souche MEBUS) ainsi que pour celle d'autres virus comme la détection du cytomégalovirus dans les urines (CHOU *et al.* - 1983), du virus de l'hépatite B dans le sérum (BERNINGER *et al.* - 1982), ou du rotavirus dans les fèces (FLORES *et al.* - 1983).

Ces constatations nous incitent à penser que des améliorations peuvent être apportées à notre test afin d'abaisser le seuil de détection.

Le BECV peut être détecté directement à partir d'une culture de cellules HRT 18 infectées, ce qui présente l'avantage de constituer une technique simple et rapide. Cependant, un traitement par la protéinase K, suivi de l'extraction des acides nucléiques, abaisse d'un facteur 4 le seuil de détection.

La sonde est spécifique du BECV, aucun signal d'hybridation n'ayant été observé ni avec le TGEV, ni avec le rotavirus. Seul un très léger bruit de fond est observé avec les cellules HRT 18 non infectées. Ainsi, à partir d'un surnageant de culture de cellules HRT 18 infectées, la sonde est capable de

reconnaître sélectivement l'ARN viral qui, selon WEISS et LEIBOWITZ (1983) ne représenterait que 1 % des ARN intracellulaires totaux.

2.2.3 Hybridation moléculaire par la technique du slot blot

Le dépôt des échantillons sur membrane de nitrocellulose à l'aide d'un capillaire ne peut être réalisé que sous de petits volumes (1 à 10 μ l) et, par sa lenteur, ne favorise pas le traitement d'un grand nombre de prélèvements. Le calibrage des microgouttes est difficile à standardiser et leur tendance à s'étaler entraîne une diminution de la sensibilité.

Nous avons remédié à ces problèmes en utilisant pour la suite de ce travail un appareil de dépôt par filtration sous vide suivant la technique du *slot blot*. L'appareil présente l'avantage de permettre le dépôt simultané et rapide de 24 prélèvements.

Au cours du passage par aspiration des échantillons au travers de la membrane de nitrocellulose, les acides nucléiques sont retenus et concentrés sur une très petite surface en forme de fente, ce qui devrait augmenter la sensibilité de la technique par rapport au dépôt manuel en *dot blot*.

De plus, ce procédé permet éventuellement la mesure par densitométrie de l'intensité du signal détecté (DAVID *et al.* - 1989).

Enfin, les dépôts peuvent être effectués sous un volume de 100 à 400 μ l, ce qui facilite la préparation du matériel à fixer.

Au cours des premières expériences utilisant l'appareil de dépôt par aspiration, nous avons suivi le protocole conseillé par le fabricant en rinçant chaque cupule après dépôt des échantillons avec 1 à 2 ml de tampon de dépôt. Nous avons constaté, après hybridation et autoradiographie, la présence d'un bruit de fond très élevé au niveau de chaque fente, perturbant les résultats et empêchant toute interprétation. Après plusieurs essais, nous avons pu relier ce phénomène à la concentration saline des différents tampons. Nous avons alors modifié le protocole en supprimant les rinçages et en nous contentant d'effectuer les dépôts sous un volume de 100 μ l, volume minimum nécessaire à une répartition homogène sur la surface de la fente. Cette simple modification suffit à supprimer tout bruit de fond comme le montrent les autoradiogrammes présentés dans la suite de ce travail.

L'étude réalisée au cours des essais préliminaires a été reprise en y apportant des modifications destinées à améliorer la sensibilité de la

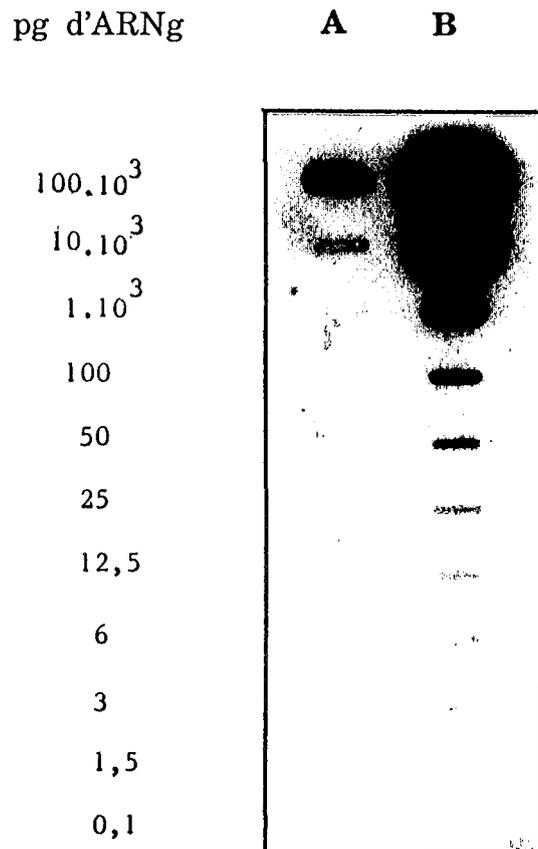


Fig. n° 18 : Sensibilité de la sonde 174 marquée au ^{32}P .
Détection de l'ARNg du BECV.

A : ARNg en présence de NP-40
B : ARNg en tampon SSC 20X

technique. Les expériences ont été réalisées comme précédemment avec la sonde 174 marquée au ^{32}P par la technique d'amorçage au hasard.

2.2.3.1 Etude de la sensibilité

La sensibilité de la technique a tout d'abord été étudiée par hybridation de l'ARNg avec la sonde 174 seule, puis avec un mélange de plusieurs sondes dans le but d'amplifier le signal de détection.

a - Hybridation avec la sonde 174

Des dilutions successives d'ARNg (100 ng à 0,1 pg) ont été déposées par la technique de *slot blot* sur une membrane de nitrocellulose, puis hybridées avec la sonde radioactive 174.

Différentes conditions d'immobilisation de l'ARNg sur la membrane de nitrocellulose ont été expérimentées :

- SHOCKLEY *et al.* (1987), s'inspirant d'une technique décrite par WHITE et BANCROFT (1982) ayant montré que le NP-40 augmentait de façon sensible la fixation de l'ARN sur la nitrocellulose, nous avons alors testé le protocole proposé par ces auteurs.
- Les acides nucléiques se fixant plus facilement sur la nitrocellulose dans des conditions de force ionique élevée, les dilutions d'ARNg dénaturé ont été additionnées de tampon SSC 20X, immédiatement avant leur dépôt sur la membrane.

L'autoradiogramme obtenu pour ces deux techniques est présenté sur la fig. n° 18.

Les dépôts positifs pour l'ARN viral correspondent à des bandes de plus ou moins forte intensité. Les dépôts négatifs correspondent aux fentes invisibles ou à celles dont les bords sont légèrement ombrés.

Contrairement à toute attente, l'immobilisation de l'ARNg en présence de NP-40 ne donne que des résultats médiocres avec un seuil de détection de 100 ng.

Dans des conditions de force ionique élevée, la limite de détection de la sonde est de l'ordre de 1,5 à 3 pg d'ARNg, soit l'équivalent de 1 à $2 \cdot 10^5$ copies du génome. Ces conditions, associées à une meilleure concentration de l'ARNg sur la membrane, permettent donc d'améliorer la sensibilité de la

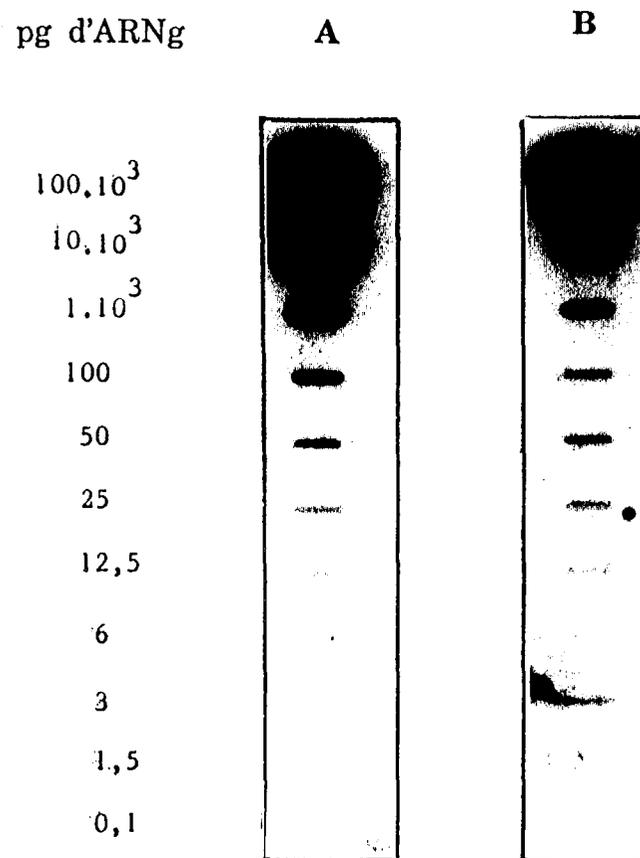


Fig. n° 19 : Amplification du signal de détection avec un mélange de sondes radioactives.

A : sonde 174

B : mélange des sondes 174, 160, PG 7-8 a et PG 7-8 b

technique d'un facteur de 10^4 par rapport aux résultats obtenus lors des essais préliminaires pour lesquels la sensibilité est de 11 ng.

b - Amplification du signal de détection en utilisant plusieurs sondes

VERBEEK et TIJSSSEN (1988) ont montré qu'il était possible d'amplifier le signal de détection en utilisant, au lieu d'une seule sonde, un mélange de plusieurs sondes. Dans ce but, nous avons réalisé des expérimentations en utilisant un cocktail de sondes :

- l'insert 174
- l'insert 160 (le plus grand fragment obtenu après digestion par l'enzyme de restriction Pst I)
- l'insert PG 7-8 (scindé en deux fragments PG 7-8a et 7-8b par l'enzyme Pst I)

Les inserts 174 et 160 présentent entre eux des zones de recouvrement de séquences. Par contre, l'insert PG 7-8, situé dans le gène codant pour la protéine des péplomères S, ne présente aucune zone de recouvrement avec les deux autres inserts.

Deux séries de dilutions d'ARNg ont été déposées, après dénaturation, en tampon SSC 20X sur une membrane de nitrocellulose, puis hybridées, l'une avec la sonde radioactive 174, l'autre avec une quantité équivalente (en dpm) d'un mélange des sondes radioactives 174, 160, PG 7-8a et PG 7-8b.

L'autoradiogramme obtenu est présenté sur la fig. n° 19.

Nous n'observons pas de différence significative entre les autoradiogrammes A et B. Toutefois, avec le mélange de sondes, l'intensité du signal est légèrement amplifiée pour les dilutions les plus fortes permettant une meilleure visualisation des bandes les moins intenses. L'utilisation d'un mélange de sondes n'apporte donc pas d'amélioration de la sensibilité de la détection.

2.2.3.2 Détection du BECV à partir d'une culture de cellules infectées

Des dilutions ont été réalisées à partir de 10 μ l de surnageant de culture de cellules HRT 18 infectées titrant $2,1 \cdot 10^8$ UFP/ml.

Nous avons tenté, par différents traitements, de définir les conditions

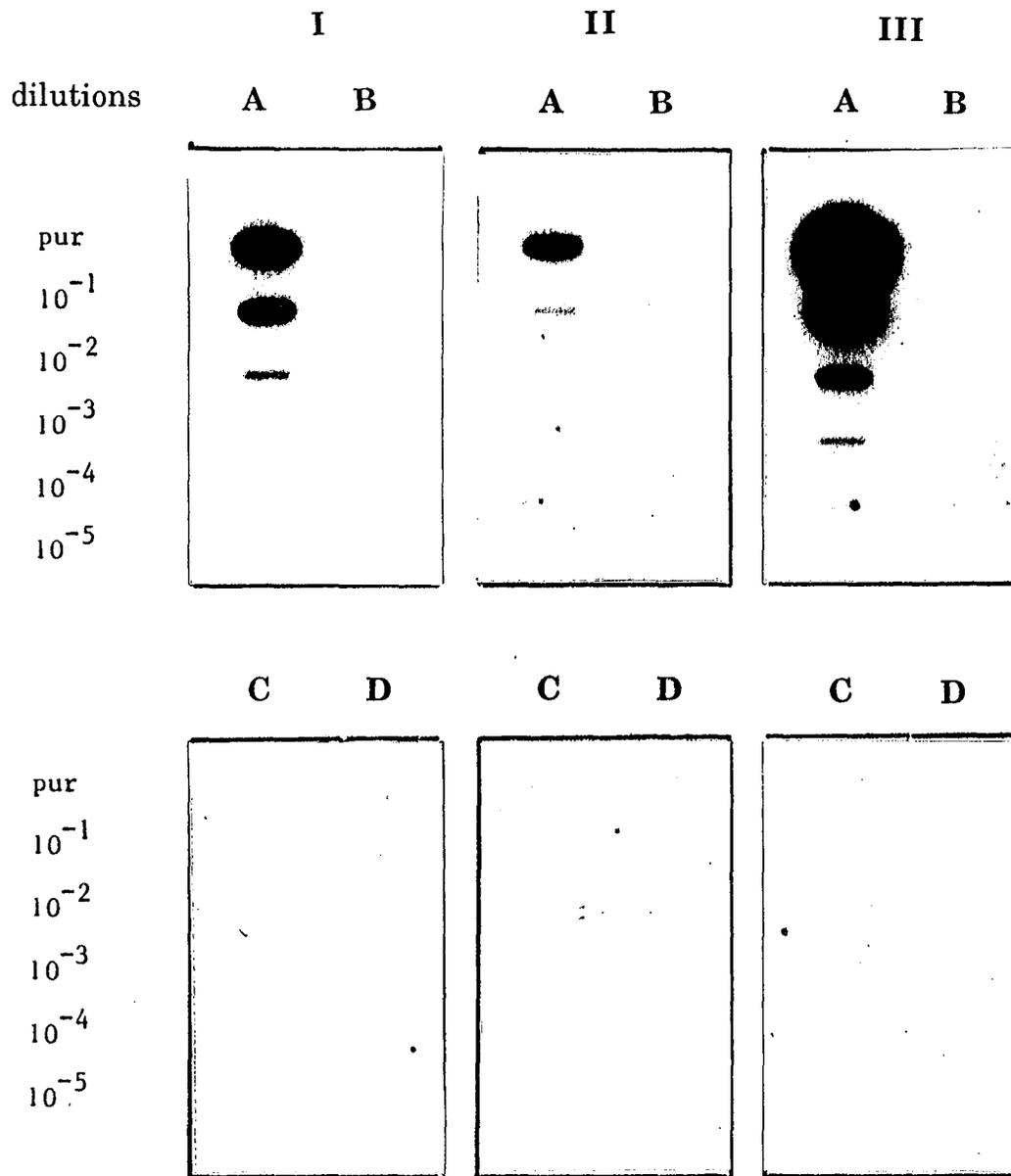


Fig. n° 20 : Détection par la sonde 174 marquée au ^{32}P de l'ARN viral dans le surnageant de culture de cellules infectées.

I : échantillons non traités

II : lyse des virus par traitement au NP-40

III : acides nucléiques extraits après traitement par la protéinase K

A : BECV (échantillon non dilué : $2,1 \cdot 10^6$ UFP)

B : cellules HRT 18 non infectées

C : rotavirus (échantillon non dilué : $2,5 \cdot 10^6$ UFP)

D : TGEV (échantillon non dilué : $5 \cdot 10^5$ UFP)

optimales permettant de fixer et de rendre l'ARN viral accessible à la sonde :

- dépôt direct des suspensions virales après dénaturation par chauffage, sans traitement préalable.

Les dépôts ont été réalisés en tampon de faible force ionique par addition de SSC 1X. En effet, VERBEEK et TIJSSSEN (1988) ont montré, qu'à l'inverse de l'ARN purifié, le virus se fixe mieux sur la nitrocellulose dans un environnement salin de faible concentration. Le mécanisme de fixation des acides nucléiques et des protéines sur la nitrocellulose est complexe et fait intervenir des liaisons hydrophobes, des liaisons hydrogènes et des ponts salins. Dans le cas présent, il s'agirait surtout de liaisons hydrophobes.

- lyse partielle des virus par action du NP-40 avant dénaturation et dépôt.
- extraction des acides nucléiques par action successive de la protéinase K et du phénol-chloroforme puis, après dénaturation, dépôt en tampon SSC 20X.

De plus, afin de vérifier la spécificité de la sonde, nous avons appliqué ce même protocole à des quantités équivalentes de :

- suspension de cellules HRT 18 non infectées.
- suspension de cellules rénales de porc de la lignée RP, infectées par le TGEV et titrant 5.10^7 UFP/ml.
- suspension de cellules MA 104 infectées par du rotavirus et titrant $2,5.10^8$ UFP/ml.

Après dépôt sur membrane de nitrocellulose et fixation, les échantillons biologiques ont été hybridés à la sonde 174 marquée au ^{32}P et dénaturée.

Les résultats obtenus après autoradiographie sont présentés sur la fig. n° 20.

La sonde s'hybride de façon spécifique avec l'ARN du BECV. Aucun signal n'est détecté avec le rotavirus, le TGEV ou les cellules HRT 18 non infectées quels que soient le traitement et la dilution envisagés, ce qui confirme les résultats précédemment obtenus par hybridation moléculaire en *dot blot*.

La limite de détection est de $2,1.10^4$ UFP pour les échantillons non traités et de $2,1.10^3$ UFP pour les acides nucléiques extraits après traitement par la protéinase K. Ces mêmes données, obtenues lors des essais préliminaires, sont respectivement de $1,31.10^6$ UFP et $3,25.10^6$ UFP.

Nous confirmons donc que la détection directe du virus à partir d'un surnageant de culture de cellules HRT 18 est possible sans autre traitement

préalable qu'une simple dénaturation par chauffage avant dépôt. Cependant, l'extraction des acides nucléiques après traitement par la protéinase K permet de reculer la limite de détection d'une dilution, soit d'un facteur 10 par rapport au dépôt direct.

Par ailleurs, les modifications apportées dans le protocole de dépôt des échantillons sur la membrane de nitrocellulose permettent d'améliorer la sensibilité de la technique d'hybridation moléculaire d'un facteur 50 pour les échantillons non traités et d'un facteur 150 après traitement par la protéinase K et extraction des acides nucléiques, par rapport aux essais préliminaires.

Le traitement des échantillons au NP-40, avec un seuil de détection de $2,1 \cdot 10^5$ UFP, donne des résultats aussi médiocres que ceux obtenus lors de l'hybridation de l'ARNg. Cette limite de détection est notamment 10 fois plus élevée qu'avec les échantillons non traités. Dans ce cas, il est à noter que, lors du dépôt des échantillons sur la membrane de nitrocellulose, nous avons rencontré des problèmes de colmatage. Ceci nous a obligé à diluer fortement les échantillons afin de favoriser leur aspiration qui, néanmoins, s'est avérée plus ou moins complète. Ces difficultés peuvent en partie expliquer les résultats décevants obtenus avec cette technique.

En conclusion de cette étude, la technique la plus sensible permettant la détection du BECV à partir de cellules infectées requiert l'extraction des acides nucléiques après traitement par la protéinase K.

Dans ce cas, un signal positif est observé jusqu'à la dilution 10^{-3} , c'est-à-dire pour un dépôt correspondant à un volume de la suspension virale non diluée de $0,01 \mu\text{l}$. En tenant compte des résultats précédemment obtenus avec l'ARNg, la présence de ce signal positif indique qu'il doit y avoir au moins 3 pg d'ARN viral dans l'échantillon déposé, soit $2,6 \cdot 10^5$ copies du génome et par conséquent, $2,6 \cdot 10^5$ particules virales dans $0,01 \mu\text{l}$ de surnageant de culture. Le titre correspondant de la suspension virale devrait donc être de $2,6 \cdot 10^{10}$ UFP/ml. Dans le meilleur des cas, après culture du BECV sur cellules HRT 18 et titrage par la technique des plages, des titres supérieurs à $2 \cdot 10^9$ UFP/ml n'ont jamais été obtenus. En l'occurrence, la suspension virale utilisée pour cette étude indique un titre de $2,1 \cdot 10^8$ UFP/ml.

Il apparaît donc que, dans une suspension virale provenant d'une culture de 3 jours sur cellules HRT 18, pour une particule virale infectieuse détectée par titrage, il y aurait 100 particules non infectieuses.

Ces observations sont en accord avec celles de SHOCKLEY *et al.* (1987) qui estiment que, dans une culture de cellules infectées, le nombre de particules

non infectieuses est 100 à 400 fois plus important que celui des particules infectieuses.

2.3 Hybridation moléculaire avec une sonde d'ADNc marquée à la peroxydase

Lors du marquage d'une sonde radioactive, la structure de l'ADN n'est pas modifiée. L'hybridation peut ainsi s'effectuer dans des conditions optimales permettant la meilleure sensibilité. Cependant, la demi-vie du ^{32}P est courte (14,3 jours), ce qui nécessite la préparation fréquente de nouvelles sondes. De plus, comme pour tous les radioisotopes, son utilisation impose des contraintes qui limitent son emploi à quelques laboratoires (autorisation administrative - manipulation délicate - stockage et élimination des déchets...).

Devant ces inconvénients, nous avons envisagé de tester un des nombreux systèmes de marquage non radioactif qui se sont développés depuis quelques années.

La plupart des techniques utilisent un marquage indirect. Un groupement chimique est introduit dans la sonde puis mis en évidence après hybridation par un système de reconnaissance porteur du signal. Il s'agit, le plus souvent, d'une enzyme détectée par son activité catalytique. C'est le cas du système biotine-avidine (LEARY *et al.* - 1983 ; MURASUGI et WALLACE - 1984) ou de procédés utilisant un analogue de base, la 5-bromo-désoxyuridine (TRAINCARD *et al.* - 1983) ou la digoxigénine, détectés par un système immunoenzymatique.

Certains procédés permettent actuellement de coupler directement de manière covalente des enzymes à l'ADN, ce qui réduit au maximum les étapes nécessaires à la détection des hybrides. C'est ainsi que RENZ et KURZ (1984) ont mis au point un protocole de couplage de la peroxydase à l'ADN par l'intermédiaire du glutaraldéhyde. Ce procédé, associé à un système de détection par chimiluminescence (WHITEHEAD *et al.* - 1983), est à l'origine de la mise au point d'un test de détection de l'hybridation moléculaire commercialisé par AMERSHAM sous le nom de "ECL gene detection system". Nous avons choisi d'expérimenter ce procédé en raison de sa rapidité d'exécution et de sa sensibilité. Selon ENNS (1988), la sensibilité du marquage par chimiluminescence serait équivalente à celle d'un marquage radioactif.

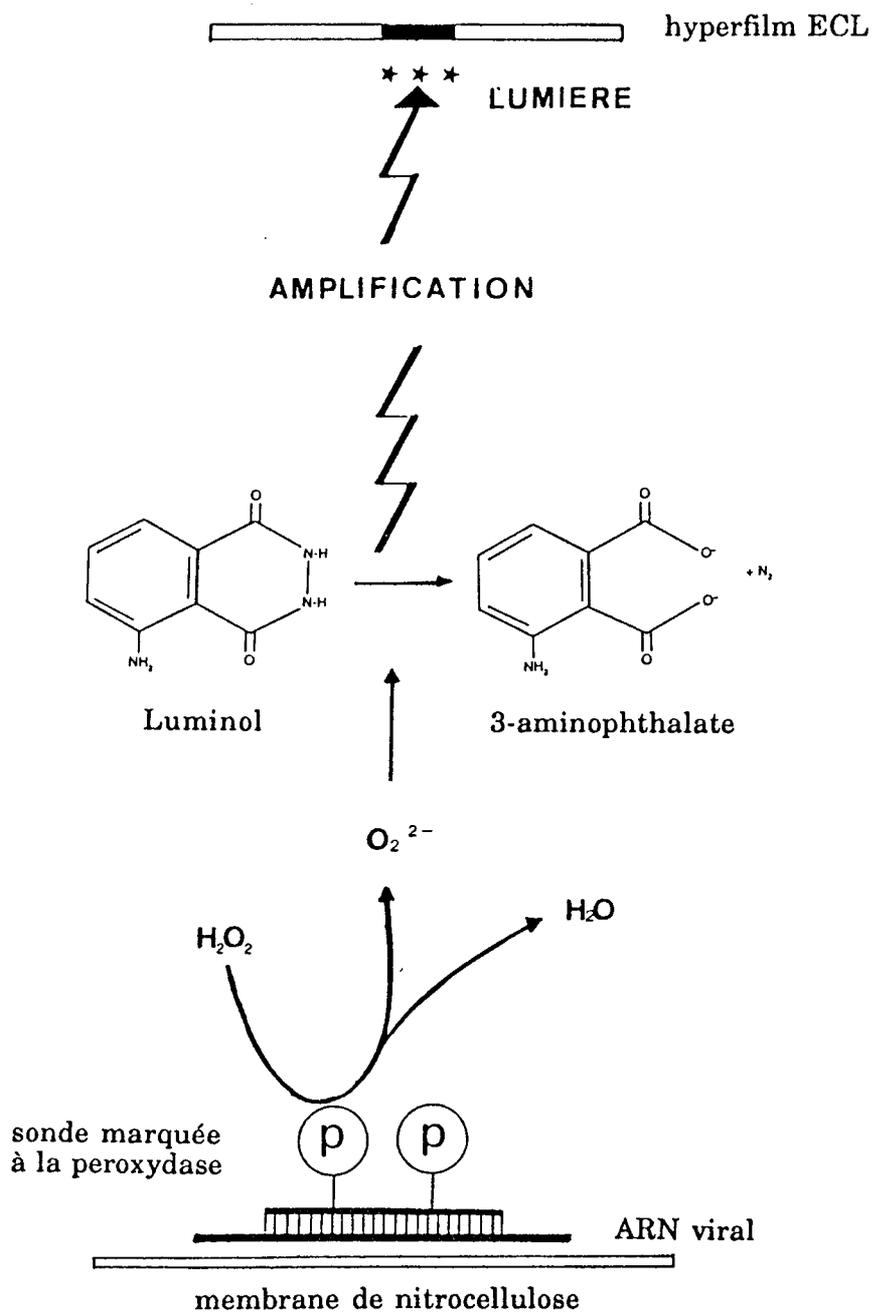


Fig. n° 21 : Principe du système de détection de gène ECL.

La méthode de marquage de l'ADN consiste à modifier la peroxydase de raifort par la parabenzoquinone et la polyéthylèneimine afin de créer des charges positives favorisant sa fixation sur l'ADN chargé négativement. L'enzyme modifiée est ensuite couplée à l'ADN dénaturé par l'intermédiaire du glutaraldéhyde. Le rendement du marquage est en moyenne d'une molécule d'enzyme pour 30 nucléotides.

Le protocole d'hybridation proprement dit est sensiblement identique à celui utilisé avec les sondes radioactives.

Le tampon d'hybridation contient de l'urée, agent dénaturant qui permet la formation de l'hybride à une température qui respecte la stabilité de l'enzyme, soit 42°C au maximum. Une concentration en urée de 6 M correspond à une concentration en formamide de 50 % à la température d'incubation de 42°C. Un polymère inerte est ajouté au tampon d'hybridation. Occupant un certain volume, sa présence entraîne une augmentation de la concentration de la sonde en solution avec, pour conséquence, une amélioration du rendement d'hybridation. Ainsi, avec une sonde double-brin, le rendement serait multiplié par un facteur 100 (ANDERSON et YOUNG - 1988).

Les lavages sont réalisés dans du tampon de faible force ionique et saturé en urée. Il n'est pas possible ici de faire varier la température au-delà de 42°C pour les raisons invoquées précédemment.

Le principe de détection des hybrides est basé sur le phénomène de chimiluminescence (fig. n° 21).

La peroxydase est utilisée pour catalyser l'oxydation du luminol en présence de peroxyde d'hydrogène. Après oxydation, le luminol se trouve dans un état activé et revient progressivement à son état fondamental en produisant une émission lumineuse de couleur bleue pouvant impressionner un film radiologique (WHITEHEAD *et al.* - 1983). Certains composants, comme les dérivés du phénol, permettent d'augmenter l'émission lumineuse d'un facteur 1000 (THORPE *et al.* - 1985 ; MOTSENBOCKER - 1988). Ces dérivés n'agissent pas en augmentant le rendement quantique de la réaction mais régulent la réaction entre la peroxydase, l'oxydant et le luminol, et seraient en fait des accélérateurs de l'activité enzymatique (LUNDIN et HALLANDER - 1986).

Le protocole détaillé du marquage de la sonde, de l'hybridation et de la détection du signal est décrit dans le chapitre "Matériel et Méthodes".

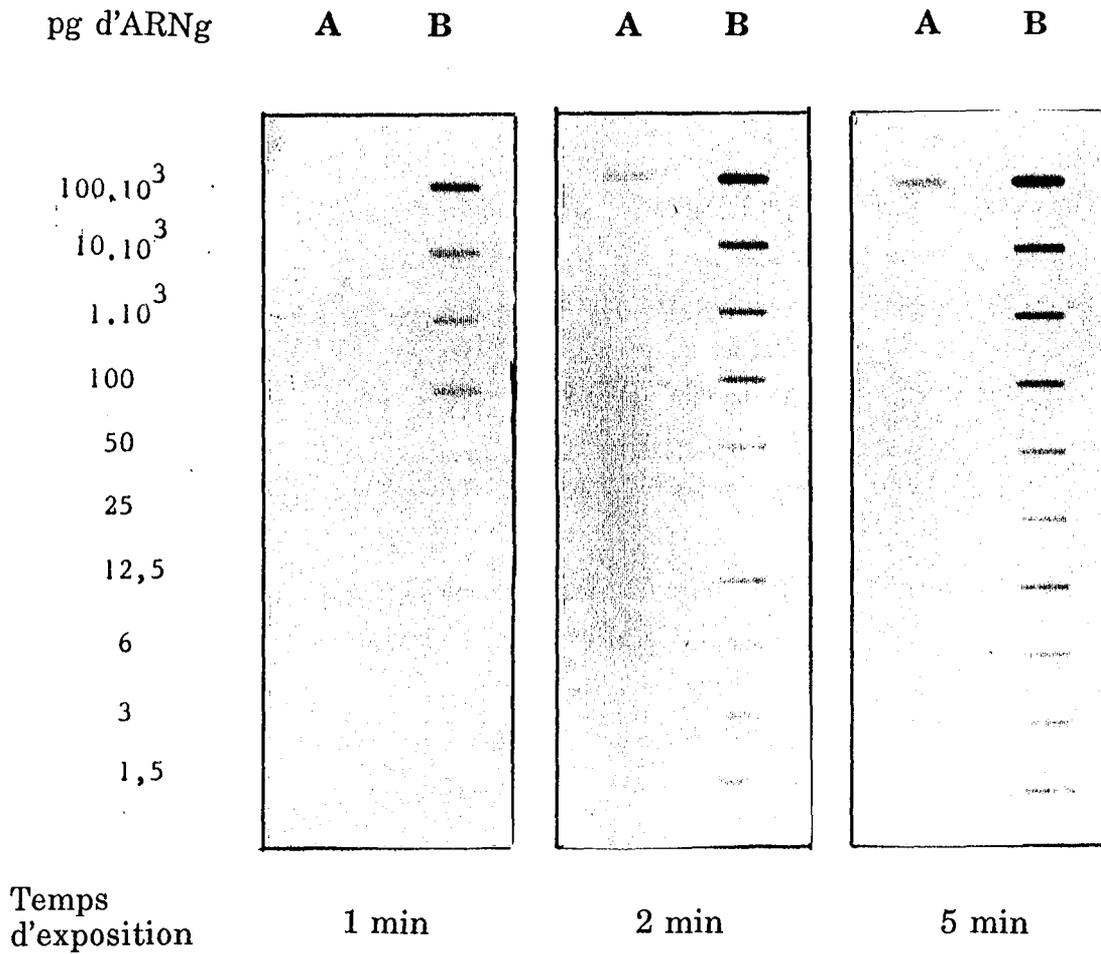


Fig. n° 22 : Sensibilité de la sonde 174 marquée à la peroxydase vis-à-vis de l'ARNg du BECV.

A : ARNg en présence de NP-40
B : ARNg en tampon SSC 20X

Afin d'établir une comparaison entre sondes radioactives et luminescentes, les différents paramètres intervenant dans la sensibilité de la détection du BECV par hybridation moléculaire ont été testés. Toutes les expérimentations ont été réalisées en déposant les échantillons selon la technique du *slot blot*.

2.3.1 Etude de la sensibilité

2.3.1.1 Détection d'ARNg par hybridation avec la sonde 174

Des dilutions successives d'ARNg (100 ng à 0,1 pg) en tampon SSC 20X ou en tampon contenant du NP-40 ont été déposées, après dénaturation, par la technique de *slot blot*, sur une membrane de nitrocellulose, puis hybridées avec la sonde 174 marquée à la peroxydase. Après développement de la réaction de chimiluminescence, des films radiologiques ont été placés au contact des dépôts pendant 1, 2, 5 et 10 min.

Les autoradiogrammes sont présentés sur la fig. n° 22.

Considérons tout d'abord les dépôts d'ARNg réalisés en tampon SSC 20X. Après un temps de contact de 1 min, l'autoradiogramme révèle 4 bandes positives correspondant aux concentrations les plus fortes en ARNg.

Des temps d'exposition plus longs (2 à 5 min ou plus) renforcent l'intensité de ces bandes mais favorisent également le développement d'un bruit de fond uniforme sur l'ensemble des dépôts pouvant être à l'origine de fausses interprétations.

Ce bruit de fond s'observant également avec un témoin négatif réalisé avec du tampon de dépôt, il laisse supposer que la forte concentration en sels de celui-ci intervienne dans ce phénomène. Par ailleurs, la firme AMERSHAM signale que l'utilisation de certains appareils de dépôt par aspiration peuvent endommager les membranes et peut être à l'origine d'artéfacts gênants. Néanmoins, une lecture au bout d'un temps d'exposition de 1 à 2 min permet d'éviter en grande partie ce phénomène.

Dans ces conditions de temps d'exposition, la limite de détection est de 100 pg d'ARNg, soit $9 \cdot 10^6$ copies du génome. La sonde marquée à la peroxydase et couplée au système de détection ECL serait donc approximativement 50 fois moins sensible que la sonde radioactive capable, elle, de détecter 1,5 à 3 pg d'ARNg.

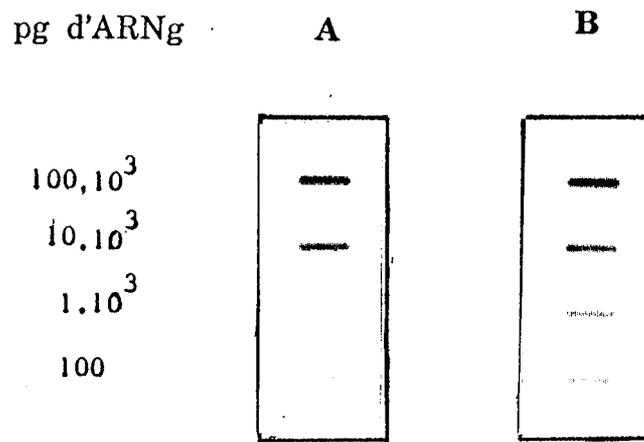


Fig. n° 23: Amplification du signal de détection avec un mélange de sondes marquées à la peroxydase.

A : sonde 174

B : mélange des sondes 174, 160, PG 7-8 a et PG 7-8 b

Comme nous l'avons constaté au cours de l'hybridation avec la sonde radioactive, les dépôts d'ARNg en tampon NP-40 sont décevants. Un temps de contact de 2 à 5 min est nécessaire pour faire apparaître une bande de faible intensité correspondant à un dépôt de 100 ng d'ARNg.

2.3.1.2 Amplification du signal de détection en utilisant plusieurs sondes

Comme pour les sondes radioactives, et afin d'améliorer la sensibilité de la détection, nous avons hybridé l'ARNg du BECV avec, d'une part, la sonde 174, et d'autre part, un mélange des sondes 174, 160, PG 7-8a et PG 7-8b.

L'autoradiogramme obtenu après 2 min d'exposition du film radiologique est présenté sur la fig. n° 23.

Les résultats sont comparables à ceux obtenus avec les sondes radioactives. L'hybridation avec le mélange de sondes conduit à une légère augmentation de l'intensité du signal de détection dans le cas des dilutions les plus fortes, ce qui permet une meilleure visualisation de ces bandes. L'amplification du signal est cependant plus nette que lors de l'utilisation des sondes radioactives.

2.3.2 Détection du BECV à partir d'une culture de cellules infectées

Nous avons reproduit la même expérimentation que lors de l'utilisation de la sonde marquée au ^{32}P en traitant parallèlement des suspensions de cellules HRT 18 infectées ou non par du BECV ainsi que des suspensions de rotavirus et de TGEV (fig. n° 24).

De plus, trois types de traitements ont été appliqués aux suspensions virales avant dépôt sur membrane de nitrocellulose et hybridation avec la sonde 174 marquée à la peroxydase :

- dépôt direct des suspensions virales après dénaturation par chauffage.
- lyse des particules virales par action du NP-40.
- extraction des acides nucléiques après traitement par la protéinase K.

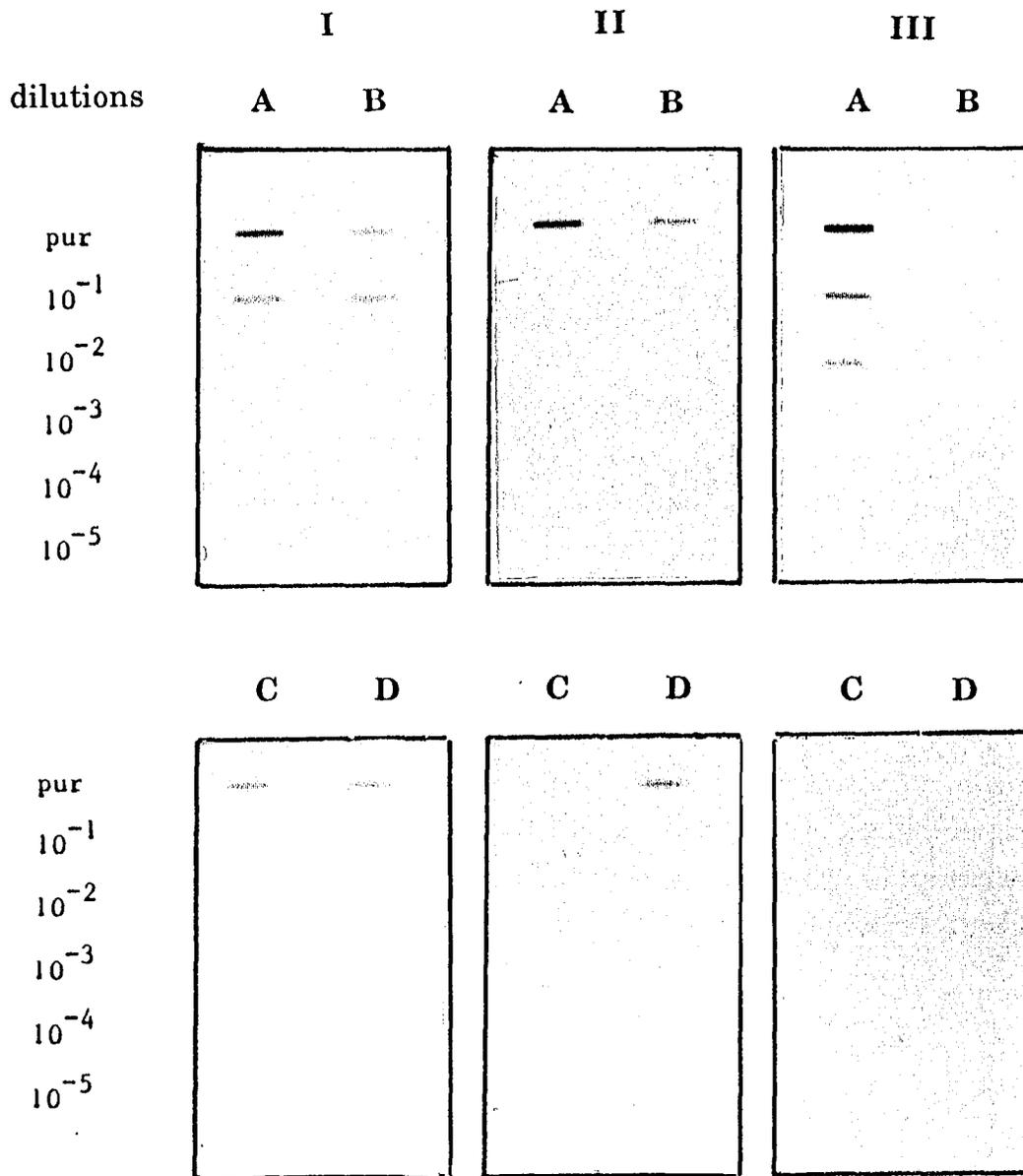


Fig. n° 24: Détection par la sonde 174 marquée à la peroxydase de l'ARN viral dans le surnageant de culture de cellules infectées.

I : échantillons non traités

II : lyse des virus par traitement au NP-40

III : acides nucléiques extraits après traitement par la protéinase K

A : BECV (échantillon non dilué : $2,1 \cdot 10^6$ UFP)

B : cellules HRT 18 non infectées

C : rotavirus (échantillon non dilué : $2,5 \cdot 10^6$ UFP)

D : TGEV (échantillon non dilué : $5 \cdot 10^5$ UFP)

En ce qui concerne le dépôt direct des échantillons, nous observons une hybridation avec les deux plus fortes concentrations de BECV.

Cependant, les cellules HRT 18 non infectées donnent également une réponse positive pour ces mêmes concentrations. Toutefois, l'observation de l'intensité du signal donné avec les échantillons non dilués permet de faire la différence entre les cellules infectées ou non. En effet, à la dilution 10^{-1} , le signal émis, identique dans les deux cas, ne peut être pris en compte. En conséquence, la limite de détection du BECV, correspondant au dépôt de l'échantillon non dilué, est de $2,1 \cdot 10^6$ UFP. De fausses réactions positives s'observent également aux plus fortes concentrations avec les suspensions de rotavirus et de TGEV.

Avec la technique de lyse des virus par le NP-40, la limite de détection du BECV en culture cellulaire est également de $2,1 \cdot 10^6$ UFP. De fausses réactions positives s'observent avec les suspensions non diluées de cellules HRT 18 non infectées et de TGEV. Cependant, l'intensité du signal est trop faible pour gêner l'interprétation de l'autoradiogramme. Les résultats obtenus avec cette technique sont peu significatifs en raison des problèmes de colmatage rencontrés pour le dépôt des échantillons sur la membrane de nitrocellulose, comme nous l'avons déjà signalé précédemment.

Comme pour les expérimentations réalisées avec la sonde radioactive, nous constatons que le procédé qui consiste, après traitement par la protéinase K, à extraire les acides nucléiques, permet d'obtenir la meilleure sensibilité.

La limite de détection du BECV, augmentée d'un facteur 100 par rapport aux deux autres procédés de traitement des échantillons, est de $2,1 \cdot 10^4$ UFP. La sensibilité est cependant 10 fois plus faible qu'avec la sonde radioactive qui donne un signal positif jusqu'à une dilution correspondant à $2,1 \cdot 10^3$ UFP.

De plus, ce procédé d'extraction des acides nucléiques avant hybridation présente l'avantage d'éviter l'apparition de faux positifs, liée sans doute à la fixation non spécifique de la peroxydase sur les protéines présentes dans les échantillons. En effet, aucun signal n'est détecté, quelle que soit la dilution, ni avec les cellules HRT 18 non infectées, ni avec les suspensions de rotavirus et de TGEV.

2.4 Application du test d'hybridation moléculaire à la recherche du BECV dans les fécès

Ce test d'hybridation moléculaire présente un intérêt diagnostique en biologie clinique. Aussi, nous avons envisagé son application potentielle à la détection du BECV dans les fécès de veau. Pour cette expérimentation, nous avons utilisé la sonde 174 marquée au ^{32}P qui, comme montré précédemment, s'est révélée plus sensible que la sonde marquée à la peroxydase.

De plus, la détection du BECV dans les fécès de veaux étant actuellement réalisée par la méthode ELISA, il était intéressant de comparer les résultats obtenus par ces deux méthodes appliquées en parallèle aux mêmes échantillons fécaux.

Selon CRUCIERE (1988), la méthode ELISA permet de détecter 5 ng de BECV. Si l'on assimile la masse moléculaire du BECV à celle du coronavirus humain HCV-OC43 qui, d'après HIERHOLZER (1976), est de $18 \pm 10^{-17}\text{g}$, et si l'on considère qu'une particule infectieuse est l'équivalent d'une particule physique, 5 ng correspondraient à 2.10^7 particules virales. Dans ce cas, la technique d'hybridation moléculaire réalisée avec la sonde radioactive devrait être 100 fois plus sensible que la technique ELISA.

Pour cette étude, trois prélèvements de fécès de veaux atteints d'entérite nous ont été fournis par le laboratoire des services vétérinaires du département de Meurthe-et-Moselle, qui a réalisé l'analyse microbiologique de ces échantillons. Celle-ci a été effectuée par méthode immunoenzymatique (TETRA KIT - Diagnostic Laboratoire LTP) permettant la mise en évidence simultanée des coronavirus, rotavirus, *Escherichia coli* K 99 et *Cryptosporidium* dans les matières fécales. Le principe du test consiste à incuber le prélèvement avec des anticorps spécifiques adsorbés sur une phase solide. La formation des immunocomplexes est révélée par des anticorps monoclonaux conjugués à la peroxydase.

Les résultats de l'analyse immunologique sont rapportés dans le tableau VII.

Ces échantillons ont été préparés, en vue de l'hybridation moléculaire, selon le protocole décrit dans le chapitre "Matériel et Méthodes". Comme pour la recherche du BECV dans le surnageant de culture cellulaire, trois types

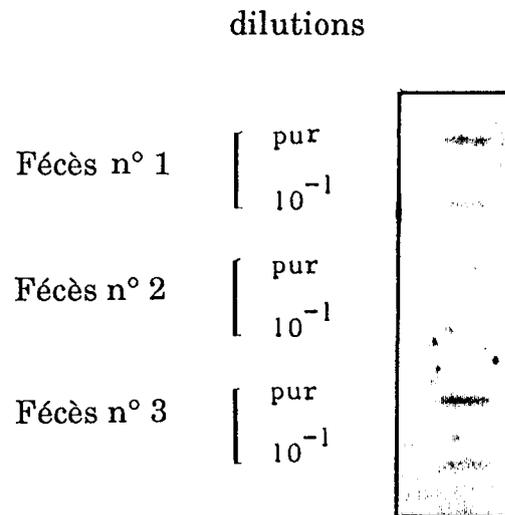


Fig. n° 25: Détection du BECV dans les fécès de veau par hybridation moléculaire avec la sonde 174 marquée au ^{32}P .

Tableau VII : Analyse par test ELISA des échantillons fécaux

	Coronavirus	Rotavirus	Cryptosporidium	E. Coli K 99
Fécès n° 1	+	-	-	-
Fécès n° 2	-	-	-	-
Fécès n° 3	+	+	-	-

de dépôts ont été réalisés :

- dépôt direct des fécès après dénaturation par chauffage.
- dépôt après lyse des particules virales par le NP-40.
- dépôt des acides nucléiques extraits après traitement par la protéinase K.

Des quantités correspondant à 10 et 1 µl de fécès ont été déposées par la technique du *slot blot* sur la membrane de nitrocellulose, puis hybridées avec la sonde 174 marquée au ^{32}P et dénaturée.

Les échantillons préparés pour la recherche directe du virus et ceux traités au NP-40 ont une consistance qui rend très problématique leur dépôt en *slot blot* par aspiration. Le colmatage presque immédiat de la membrane ne permet qu'un passage partiel des échantillons, même après dilution. Ces protocoles ne peuvent donc pas être adoptés dans le cas de prélèvements fécaux. Par conséquent, seuls les acides nucléiques extraits après traitement par la protéinase K ont été hybridés avec la sonde 174.

Les résultats de l'autoradiogramme sont présentés sur la fig. n° 25.

Un signal d'hybridation est observé pour les échantillons 1 et 3 révélant la présence du BECV. Une réponse positive pour la dilution 10^{-1} (correspondant à 1 µl de prélèvement) montre que le test est suffisamment sensible pour permettre la détection du BECV dans les fécès de veaux atteints d'entérite. Aucune hybridation n'est détectée avec l'échantillon 2, témoin négatif. On note ainsi une bonne corrélation entre les résultats obtenus par hybridation moléculaire et par immunoenzymologie.

Ces essais, bien que portant sur un nombre restreint d'échantillons, laissent à penser que la recherche du BECV dans les fécès de veaux peut être envisagée par la technique d'hybridation moléculaire.

III - DISCUSSION

Cette étude a été consacrée au développement d'un test de détection du BECV par hybridation moléculaire à l'aide d'une sonde d'ADNc.

3.1 Clonage de l'ARN génomique

Nous avons choisi de cloner l'ARNg du BECV en réalisant la synthèse d'ADNc à partir d'amorces aléatoires ou oligo dT.

Bien que le taux d'incorporation des dCTP³²P soit très élevé dans le cas des amorces aléatoires, les fragments d'ADNc synthétisés sont de taille relativement modeste. Par contre, l'allongement des chaînes d'ADNc, à partir d'une amorce oligo dT, s'est avéré nettement plus efficace, malgré l'existence de zones préférentielles d'arrêt de transcription à 1,5, 2 et 3 kb. Ces zones correspondent vraisemblablement à des structures secondaires situées le long de l'ARNg et s'observent de façon constante sur toutes les électrophorèses réalisées.

Le taux de transformation obtenu avec les plasmides recombinés est assez faible (10^2 CFU/ μ g de plasmide recombiné) en regard des taux de 10^3 à 10^4 relevés dans la littérature (FORDE - 1983b ; SAUNDERS *et al.* - 1984 ; BINNS *et al.* - 1985b). Il semble que le clonage d'un hybride ARN-ADNc soit plus difficile à réaliser que celui d'un duplex ADN-ADN obtenu après synthèse du deuxième brin d'ADNc. Cependant, le procédé que nous avons choisi présente en principe l'avantage de conserver l'intégralité de la séquence copiée (WEISSENBACH *et al.* - 1986).

Après analyse des clones Tet^R - Amp^S, la technique utilisant des amorces aléatoires s'est avérée décevante, seuls des fragments de taille inférieure à 0,3 kb ont été clonés. BINNS *et al.* (1985b), par le même procédé, ont obtenu des clones de taille comprise entre 0,6 et 3,5 kb. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les polynucléotides de petite taille, très nombreux dans le cas présent, sont statistiquement plus faciles à cloner que les grands fragments.

Les clones Tet^R - Amp^S, obtenus avec les amorces oligo dT sont davantage exploitables. Le plus grand insert obtenu mesure 2,2 kb. Le pBR322 ne permet pas l'insertion de fragments de grande taille. Les tailles maximales relevées dans la littérature pour l'IBV se situent entre 3 et 5 kb (BOURSNELL *et al.* - 1984 ; BINNS *et al.* - 1985a). Cependant, les 24 clones de taille comprise entre 1 et 2,2 kb peuvent être retenus pour la préparation de sondes de sensibilité satisfaisante.

3.2 Test d'hybridation moléculaire

Nous avons étudié les conditions d'utilisation de la technique d'hybridation moléculaire en vue de la détection du coronavirus entérique bovin.

L'hybridation moléculaire a été réalisée sur membrane de nitrocellulose, soit par dépôt manuel de l'ARN viral suivant la technique du *dot blot*, soit à

Tableau VIII : Analyse comparative des résultats obtenus avec les deux types de marquage de la sonde d'ADNc 174.

	Limite de détection	
	Marquage radioactif	Marquage enzymatique
Sensibilité	1 à 3 pg d'ARNg soit 2.10^5 génomes	100 pg d'ARNg soit 9.10^6 génomes
Spécificité	+++	++ faux positifs avec les échantillons non déprotéinisés
BECV produit en culture de cellules HRT 18		
Hybridation directe	$2,1.10^4$ UFP	$2,1.10^6$ UFP
Hybridation après lyse au NP-40	$2,1.10^5$ UFP	$2,1.10^6$ UFP
Hybridation après extraction des acides nucléiques	$2,1.10^3$ UFP	$2,1.10^4$ UFP

l'aide d'un appareil de dépôt par filtration sous vide suivant la technique du *slot blot*.

Nous avons recherché le BECV dans le surnageant de culture de cellules HRT 18 infectées et différents traitements des échantillons à hybrider ont été envisagés afin d'optimiser la détection.

Deux types de marquage de la sonde d'ADNc ont été testés :

- marquage radioactif au ^{32}P par la technique des amorces aléatoires et détection par autoradiographie.
- marquage enzymatique par couplage à la peroxydase et détection par chimiluminescence.

La sensibilité et la spécificité du test ont ainsi été définies pour chaque type de sonde.

3.2.1 Etude de la sensibilité

3.2.1.1 Influence du marquage de la sonde sur la détection du signal d'hybridation

La sonde d'ADNc 174 marquée au ^{32}P permet de détecter de très petites quantités d'ARN viral homologue, de l'ordre de 1 à 3 pg, soit approximativement 2.10^5 génomes.

Le marquage enzymatique de la sonde, couplé au système de détection ECL, ne permet pas d'atteindre la même sensibilité. Le seuil de détection, 50 fois plus élevé qu'avec la sonde radioactive, limite la détection à 100 pg d'ARN viral, soit l'équivalent de 9.10^6 génomes (tableau VIII).

Cette diminution de la sensibilité s'observe également lors de l'hybridation de la sonde avec l'ARN du BECV présent dans le surnageant de culture de cellules HRT 18 infectées. Dans ce cas, la sonde marquée à la peroxydase se montre 10 à 100 fois moins sensible que la sonde radioactive. De plus, lors de l'hybridation avec les suspensions virales, directement ou après lyse par le NP-40, le marquage enzymatique, contrairement au marquage radioactif, entraîne l'apparition de faux positifs, ce qui contribue à élever le seuil de détection. Dans ce cas, la sonde se fixe vraisemblablement, sans sélectivité, sur les substances biologiques contenues dans l'échantillon. En

effet, ce phénomène est évité par extraction des acides nucléiques après traitement par la protéinase K.

3.2.1.2 Préparation des échantillons à hybrider

Nous avons montré que la détection directe du BECV dans le surnageant de culture de cellules HRT 18, après simple dénaturation par la chaleur, est possible. La littérature fait état d'observations similaires. C'est ainsi que FLORES *et al.* (1983) ont constaté que le prétraitement des échantillons biologiques avait peu d'incidence sur la détection du rotavirus qui peut être détecté directement après dénaturation. Ce protocole est simple et rapide. Il permet d'éviter la préparation du matériel et des tampons nécessaires à la manipulation délicate des ARN et, en dépit de ces précautions, d'exposer le génome viral à l'éventuelle action des RNases.

Cependant, comme nous l'avons constaté au cours des essais préliminaires et confirmé par la suite de ce travail, la détection est nettement optimisée après traitement par la protéinase K, puis dépôt des acides nucléiques extraits et purifiés (tableau VIII), bien qu'une partie du matériel nucléique soit perdue au cours de cette étape d'extraction. Les protéines et macromolécules, pouvant entrer en compétition avec l'ARN viral au niveau des sites d'adsorption de la membrane de nitrocellulose, sont éliminées et l'accessibilité de la sonde à l'ARN est ainsi facilitée.

L'hybridation moléculaire après lyse de particules virales par traitement au NP-40 présente l'avantage d'éviter l'extraction des acides nucléiques. Toutefois, ce procédé donne des résultats très médiocres, contrairement à ceux de SHOCKLEY *et al.* (1987). Nous avons rencontré des difficultés pour effectuer le dépôt en *slot blot* des échantillons les plus concentrés dont la viscosité entraîne un colmatage de la membrane de nitrocellulose. Ceci peut expliquer que la détection soit inférieure à celle du dépôt direct d'une quantité équivalente de suspension virale.

3.2.1.3 Mode de dépôt des échantillons

L'utilisation de l'appareil de dépôt en *slot blot* par filtration sous vide a contribué à améliorer la sensibilité de la technique d'hybridation moléculaire par une meilleure concentration de l'ARN cible sur la membrane de

nitrocellulose. De plus, ce procédé, par sa rapidité, facilite le traitement en série des échantillons. Cependant, des problèmes de colmatage, non résolus même en diluant fortement les échantillons, limitent son utilisation.

3.2.1.4 Essai d'amplification du signal de détection avec un mélange de plusieurs sondes

L'utilisation d'un mélange des sondes 174 et 160 codant pour les protéines de la nucléocapside N et de la matrice M, ainsi que PG 7-8, codant pour la protéine des peplomères S, n'a pas permis d'amplifier de façon significative le signal d'hybridation. Il est possible que la présence de zones de recouvrement de séquences entre les inserts 174 et 160 favorise le phénomène de réassociation des fragments d'ADN en solution, au détriment de l'hybridation sur la membrane. Cette réassociation doit être plus facile avec la sonde radioactive, le marquage ne modifiant pas la structure de l'ADN, qu'avec la sonde couplée à la peroxydase. Ceci permettrait d'expliquer que, bien que discrète, l'amplification du signal de détection pour les concentrations les plus faibles soit plus marquée avec la sonde enzymatique.

3.2.2 Etude de la spécificité

La sonde d'ADNc 174, dont la séquence nucléotidique correspond au gène de la matrice M et à la plus grande partie de celui de la nucléocapside N, ne s'hybride pas avec les acides nucléiques hétérologues comme l'ARN du rotavirus ou les acides nucléiques des cellules HRT 18. Elle permet l'identification spécifique de la souche F15 du BECV et cette reconnaissance doit pouvoir s'étendre à la souche MEBUS dont la séquence nucléotidique, dans cette région du génome, présente un haut degré d'homologie, voisin de 100 %, avec celle de la souche F15.

Cette reconnaissance ne s'étend pas à l'ensemble des membres de la famille des *Coronaviridae*, comme le montre l'absence d'hybridation avec l'ARN du TGEV. Ceci s'explique aisément par le faible pourcentage d'homologie, inférieur à 50 %, existant entre les séquences nucléotidiques des gènes codant pour les protéines N et M de ces deux coronavirus. Pour les mêmes raisons, la sonde ne devrait pas vraisemblablement détecter l'ARN de

Tableau X : Etude comparée des techniques de marquage et d'hybridation moléculaire en fonction du type de sonde.

	Marquage radioactif	Marquage enzymatique
Marqueur	^{32}P	Péroxydase
Méthode de marquage	Technique d'amorçage au hasard 100-200 ng d'ADN 30 min à 37°C ou 1 à 3 h à T.O.	Couplage par l'intermédiaire du glutaraldéhyde 200 ng d'ADN 10 min à 37°C
Quantité d'ADN utilisée	1 ng/cm ² de membrane	5 ng/cm ² de membrane
Préhybridation	1 à 2 h à 42°C	10 min à 42°C
Hybridation	1 nuit à 42°C sous agitation formamide 50 %	1 nuit à 42°C sous agitation urée 6 M
Lavages	55°C force ionique décroissante	42°C urée 6 M faible force ionique
Détection	Autoradiographie 24 à 72 h à - 80°C	Chimiluminescence 1 à 5 min
Conservation des sondes marquées	Quelques jours à - 20°C	6 mois en glycérol 50 % à - 20°C

l'IBV (KAPKE et BRIAN - 1986 ; LAPPS *et al.* - 1987 ; SHOCKLEY *et al.* - 1987) (tableau IX). Cette constatation est à relier à la différence observée sur le plan antigénique entre ces coronavirus appartenant à des groupes différents.

BECV - F15	MHV	TGEV	IBV
gène de la nucléocapside N	72 %	37 %	43 %
gène de la matrice M	79 %	51 %	35 %

Tableau IX : Pourcentage d'homologie des séquences nucléotidiques des gènes codant pour les protéines N et M du BECV vis-à-vis de celles d'autres coronavirus

Par ailleurs, SHOCKLEY *et al.* (1987) ont montré qu'une sonde d'ADNc correspondant à l'extrémité 3' du génome ne reconnaissait pas de façon uniforme tous les coronavirus au sein du même groupe antigénique. Ces auteurs constatent une hybridation avec le génome du HEC et du HCV OC43 mais pas avec le MHV. Ceci est surprenant quand on considère que les séquences nucléotidiques du MHV et du BECV présentent plus de 70 % d'homologies dans cette région du génome (PFLEIDERER *et al.* - 1986 ; SPAAN *et al.* - 1988) (tableau IX).

Ainsi, l'utilisation de la technique d'hybridation moléculaire pourrait être envisagée pour l'identification des différents groupes antigéniques au sein de la famille des *Coronaviridae*. Il devrait également être possible, par le choix judicieux des séquences nucléotidiques, de faire une discrimination entre les membres d'un même groupe antigénique, comme le montre l'absence d'hybridation avec l'ARN du MHV. Une connaissance plus complète du génome des différents coronavirus devrait faciliter une telle étude.

3.2.3 Intérêt comparé de l'utilisation des sondes enzymatiques et radioactives

Comme nous l'avons constaté, le test de détection utilisant la sonde radioactive présente une meilleure sensibilité que le test enzymatique. Toutefois, la sonde marquée à la peroxydase et couplée au système ECL justifie son emploi par certains critères. Ainsi, nous avons comparé les avantages et les inconvénients des deux types de sonde, tant pour l'étape de marquage que pour l'étape d'hybridation (tableau X).

Le marquage enzymatique permet d'éviter tous les problèmes liés à la manipulation des produits radioactifs. Il se caractérise par sa facilité d'emploi et par sa rapidité aussi bien au cours du marquage que lors de l'étape d'hybridation et de détection. Cependant, le signal ECL est d'interprétation plus délicate que le signal autoradiographique. Il engendre un bruit de fond uniforme de nature à perturber la détection lorsque les dépôts sur la membrane de nitrocellulose sont réalisés en tampon de force ionique élevée. Un temps d'exposition de 1 à 2 min s'est révélé suffisant afin de minimiser ce phénomène et permettre une détection optimale.

3.2.4 Intérêt potentiel en diagnostic

Nous avons montré, à partir de quelques échantillons fécaux, que la technique d'hybridation moléculaire, réalisée avec la sonde 174 radioactive, était suffisamment sensible pour permettre la détection du BECV dans les féces de veaux atteints d'entérite.

Cette détection est possible à partir de très petites quantités de féces, de l'ordre de 1 μ l. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par SHOCKLEY *et al.* (1987) pour la détection du TGEV dans des féces de porcs inoculés expérimentalement, ou par FLORES *et al.* (1983) pour la recherche du rotavirus dans les selles d'enfants atteints de gastroentérites.

Toutefois, nous avons constaté qu'un traitement des échantillons par la protéinase K, suivi de l'extraction des acides nucléiques avant dépôt, était nécessaire afin d'éviter le colmatage de la membrane de nitrocellulose. De plus, dans l'optique d'un marquage non radioactif de la sonde, un tel traitement semble indispensable afin d'éviter, autant que possible, l'apparition de faux positifs, comme nous l'avons montré avec le système de marquage ECL.

L'analyse d'un plus grand nombre de prélèvements devrait nous permettre, ultérieurement, de comparer la sensibilité de la technique d'hybridation moléculaire avec d'autres procédés de détection utilisés en diagnostic courant, en particulier avec les techniques d'immunodétection.

RECHERCHE DU CORONAVIRUS ENTERIQUE BOVIN DANS LE MILIEU HYDRIQUE

A ce jour, aucune étude n'a été publiée concernant le rôle joué par l'eau et l'environnement dans l'apparition des entérites à coronavirus, sans doute en raison des difficultés rencontrées pour la détection de ce virus dans des milieux où il est présent en faible quantité. Aussi, sa recherche nécessite au préalable une étape de concentration destinée à rassembler, sous un petit volume, les particules virales initialement dispersées dans l'eau.

Dans ce but, nous avons testé deux techniques de concentration :

- un procédé basé sur le principe de l'immunoaffinité et jusqu'alors non appliqué dans le domaine de la virologie des eaux.
- un procédé physique d'adsorption-élution sur poudre de verre.

La détection sera ensuite envisagée par inoculation à un système cellulaire sensible afin de révéler leur pouvoir infectieux, ainsi que par hybridation moléculaire.

I - DETECTION DU BECV DANS LE MILIEU HYDRIQUE APRES CONCENTRATION PAR IMMUNOAFFINITE

Les immunoadsorbants sont couramment utilisés pour la purification et des anticorps ou des antigènes (AVRAMEAS et TERNYNCK - 1969 ; GUESDON et AVRAMEAS - 1976). Ainsi, l'anticorps (ou l'antigène) immobilisé par liaison covalente et irréversible sur un support activé permet de fixer de façon spécifique l'antigène (ou l'anticorps) contre lequel il est dirigé. Le complexe antigène-anticorps est ensuite dissocié par une technique de désorption non spécifique faisant intervenir des modifications du milieu telles que des variations de pH ou de force ionique (BORDENAVE - 1977). Après régénération, l'immunoadsorbant peut être réutilisé.

Nous avons envisagé d'appliquer ce principe à la recherche des coronavirus dans le milieu hydrique en préparant un immunoadsorbant avec

des anticorps spécifiquement dirigés contre les sites antigéniques de la particule virale.

Cette étude s'est déroulée en deux étapes :

1 - l'obtention de l'immunoabsorbant comprenant :

- . le choix du support nécessaire à la réalisation de l'immunoabsorbant
- . la purification d'un stock d'anticorps monoclonaux anti-coronavirus bovin
- . la préparation de l'immunoabsorbant : activation du support et couplage des anticorps

2 - les essais de concentration sur l'immunoabsorbant du BECV dispersé dans le milieu hydrique.

1.1 Obtention de l'immunoabsorbant

1.1.1 Choix de la matrice

Les techniques de chromatographie d'affinité sont habituellement réalisées sur colonne. Cependant, la recherche des virus dans le milieu hydrique suppose le maniement de grands volumes d'eau qu'il est inconcevable, dans la pratique, de faire passer sur colonne, leur débit étant faible et le risque de colmatage important. Il est donc nécessaire de mettre au point un procédé permettant de maintenir l'immunoabsorbant en suspension dans l'eau à analyser. Le problème se pose alors du choix du support qui doit répondre à plusieurs critères :

- il doit être constitué de billes petites et nombreuses afin de favoriser au maximum le contact entre les virus et l'immunoabsorbant.
- il doit pouvoir être activé afin de permettre la fixation des anticorps par liaison covalente.
- ces billes étant dispersées dans un grand volume d'eau, il est nécessaire de pouvoir les rassembler facilement à la fin de la phase d'adsorption, sans perte de matériel.

Les supports fréquemment utilisés en chromatographie d'affinité, tels que le sépharose ou un mélange agarose-polyacrylamide, permettent le couplage aisé des anticorps. De plus, leurs taille et densité assurent une bonne répartition de l'immunoabsorbant dans l'échantillon d'eau. Toutefois, la récupération du gel après dispersion est difficilement envisageable.

Le Magnogel permet de répondre à cet impératif. Il s'agit d'un gel magnétique permettant d'effectuer facilement les réactions d'affinité en suspension (GUESDON et AVRAMEAS - 1977). Les billes de Magnogel, d'un diamètre compris entre 60 et 140 μm , sont constituées d'un gel mixte d'agarose et de polyacrylamide dans lequel sont emprisonnés de petits cristaux de magnétite.

Ce gel magnétique, mis en suspension, peut être facilement séparé du milieu dans lequel il se trouve dispersé par immobilisation contre les parois du récipient à l'aide d'un aimant. Le phénomène peut aisément être contrôlé par simple observation à l'oeil nu, les billes étant colorées en noir par la présence d'oxyde de fer.

Ainsi, le Magnogel est fréquemment utilisé pour des dosages immunoenzymatiques, radioimmunologiques ou d'immunofluorescence car son emploi permet de simplifier les manipulations en supprimant les nombreuses centrifugations qu'implique ordinairement le lavage des gels.

En plus de ses propriétés magnétiques intéressantes, le Magnogel présente l'avantage de pouvoir être activé aisément en utilisant les procédés de couplage soit de l'agarose, soit du polyacrylamide. Notamment, il est possible de l'activer par le glutaraldéhyde (GUESDON *et al.* - 1978). Ce support a donc été choisi pour l'expérimentation.

1.1.2 Purification d'anticorps monoclonaux anti-coronavirus entérique bovin

La conception d'une technique de concentration des virus, à partir du milieu hydrique par immunoaffinité nécessite la production de grandes quantités d'anticorps spécifiques. Depuis la mise au point de la technique d'hybridation cellulaire par KOHLER et MILSTEIN (1975), il est possible de produire en quantité illimitée des anticorps dits "monoclonaux" dirigés contre un déterminant antigénique donné. Ces anticorps présentent l'avantage de constituer des populations homogènes et monospécifiques, contrairement aux populations d'anticorps obtenues à partir d'immunsérums traditionnels. Utilisant les possibilités offertes par cette technologie, nous avons envisagé la préparation d'un immunoadsorbant avec des anticorps monoclonaux dirigés contre les déterminants antigéniques du BECV.

Tableau XI : Spécificité des anticorps monoclonaux anticoronavirus entérique bovin utilisés

Hybridomes	Classe des Immunoglobulines produites	Immunofluorescence indirecte			Séro-neutralisation		Activité anti-GP 125
		BECV			BECV		
		G 110	F 15	NCDCV	G 110	F 15	
C ₆	IgG _{2a}	+	+	+	+	+	+
I ₂₀	IgG _{2a}	+	+	+	-	-	+
J ₈	IgG _{2a}	+	+	+	+	+	+

1.1.2.1 Origine des anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux utilisés nous ont été fournis par VAUTHEROT (INRA - Jouy-en-Josas).

Afin d'élargir le spectre de spécificité de l'immunoabsorbant, il a semblé préférable d'utiliser un cocktail d'anticorps monoclonaux. Les caractéristiques des immunoglobulines secrétées par les hybridomes sélectionnés pour la réalisation de ce travail sont rassemblées dans le tableau XI (ROSETO *et al.* - 1982 ; VAUTHEROT *et al.* - 1984).

Ces immunoglobulines appartiennent toutes à la classe des IgG_{2a}. Elles réagissent positivement en immunofluorescence indirecte vis-à-vis des souches françaises G 110 et F15 du BECV, ainsi que vis-à-vis de la souche américaine NCDCV. Toutes possèdent une spécificité anti-GP125 (glycoprotéine constitutive des spicules - M_r 125 000). De plus, les anticorps produits par les hybridomes C₆ et J₈ sont neutralisants vis-à-vis des coronavirus G 110 et F 15.

Des quantités importantes de ces anticorps monoclonaux ont été obtenues par inoculation des hybridomes à des souris Balb/c (ROSETO *et al.* - 1982). Les liquides d'ascite ainsi obtenus ont servi de base pour la préparation d'anticorps monoclonaux purifiés.

1.1.2.2 Purification des anticorps monoclonaux

Etant donné l'hétérogénéité des liquides d'ascite, il est souhaitable de séparer les anticorps monoclonaux des autres constituants présents dans l'ascite avant de les utiliser pour la réalisation d'un immunoabsorbant.

L'isolement à l'état pur et avec de bons rendements d'immunoglobulines de souris est aléatoire par les méthodes chromatographiques classiques. Cependant, les travaux de différents chercheurs (EY *et al.* - 1978 ; CHALON *et al.* - 1979 ; MACKENZIE *et al.* - 1978) ont montré que certaines classes et sous-classes d'immunoglobulines du sérum ou d'ascite de souris pouvaient être purifiées par chromatographie d'affinité sur colonne de protéine A-sépharose. La protéine A (isolée de la paroi cellulaire de *Staphylococcus aureus*) présente la propriété de pouvoir se combiner au fragment Fc des IgG provenant de différentes espèces de mammifères (KRONVALL *et al.* - 1970) et notamment de la souris. Ainsi, les IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} et IgG₃ de souris se fixeraient sur la

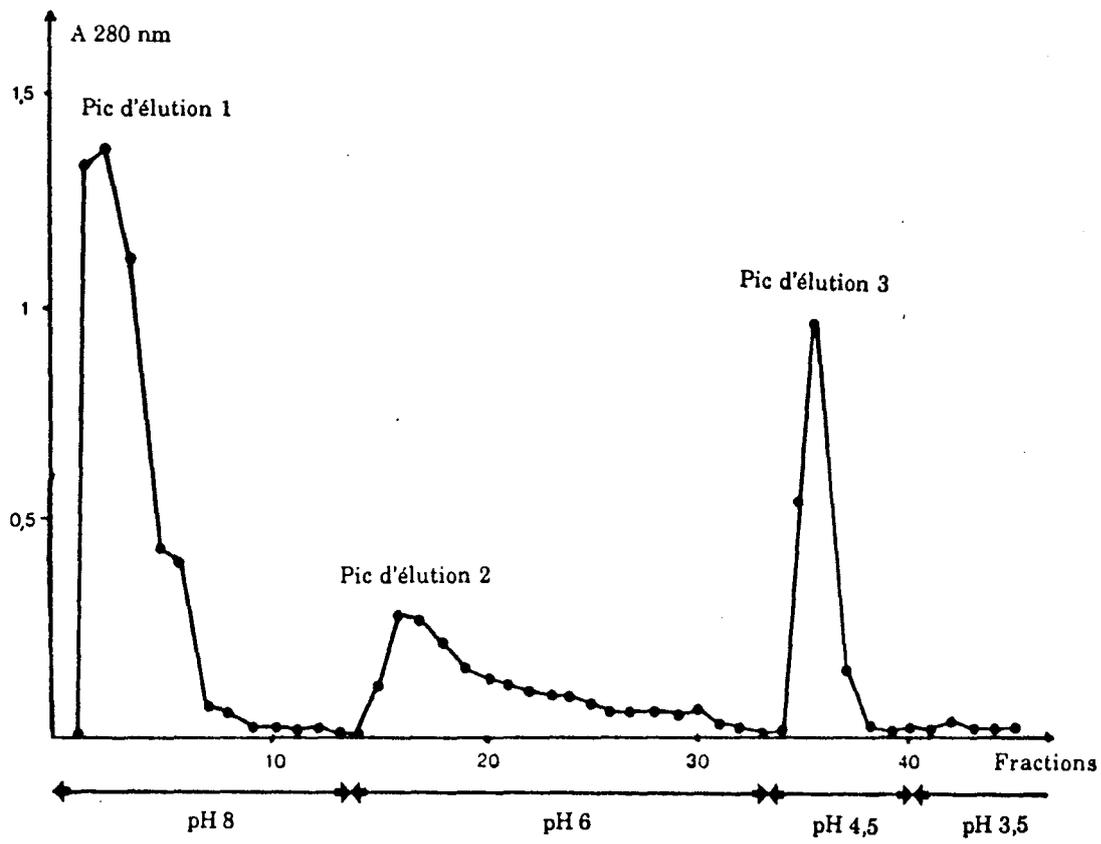


Fig. n° 26 : Profil de purification de l'ascite I₂₀ sur protéine A - sépharose.

protéine A avec, cependant, des degrés différents d'affinité (LANGONE - 1982). En revanche, les IgM, IgA, IgE ne se combineraient pas ou peu à la protéine A

Les anticorps monoclonaux en notre possession étant des IgG_{2a}, nous les avons purifiés par ce procédé. Les liquides d'ascite ont tout d'abord subi une prépurification par précipitation au sulfate d'ammonium à demi-saturation.

Après ajustement à pH 8, la purification a été réalisée par passage sur colonne de protéine A-sépharose selon la technique proposée par EY *et al.* (1978) dont le protocole est décrit dans le chapitre "Matériel et Méthodes". Selon ces auteurs, dans des conditions de non saturation de la colonne, il est théoriquement possible de fixer 20 mg d'IgG/ml de gel. Toutes les IgG se fixent par leur fragment Fc à la protéine A, les autres constituants de l'ascite étant éliminés dans l'effluent. A l'issue de la fixation, la colonne est lavée et les IgG sont éluées successivement à pH 6, pH 4,5 et finalement à pH 3,5. En effet, EY *et al.* ont montré qu'en faisant varier le pH de l'éluion, il était possible d'éluier séparément et d'obtenir ainsi à l'état pur les différentes sous-classes d'IgG. Ainsi, les IgG₁ seraient éluées à pH compris entre 6 et 7, les IgG_{2a} à pH compris entre 5 et 4,5 et les IgG_{2b} à pH compris entre 4 et 3,5.

Ce procédé de purification a tout d'abord été testé sur une ascite contenant les anticorps monoclonaux I₂₀ avant d'être appliqué systématiquement à l'ensemble des ascites. Un contrôle des différentes étapes de la purification, puis de l'activité biologique des anticorps monoclonaux ainsi isolés, a été réalisé pour chaque type d'ascite.

Nous présentons ici, à titre d'exemple, les résultats obtenus pour la purification d'une fraction aliquote (2 ml) d'une ascite I₂₀.

1.1.2.2.1 Profil de purification d'une ascite I₂₀

Le profil d'éluion obtenu (fig. n° 26) met en évidence trois pics d'absorption de la lumière en UV. Le matériel biologique non retenu par la protéine A est rassemblé dans l'effluent et le liquide de lavage de la colonne à pH 8 (pic d'éluion 1). Quant au matériel fixé sur la protéine A, en principe des IgG, une petite quantité est éluée à pH 6 (pic d'éluion 2) et la plus grande partie à pH 4,5 (pic d'éluion 3). Aucune protéine n'est éluée à pH 3,5 ou 3.

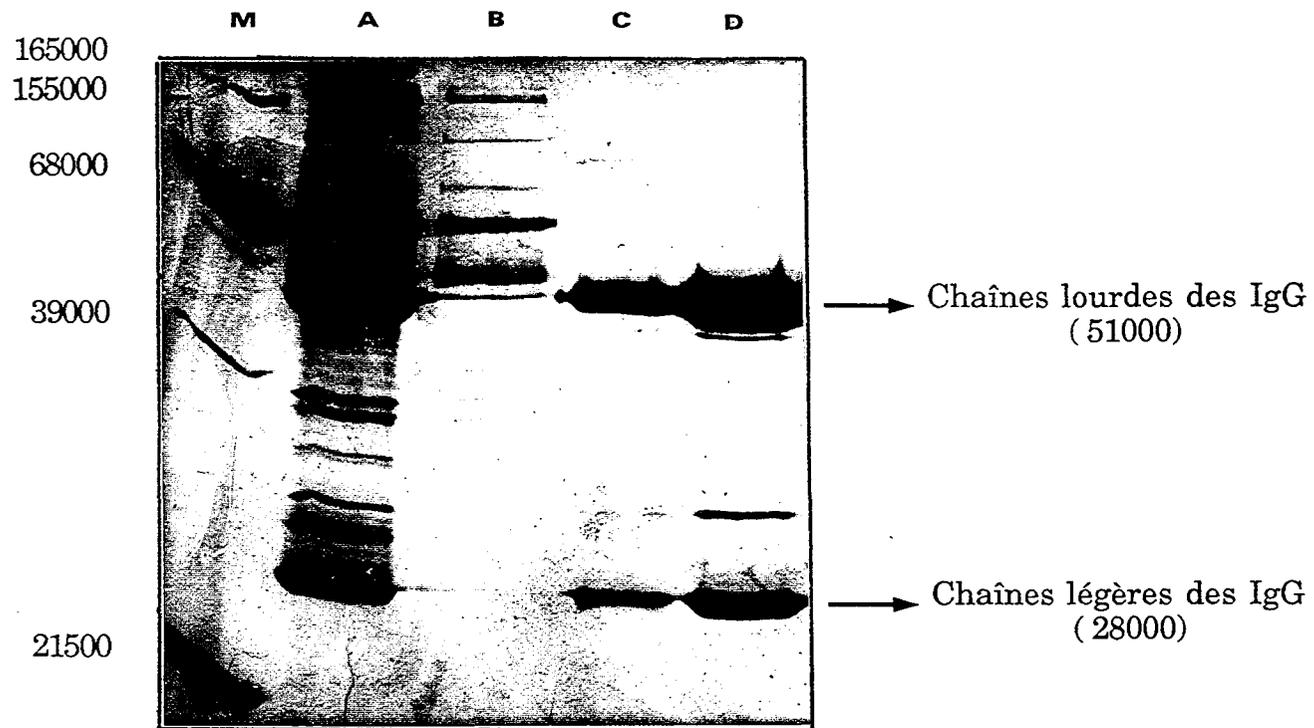


Fig. n° 27 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide - SDS des fractions obtenues au cours de la purification des IgG présentes dans une ascite I₂₀.

- M : marqueurs de Mr
- A : ascite I₂₀ prépurifiée diluée au 1/10
- B : pic d'élution 1 (pH 8)
- C : pic d'élution 2 (pH 6)
- D : pic d'élution 3 (pH 4,5)

Après concentration (2 mg/ml) et dialyse de l'ensemble des fractions correspondant à chaque pic d'élution, différents tests ont été envisagés. Il est en effet indispensable de :

- vérifier que toutes les IgG se sont bien fixées sur la protéine A et que le pic d'élution 1 n'en contient pas.
- contrôler que les IgG ainsi isolées sont pures et qu'elles ont conservé leur activité biologique spécifique vis-à-vis du BECV.

1.1.2.2 Contrôle de qualité des IgG purifiées

Trois contrôles ont été effectués :

- contrôle de la pureté des IgG obtenues
- caractérisation de la sous-classe à laquelle elles appartiennent
- contrôle de leur activité biologique

a) Contrôle de pureté

Le degré de purification des immunoglobulines a été évalué par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS, réalisée dans des conditions dénaturantes et suivie d'une coloration au nitrate d'argent, selon le protocole décrit dans le chapitre "Matériel et Méthodes".

L'électrophorégramme de l'ascite prépurifiée, diluée au 1/10, ainsi que des différentes fractions d'élution obtenues après purification sur protéine A-sépharose, est présenté sur la fig. n° 27.

Il est ainsi possible de constater que, bien que prépurifiée, avant passage sur protéine A-sépharose, l'ascite est encore fortement chargée en matériel protéique varié (électrophorégramme A).

En revanche, les électrophorégrammes C et D, correspondant respectivement aux liquides d'élution à pH 6 (pic d'élution 2) et 4,5 (pic d'élution 3), présentent essentiellement deux bandes protéiques majeures correspondant aux chaînes lourdes et légères des IgG. Il est à remarquer que le pic d'élution 3 est nettement plus riche en IgG que le pic 2, comme le laissait supposer la courbe d'enregistrement d'absorbance. Ainsi, la pureté des IgG isolées à pH 6 et 4,5 est pratiquement voisine de 100 %, la quasi totalité du matériel protéique autre que les IgG étant éliminée dans l'effluent et le liquide de lavage de la colonne à pH 8 (pic d'élution 1 - électrophorégramme B).

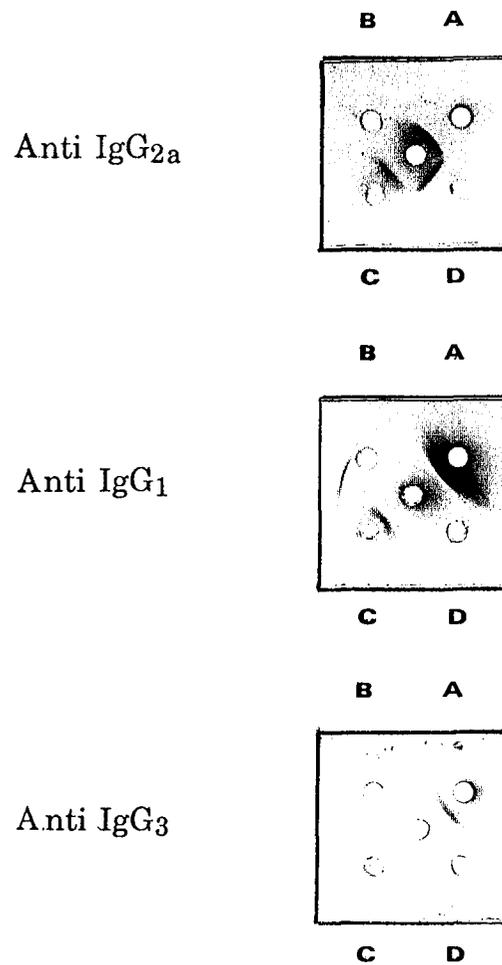


Fig. n° 28 : Caractérisation des IgG isolées après purification sur protéine A - sépharose par double diffusion en milieu gélifié.

A : ascite prépurifié I₂₀
 B : pic d'élution 1 (pH 8)
 C : pic d'élution 2 (pH 6)
 D : pic d'élution 3 (pH 4,5)

Le rendement de la technique est donc satisfaisant puisque pratiquement aucune trace d'IgG ne peut être détectée dans l'effluent à pH 8. Toutefois si, dans les conditions expérimentales précitées, toutes les IgG se fixent sur la protéine A, nous ne pouvons pas affirmer qu'elles sont bien éluées en totalité à pH acide. Nous pouvons cependant préciser qu'il est possible d'utiliser une même colonne de protéine A-sépharose 20 fois de suite sans observer la moindre baisse du rendement d'adsorption.

b) Caractérisation des IgG purifiées

La sous-classe des IgG isolées a été déterminée par la technique de précipitation par double diffusion en milieu gélifié, selon la méthode d'OUCHTERLONY.

Une fraction aliquote de l'ascite prépurifiée, ainsi que des différents pics d'élution obtenus après purification sur protéine A-sépharose, a été mise en présence des anticorps anti-IgG de souris des différentes sous-classes : anti-IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃.

Les arcs de précipitation obtenus sont présentés sur la fig. n° 28.

Conformément à notre attente, des IgG_{2a} ont été identifiées dans l'ascite prépurifiée ainsi que dans la fraction éluée à pH 4,5 (pic d'élution 3), mais également en faible quantité dans celle éluée à pH 6 (pic d'élution 2). L'effluent de la colonne à pH 8 (pic d'élution 1) n'en contient pas, ce qui confirme les observations faites après électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS.

Outre les IgG_{2a} attendues, des IgG₁ ont été mises en évidence dans l'ascite prépurifiée ainsi que dans le liquide d'élution à pH 6 (pic d'élution 2), conformément aux travaux de EY *et al.* (1978).

Des IgG₃ ont également pu être identifiées dans l'ascite avant purification mais ne se retrouvent dans aucune fraction d'élution. Il est possible que leur concentration soit insuffisante pour permettre leur détection après dilution, à moins que leur élution ne soit progressive ? L'élution des IgG₃ en fonction du pH n'est pas envisagée par EY *et al.* D'autres auteurs réalisant l'élution avec un gradient de thiocyanate de sodium (MACKENZIE *et al.* - 1978 ; CHALON *et al.* - 1979) indiquent que, dans ces conditions, les IgG₃ s'éluent en dernier lieu, après les IgG_{2b}.

Aucune immunoglobuline de sous-classe IgG_{2b} n'a été décelée en accord avec le profil de purification obtenu qui montre l'absence d'élution de toute protéine à pH 3,5, pH d'élution des IgG_{2b}.

Tableau XII : Contrôle de l'activité biologique des IgG purifiées par immunofluorescence indirecte (IFI) et ELISA.

	titre en IFI	Titre en ELISA
Ascite I ₂₀ prépurifiée	1.10^4	$1,6.10^5$
Pic d'éluion 1 (pH 8)	10	0
Pic d'éluion 2 (pH 6)	$6,4.10^2$	1.10^4
Pic d'éluion 3 (pH 4,5)	$2,56.10^3$	4.10^4

c) Contrôle de l'activité biologique des IgG purifiées

L'activité biologique spécifique des IgG purifiées a été testée vis-à-vis du BECV souche G110 d'une part, par immunofluorescence indirecte et, d'autre part, par la technique ELISA, selon le protocole décrit dans le chapitre "Matériel et Méthodes" (VAUTHEROT *et al.* - 1981).

Les titres obtenus tant en immunofluorescence indirecte (IFI) qu'en ELISA, avec l'ascite prépurifiée ainsi qu'avec les différentes fractions éluées à pH 8, 6 ou 4,5, sont rassemblés dans le tableau XII.

Nous constatons une bonne corrélation entre les résultats obtenus en IFI et par la technique ELISA bien que cette dernière méthode paraisse plus sensible.

L'absence quasi totale d'activité anti-coronavirus dans l'effluent à pH 8 confirme, comme l'a montré l'électrophorégramme, que toutes les IgG se fixent sur la protéine A.

Les titres des fractions éluées à pH 6 et 4,5 indiquent la présence d'immunoglobulines spécifiques du BECV et permettent de confirmer que, si la majorité des IgG_{2a} sont éluées à pH 4,5, une faible proportion d'entre elles le sont à pH 6. Ces résultats montrent également que l'activité biologique spécifique de ces immunoglobulines n'est pas altérée par passage sur colonne de protéine A-sépharose.

En conclusion, l'analyse de l'électrophorégramme, complétée par la caractérisation des IgG isolées dans chaque fraction d'élution après purification par passage sur colonne de protéine A-sépharose, montre que la totalité des anticorps monoclonaux de classe IgG_{2a} contenus dans l'ascite de souris se fixent sur la protéine A. Les constituants autres que les immunoglobulines sont éliminés dans l'effluent de la colonne à pH 8. Les IgG_{2a} sont éluées à l'état pur à pH 4,5. Une petite proportion cependant, éluée à pH 6, se trouve contaminée par des IgG₁. Pour cette raison, nous n'avons retenu que les fractions éluées à pH 4,5.

Les titres en anticorps obtenus au cours des tests immunologiques (IFI et ELISA) montrent que l'activité biologique des immunoglobulines purifiées n'est pas altérée par la purification.

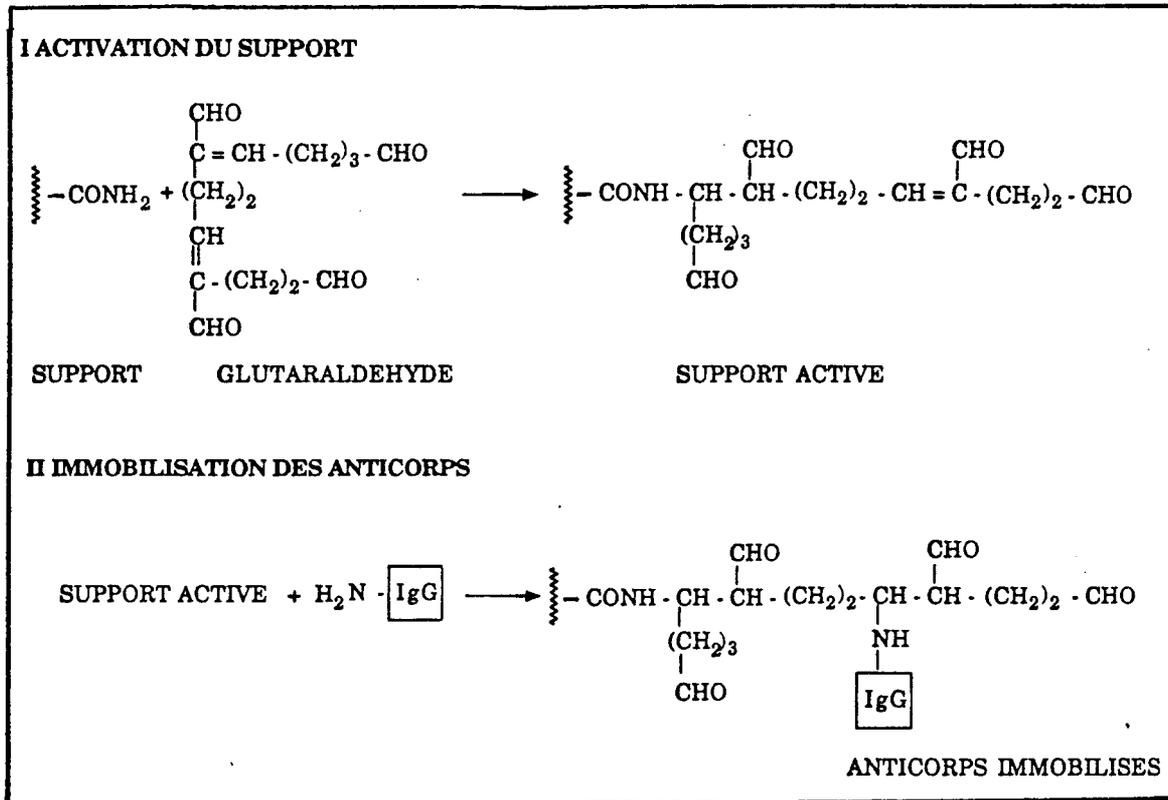


Fig. n° 29 : Schéma réactionnel de l'immobilisation des anticorps sur le Magnogel-AcA 44 par couplage au glutaraldéhyde.

Ainsi, ce protocole de purification a été appliqué à l'ensemble des ascites à traiter. Le rendement moyen de purification nous a permis d'obtenir 2,5 mg d'IgG_{2a} purifiées par ml d'ascite, la production variant de 1 à 5 mg/ml suivant les ascites.

1.1.3 Obtention de l'immunoadsorbant

Elle consiste à immobiliser les anticorps (ou ligand) sur le support par l'intermédiaire d'un agent de couplage.

Le ligand utilisé a été constitué par :

- soit un mélange équimoléculaire des anticorps monoclonaux C₆, I₂₀ et J₈ purifiés, à la concentration de 5 mg d'IgG/ml de Magnogel.
- soit un mélange des ascites contenant ces mêmes anticorps mais simplement prépurifiés par précipitation au sulfate d'ammonium et employées à raison de 5 mg de protéines/ml de gel.

Le choix du support, discuté précédemment, nous a amené à employer du Magnogel-AcA 44 déjà préactivé au glutaraldéhyde.

Cet agent de couplage réagit sur les fonctions amides du polyacrylamide, puis avec les anticorps selon le schéma réactionnel indiqué sur la fig. n° 29. Le glutaraldéhyde présente l'avantage de permettre un couplage à un pH voisin de la neutralité par l'intermédiaire de liaisons très stables, que ce soit par une réaction d'addition de Michael ou par formation d'une base de Schiff (AVRAMEAS et TERNYNCK - 1969 ; WESTON et AVRAMEAS - 1971 ; MONSAN *et al.* - 1975). D'autre part, il constitue, par aldonisation, des oligomères conduisant à la formation de bras de longueur variable (n variant de 0 à 3) présentant l'avantage d'éloigner le ligand de la matrice.

Le couplage du gel activé avec les anticorps monoclonaux s'est déroulé en 4 étapes dont les détails techniques sont décrits dans le chapitre "Matériel et Méthodes". Ce procédé nous a permis de fixer en moyenne 2 mg d'anticorps monoclonaux purifiés/ml de Magnogel ou 3 mg de protéines/ml de gel dans le cas d'ascites prépurifiées.

Tableau XIII : Concentration du BECV par passage sur immunoabsorbant.
Elution par l'eau distillée ou en tampon glycine pH acide.

A : Immunoabsorbant préparé avec des anticorps monoclonaux purifiés.
B : Immunoabsorbant préparé avec des ascites prépurifiées.

		Elution par l'eau distillée		Elution en tampon glycine pH 2,8	
		A	B	A	B
ADSORPTION	Inoculum viral en UFP	$1,54.10^8$	$1,54.10^8$	$1,2.10^8$	$1,2.10^8$
	Rendement d'adsorption en %	79	86	83	94
ELUTION	Elution des virus - UFP - rendement en %	0 0	24 ≈ 0	$1,68.10^4$ 0,01	$1,95.10^6$ 1,7
	Rendement d'adsorption- élution en %	0	≈ 0	0,01	1,6
	Présence de virus en microscopie électronique	non détectée	non détectée	non détectée	nombreuses particules virales très abîmées

1.2 Concentration des coronavirus par immunoaffinité

Cette étude a eu pour but l'isolement du BECV, à partir d'échantillons d'eau expérimentalement contaminés, à l'aide d'un immunoadsorbant magnétique dispersé dans ces échantillons.

Pour ce faire, il était nécessaire d'analyser successivement :

- les conditions de fixation spécifique du BECV sur l'immunoadsorbant par formation d'un complexe Ag-Ac.
- les conditions d'élution permettant la dissociation du complexe Ag-Ac et la récupération des virus isolés ainsi que leur caractérisation.

Le protocole détaillé des expérimentations est décrit dans le chapitre "Matériel et Méthodes".

1.2.1 Fixation du BECV sur l'immunoadsorbant

Cette étude a été réalisée en se plaçant dans des conditions optimales pour effectuer une réaction d'affinité en suspension, le gel magnétique devant représenter 1/5 à 1/20 du volume total de l'échantillon. Ainsi, 3 ml d'immunoadsorbant ont été mis en suspension dans 20 ml de PBS contaminés par du BECV ($\approx 10^8$ particules virales), le gel magnétique pouvant être ajouté à l'échantillon aqueux sans préparation particulière ni dégazage. Après un contact de 1 h, les propriétés magnétiques du gel ont été exploitées permettant une séparation de la phase solide et de la phase liquide par immobilisation de l'immunoadsorbant le long de la paroi du tube à l'aide d'un champ magnétique. La détermination par titrage du nombre des virus introduits au départ, puis retrouvés dans la phase liquide après fixation, a permis d'évaluer le nombre des particules virales immobilisées sur l'immunoadsorbant.

Les résultats obtenus sont présentés sur le tableau XIII.

Moins de 20 % des particules virales sont mises en évidence dans la phase liquide par titrage. Ceci laisse supposer que 79 à 94 % des virus sont retenus sur l'immunoadsorbant, que celui-ci soit préparé avec des anticorps monoclonaux purifiés ou avec des ascites simplement précipitées au sulfate d'ammonium. Le BECV est stable en tampon PBS et à température ambiante pendant la durée de l'expérimentation. Toutefois, il ne faut pas exclure la possibilité d'une dégradation des particules virales lors de l'agitation en présence de Magnogel,

entraînant une sous-estimation par titrage du nombre des virus subsistant dans la phase liquide et par conséquent non "capturés" sur l'immunoabsorbant.

1.2.2 Elution du BECV de l'immunoabsorbant

La dissociation du complexe Ag-Ac implique, dans le cas présent, l'emploi d'une technique de désorption non spécifique faisant intervenir habituellement des tampons modifiant les forces de liaison Ag-Ac (variation de pH, force ionique). Même si les particules virales éluées sont replacées immédiatement dans un milieu physiologique après dissociation, ces conditions dénaturantes risquent d'avoir une incidence négative sur leur pouvoir infectieux. Pour cette raison, nous avons envisagé, tout d'abord, de tester un procédé de désorption par l'eau distillée, le BECV étant tout à fait stable dans ce milieu.

1.2.2.1 Elution par l'eau distillée

TERNYNCK et AVRAMEAS (1971), dans une étude de l'influence des électrolytes et de l'eau distillée sur les complexes Ag-Ac, ont montré que des anticorps fixés sur un immunoabsorbant pouvaient être élués par l'eau distillée. BUREAU et DAUSSANT (1981) indiquent par ailleurs que cette dissociation n'est efficace que lorsque l'étape d'éluion est retardée de quelques heures, par rapport à la phase de fixation. L'efficacité de la désorption, après cette phase de repos, est indépendante de la quantité d'antigène (ou d'anticorps) immobilisée sur l'immunoabsorbant. Elle peut être réalisée à 4°C bien que le meilleur rendement soit obtenu à 20°C.

Dans une première expérimentation, après adsorption des virus sur un immunoabsorbant préparé avec des anticorps monoclonaux purifiés suivie d'une période de repos d'une nuit, l'éluion a été réalisée par 2 volumes d'eau distillée, sous agitation douce et à température ambiante. Comme l'indiquent les résultats présentés sur le tableau XIII colonne A, aucun virus élué n'a pu être mis en évidence par titrage sur cellules HRT 18.

Supposant que l'immunoabsorbant présentait une trop forte affinité pour le BECV, nous avons envisagé de diminuer la charge en anticorps monoclonaux du gel. Ainsi, une deuxième expérimentation, identique à la

précédente, a été réalisée avec un immunoabsorbant préparé avec des ascites prépurifiées et, donc, encore fortement chargées en protéines autres que les IgG. A part quelques rares particules virales mises en évidence par titrage, cette modification n'a pas permis d'améliorer le rendement de l'élution (tableau XIII colonne B).

BUREAU et DAUSSANT (1981) ont montré que cette période de repos entre les phases de fixation et d'élution devait durer au moins 3 h, la désorption étant longue à démarrer. Cependant, cette durée peut être variable suivant le complexe Ag-Ac considéré. Ainsi, nous avons repris la même expérimentation en faisant varier la durée de la phase d'interruption de 0 - 3 - 8 - 15 et 24 h. Dans tous les cas, les résultats ont été identiques à ceux présentés dans le tableau XIII, seules de rares particules virales étaient retrouvées dans l'éluat après inoculation sur cellules HRT 18.

Par ailleurs, aucune particule virale n'a été mise en évidence par observation en microscopie électronique des éluats, le nombre des virus étant inférieur au seuil de détection de la technique (10^5 à 10^6 particules virales).

Nous avons alors été amenés à envisager des conditions d'élution plus drastiques.

1.2.2.2 Elution en tampon glycine pH acide

L'abaissement du pH en dessous de 3 permet souvent la désorption. Cette technique a été utilisée par AVRAMEAS *et al.* (1983) au cours de travaux similaires avec les poliovirus. Le BECV étant, selon SHARPEE *et al.* (1976), stable à pH 3, ce procédé a été mis en oeuvre.

Les expérimentations ont été reprises à l'aide des deux types d'immunoabsorbant. L'élution a été réalisée en deux phases successives de 10 min, à la température de 4°C, avec un tampon HCl-glycine 0,5 M pH 2,8 pour l'élution proprement dite, puis pH 2,2 afin de régénérer l'immunoabsorbant. Les deux éluats recueillis et immédiatement neutralisés ont été rassemblés et titrés en même temps que la suspension virale de départ.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau XIII.

Le pourcentage des virus élués, obtenu par titrage, est très faible et inférieur à 2 %. Il semble cependant que les virus se désorbent plus facilement

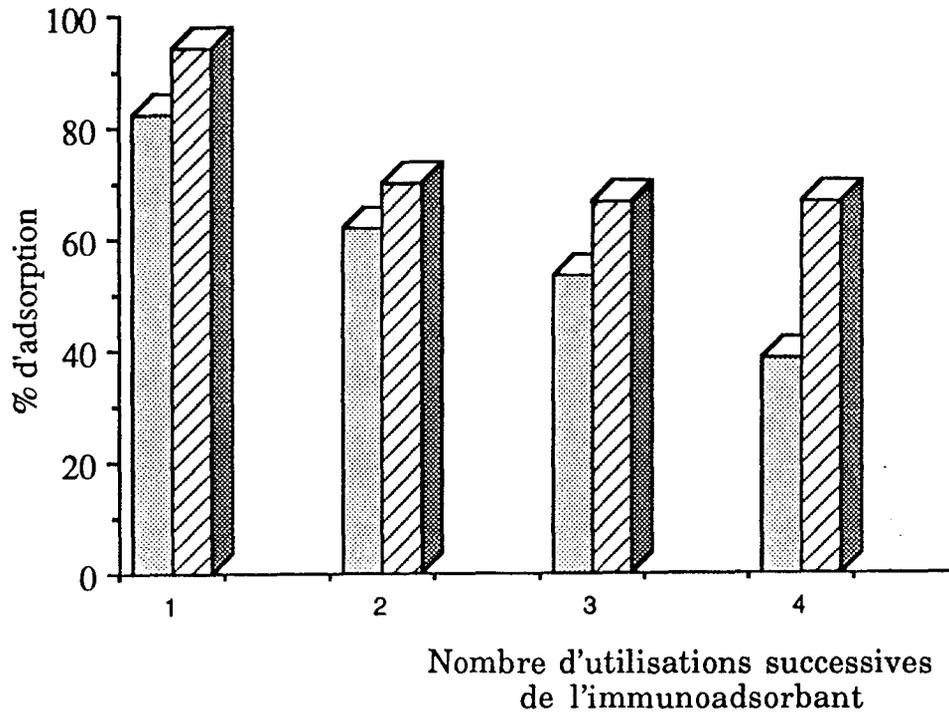


Fig. n° 30 : Capacité d'adsorption de l'immunoabsorbant après plusieurs utilisations successives.

-  Immunoabsorbant préparé avec des anticorps monoclonaux purifiés.
-  Immunoabsorbant préparé avec des ascites prépurifiées.

de l'immunoabsorbant préparé avec des ascites prépurifiées plutôt qu'avec des anticorps purifiés. Toutefois, ce résultat ne rend compte que des particules virales infectieuses et non de celles qui, bien que éluées, seraient inactivées ou dégradées au cours de l'expérimentation en raison, notamment, des variations de pH. Nous avons constaté par ailleurs une dégradation des tapis cellulaires ayant reçu l'éluat à l'état pur, que celui-ci soit ou non contaminé (témoin négatif).

L'observation en microscopie électronique des éluats confirme les résultats obtenus en culture cellulaire :

- aucune particule virale n'est observée dans l'éluat obtenu à partir de l'immunoabsorbant préparé avec des anticorps monoclonaux purifiés, ceci est en relation avec le petit nombre des virus élués mis en évidence par titrage.
- dans le cas de l'immunoabsorbant préparé avec des ascites prépurifiées, de nombreux virus, de l'ordre de 10^7 , ont été observés dans l'éluat. Cette estimation, bien que peu précise, est supérieure au résultat obtenu par titrage ($\approx 10^6$). Ceci s'explique aisément par le fait que les particules virales observées étaient, dans leur ensemble, très abîmées, ayant perdu la totalité de leurs spicules longs restés vraisemblablement sur l'immunoabsorbant, et par conséquent, incapables de s'adsorber sur les cellules HRT 18.

1.2.2.3 Capacité de régénération de l'immunoabsorbant

Nous avons étudié la capacité de réutilisation des immunoabsorbants employés dans l'expérimentation précédente. Ainsi, 4 expérimentations de fixation ont été réalisées successivement en régénérant l'immunoabsorbant entre chaque expérimentation.

Les résultats obtenus sont rassemblés sur la fig. n° 30 :

- une perte sensible des capacités d'adsorption du gel est observée avec l'immunoabsorbant préparé avec des anticorps monoclonaux purifiés, le rendement d'adsorption passant de 82 à 38 %.
- cette diminution des capacités d'adsorption est moins marquée avec l'immunoabsorbant préparé avec des ascites prépurifiées, un rendement d'adsorption de 66 % étant encore obtenu après 4 utilisations.

1.3 Discussion

Cette étude a eu pour but de détecter la présence de BECV dispersés dans un échantillon aqueux (tampon PBS) en utilisant une méthode d'immunoaffinité. L'immunoadsorbant a été obtenu par fixation d'anticorps monoclonaux dirigés contre les déterminants antigéniques du BECV sur un support constitué par un gel magnétique.

1.3.1 Fixation du BECV sur l'immunoadsorbant

Le pourcentage élevé (79 à 94 %) des particules virales immobilisées sur le gel après la phase d'adsorption montre que la réaction d'affinité est réalisable en suspension.

Toutefois, ces résultats ont été obtenus dans des conditions optimales de concentration du gel dispersé dans l'échantillon aqueux (1/6 du volume total). Il n'est pas possible, dans l'état actuel de notre expérimentation, de prévoir comment évoluera ce rendement d'adsorption si l'on augmente le volume de l'échantillon aqueux, réduisant ainsi les probabilités de rencontre entre l'anticorps et l'antigène, et ceci malgré la grande affinité des anticorps monoclonaux vis-à-vis de la particule virale. Certes, il sera toujours possible d'augmenter la quantité de l'immunoadsorbant afin de l'adapter au volume de l'échantillon d'eau à analyser. Toutefois, ceci suppose une consommation accrue d'anticorps monoclonaux et de magnogel. Le coût de l'expérimentation serait alors trop élevé pour pouvoir envisager une utilisation à grande échelle.

Le rendement de fixation obtenu avec l'immunoadsorbant, préparé à partir d'ascites simplement précipitées au sulfate d'ammonium, est aussi satisfaisant et même sensiblement plus performant que celui obtenu avec les anticorps monoclonaux purifiés. Or, nous avons constaté par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS, qu'après précipitation au sulfate d'ammonium, les ascites sont encore très chargées en protéines qui entrent en compétition avec les immunoglobulines sur les sites de fixation du magnogel activé. Les rendements élevés obtenus dans ce cas peuvent s'expliquer par une meilleure dispersion des immunoglobulines sur les perles du gel réduisant les encombrements stériques.

Une diminution de la concentration en anticorps fixés sur le gel, sans modification du rendement d'adsorption, met en évidence la grande affinité de l'immunoadsorbant pour le BECV.

Ces résultats montrent que la purification des anticorps monoclonaux n'est pas indispensable à la préparation de l'immunoabsorbant. Une simple précipitation des ascites au sulfate d'ammonium est suffisante et plus rapide. Dans ce cas, il est cependant nécessaire d'effectuer un titrage des anticorps monoclonaux avant utilisation, la richesse des ascites en anticorps étant très variable.

1.3.2 Elution du BECV de l'immunoabsorbant

Si la fixation du BECV sur l'immunoabsorbant est satisfaisante, son élution est problématique. Il s'est avéré impossible d'obtenir la désorption du virus par l'eau distillée, que ce soit en réalisant l'élution immédiatement après la phase de fixation ou en intercalant une période d'attente de durée variable entre les deux phases. De plus, même en utilisant des moyens drastiques comme un pH très acide (pH 2,2), l'élution est difficile et n'est réellement effective qu'avec l'immunoabsorbant préparé avec des ascites prépurifiées.

La chute du rendement d'adsorption, observée lors de l'utilisation répétée d'un même immunoabsorbant, est le reflet indirect de ces difficultés d'élution. Cette diminution du rendement de fixation après 4 utilisations successives est surtout marquée (de 82 à 38 %) pour l'immunoabsorbant préparé avec des anticorps purifiés pour lequel aucune élution n'a pu être mise en évidence par microscopie électronique. Les difficultés de régénération du gel expliquent ces résultats.

La diminution du rendement est plus discrète (de 94 à 66 %) avec l'immunoabsorbant présentant une moins grande capacité de liaison au BECV et pour lequel la microscopie électronique a pu mettre en évidence une élution partielle des virus à pH acide. Dans ce cas cependant, les particules virales ont, dans leur grande majorité, perdu leurs spicules et sont trop endommagées pour être mises en évidence par titrage sur cellules HRT 18.

De plus, les cellules HRT 18 mises en contact avec les éluats non dilués présentent des signes d'intolérance contribuant à les rendre peu réceptrices à l'infection.

En conclusion, la méthode d'immunoaffinité appliquée à la concentration du BECV à partir du milieu hydrique se révèle décevante. En effet, si la fixation du virus est envisageable, sa récupération par dissociation du complexe Ag-Ac est pratiquement négligeable. De plus, le procédé est long,

lourd à mettre en oeuvre et coûteux (production d'anticorps monoclonaux - utilisation de Magnogel). De ce fait, nous nous sommes tourné vers un procédé plus classique, ayant fait ses preuves dans le domaine de la virologie des eaux. Il est basé sur une adsorption passive des particules virales sur un support de verre, faisant intervenir de simples interactions physiques, moins fortes que les liaisons immunologiques, ce qui devrait faciliter l'élution.

II - DETECTION DU BECV DANS LE MILIEU HYDRIQUE APRES CONCENTRATION PAR ADSORPTION-ELUTION SUR POUDRE DE VERRE

Les méthodes de concentration des virus dans les eaux proposées dans la littérature sont extrêmement nombreuses (FOLIGUET *et al.* - 1973 ; JORET - 1981 ; SARRETTE *et al.* - 1977 ; BLOCK et SCHWARTZBROD - 1989). Parmi celles-ci, la technique fondée sur l'adsorption-élution sur poudre de verre donne des résultats satisfaisants, en particulier pour la recherche des entérovirus (SCHWARTZBROD *et al.* - 1978 - 1979). C'est pourquoi, nous avons tenté de l'appliquer aux coronavirus.

Le principe de cette méthode repose sur le fait que les virus sont des particules amphotères. A un pH inférieur à leur point isoélectrique, ils sont chargés positivement et sont donc susceptibles de s'adsorber sur un support de charge négative constante et indépendante du pH. A l'inverse, à un pH supérieur à leur point isoélectrique, étant alors chargés négativement, ils ont tendance à se séparer du support et donc à se désorber.

Le support choisi est constitué par de la poudre de verre qui, en raison de la présence de groupements Si-OH sous la forme ionisée SiO⁻, garde une charge globale négative en dépit des variations de pH (KESSICK et WAGNER - 1978 ; SOBSEY et JONES - 1979 ; JORET - 1981).

L'étude de la concentration des coronavirus par la méthode d'adsorption-élution sur poudre de verre s'est déroulée en deux étapes. En effet, le point isoélectrique (pHi) du BECV n'étant pas déterminé, il était nécessaire, dans un premier temps, de définir les conditions optimales d'adsorption, puis d'élution du virus. Ces conditions étant établies, nous avons tenté dans un deuxième temps de concentrer des coronavirus à partir de grands volumes d'eau contaminée expérimentalement.

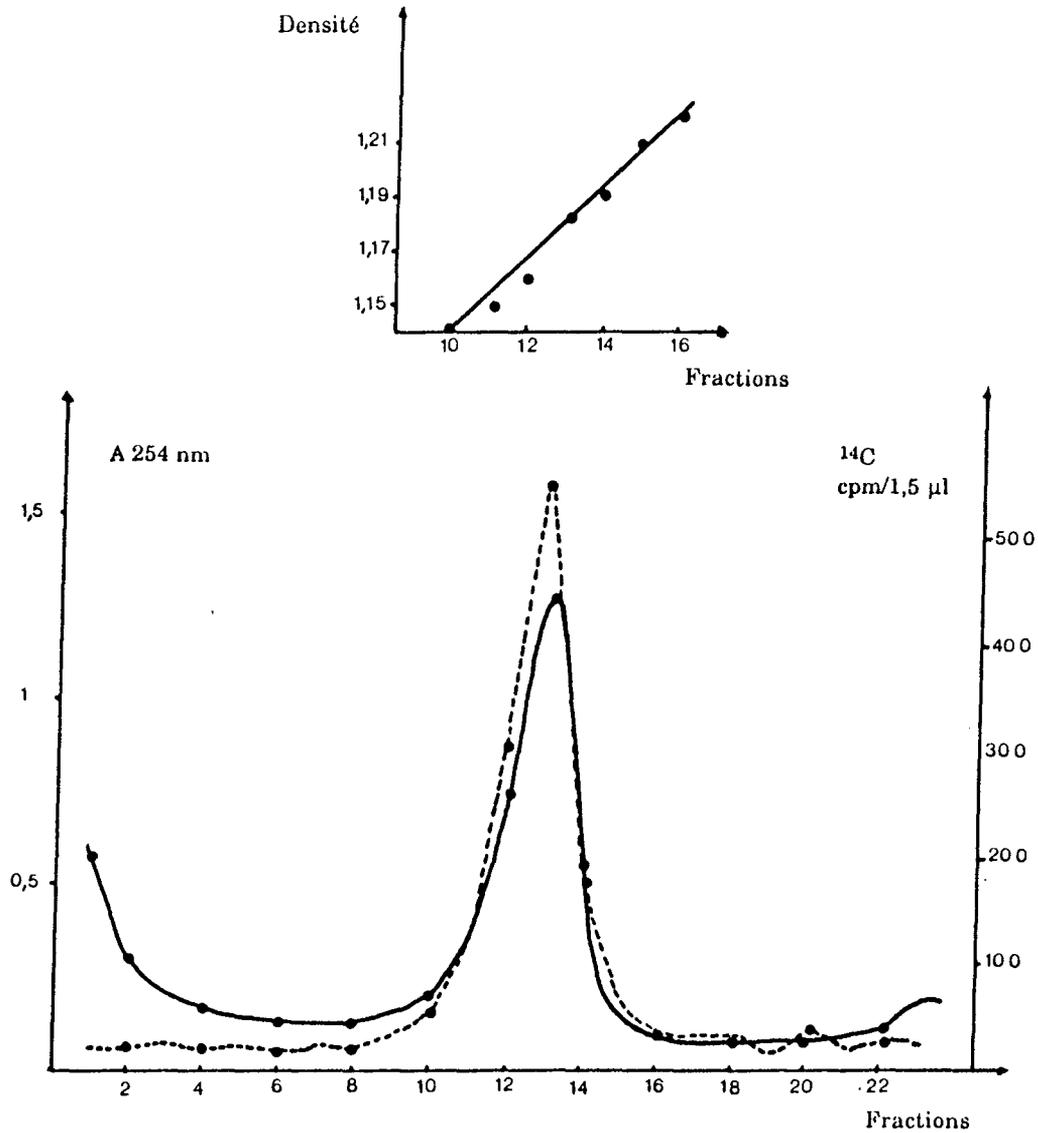


Fig. n° 31 : Purification du BECV. Analyse du gradient après centrifugation isopycniqne.

— Absorbance
 - - - Radioactivité

Compte tenu des difficultés susceptibles d'être rencontrées pour la détection virale par culture cellulaire, du BECV marqué au ^{14}C a été utilisé afin de suivre facilement et rapidement la présence du virus.

2.1 Production et purification du BECV marqué au ^{14}C

Le marquage des protéines virales a été réalisé en incorporant au milieu de culture des acides aminés marqués au ^{14}C , selon le protocole décrit dans "Matériel et Méthodes". La purification du virus produit s'est avérée indispensable afin de séparer les particules virales marquées des débris cellulaires et de la radioactivité non incorporée.

La qualité du matériel viral purifié a été contrôlée à l'issue de la centrifugation isopycnique en gradient linéaire de concentration en saccharose.

Le gradient présente une bande unique bleutée située à mi-hauteur et contenant les particules virales. La détermination par réfractométrie de la densité de chaque fraction collectée montre que le matériel viral est rassemblé dans une zone du gradient de densité comprise entre 1,17 et 1,20 (densité du BECV = 1,19) (fig. n° 31). Un pic d'adsorption dans l'ultraviolet, se superposant parfaitement au pic de radioactivité, est également détecté à cette même densité (fractions 10 à 15). Ces résultats correspondent à ceux publiés par SHARPEE *et al.* (1976) et LAPORTE *et al.* (1980).

La quantité de virus purifié obtenue à partir de 6 flacons de culture de 150 cm² est estimée à environ 1 mg.

La pureté et la morphologie des particules virales ont été vérifiées par observation en microscopie électronique après double coloration négative.

L'infectiosité du virus purifié a été contrôlée par titrage par la technique des plages.

Ainsi, la suspension virale marquée au ^{14}C , utilisée pour la suite de ce travail, a un titre de $1,4 \cdot 10^7$ UFP/ml et une activité spécifique de $1,9 \cdot 10^5$ dpm/ml.

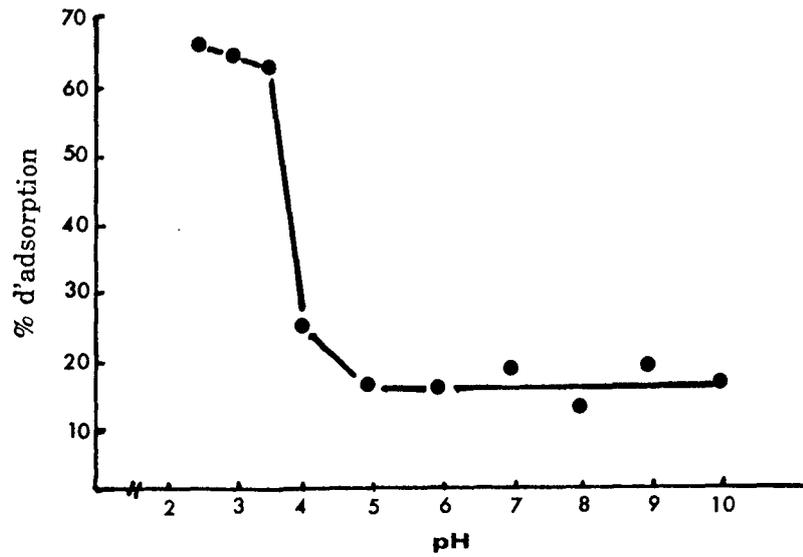


Fig. n° 32 : Adsorption du BECV sur la poudre de verre.
Détermination du rendement d'adsorption exprimé en %
en fonction du pH de l'eau à analyser.

2.2 Détermination des conditions optimales d'adsorption-élution

Les études ont été réalisées dans le but de déterminer successivement :

- les conditions optimales d'adsorption du virus sur la poudre de verre en fonction du pH de l'eau, de la quantité de poudre de verre et de la présence d'ions Al^{+++} .
- les conditions optimales d'élution à pH alcalin par traitement avec des solutions contenant des acides aminés ou des protéines.

Ces conditions étant définies, nous avons déterminé le rendement global d'adsorption-élution et testé la viabilité du BECV aux différents pH utilisés pour cette expérimentation.

Le protocole expérimental de ces essais est décrit dans le chapitre "Matériel et Méthodes".

2.2.1 Conditions optimales d'adsorption

2.2.1.1 Influence du pH

L'étude de l'adsorption du BECV sur la poudre de verre en fonction du pH a été réalisée à partir d'échantillons d'eau de pH compris entre 2,5 et 10.

La représentation graphique du rendement d'adsorption, exprimé en pourcentage, en fonction du pH de l'eau à analyser, est présentée sur la fig. n° 32.

L'adsorption est optimale à pH inférieur ou égal à 3,5 avec un rendement moyen de 62 %. Ce rendement chute brusquement (10 à 20 %) si l'adsorption est réalisée à un pH supérieur à 3,5. Ceci s'explique sans doute par une modification de la charge du virus dans cette zone de pH et permet de supposer qu'un pHi du BECV se situe entre les pH 3,5 et 4.

Il apparaît donc que l'adsorption des coronavirus sur la poudre de verre doit être réalisée à un pH inférieur ou égal à 3,5. C'est pourquoi, dans les expérimentations suivantes, nous avons ajusté les échantillons d'eau à analyser à $pH\ 3,3 \pm 0,2$ afin de disposer d'une marge de sécurité.

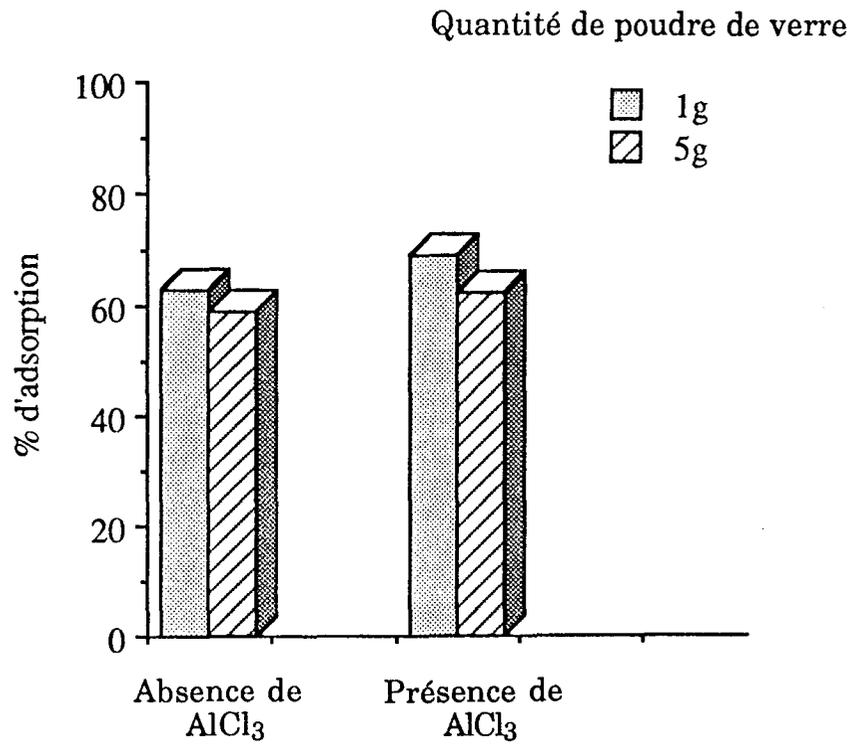


Fig. n° 33 : Influence de la quantité de poudre de verre et de la présence de AlCl₃ sur l'adsorption du BECV.

2.2.1.2 Influence de la quantité de poudre de verre et de l'addition de AlCl_3

Les résultats obtenus précédemment montrent que, dans les conditions optimales d'adsorption, 30 à 40 % des virus introduits dans l'eau à analyser ne sont pas retenus par la poudre de verre. Aussi, une nouvelle expérimentation a été réalisée afin de vérifier si la quantité de poudre de verre avait une incidence sur le rendement d'adsorption.

En parallèle, l'influence de la présence de chlorure d'aluminium sur le rendement d'adsorption a été testée. En effet, WALLIS et MELNICK (1967) et WALLIS *et al* (1972) ont montré que l'addition de cations divalents (Mg^{++}) ou trivalents (Al^{+++}) favorisait l'adsorption des virus sur des supports chargés négativement tels que les membranes filtrantes en nitrate de cellulose ou les fibres de verre. PAYMENT *et al.* (1976 - 1978) ont également préconisé leur emploi lorsque le débit de filtration de l'eau à analyser est important. De même, LUCENA-GUTIERREZ (1979), concentrant des entérovirus sur poudre de verre, a montré que l'addition, dans l'eau à analyser, de chlorure d'aluminium à la concentration finale de $5 \cdot 10^{-4}$ M, améliorerait sensiblement le rendement de la technique. Ces ions trivalents serviraient "d'adhésif cationique" (KESSICK et WAGNER- 1978 ; JORET - 1981) assurant la liaison entre les charges résiduelles négatives de la capsid virale et les sites négatifs de l'adsorbant. Ces ions pourraient également se complexer aux matières organiques solubles présentes dans les eaux usées qui, de ce fait, n'entreraient plus en compétition avec les virus pour occuper les sites d'adsorption du verre (PERDUE *et al.* - 1976 ; FARRAH *et al.* - 1976).

Ainsi, l'expérimentation a été réalisée dans des conditions optimales d'adsorption à $\text{pH } 3,3 \pm 0,2$. Afin d'étudier leur influence sur l'adsorption, nous avons suivi deux paramètres :

- la quantité de poudre de verre (des quantités de 1 et 5 g ont été testées)
- la présence de chlorure d'aluminium à la concentration de $5 \cdot 10^{-4}$ M

Les résultats sont présentés sous forme d'histogramme sur la fig. n° 33.

Que ce soit en présence ou en absence de chlorure d'aluminium, l'augmentation de la quantité de poudre de verre ne permet pas d'améliorer le rendement d'adsorption. Dans les conditions de notre expérimentation, la quantité de poudre de verre ne semble donc pas être un facteur limitant.

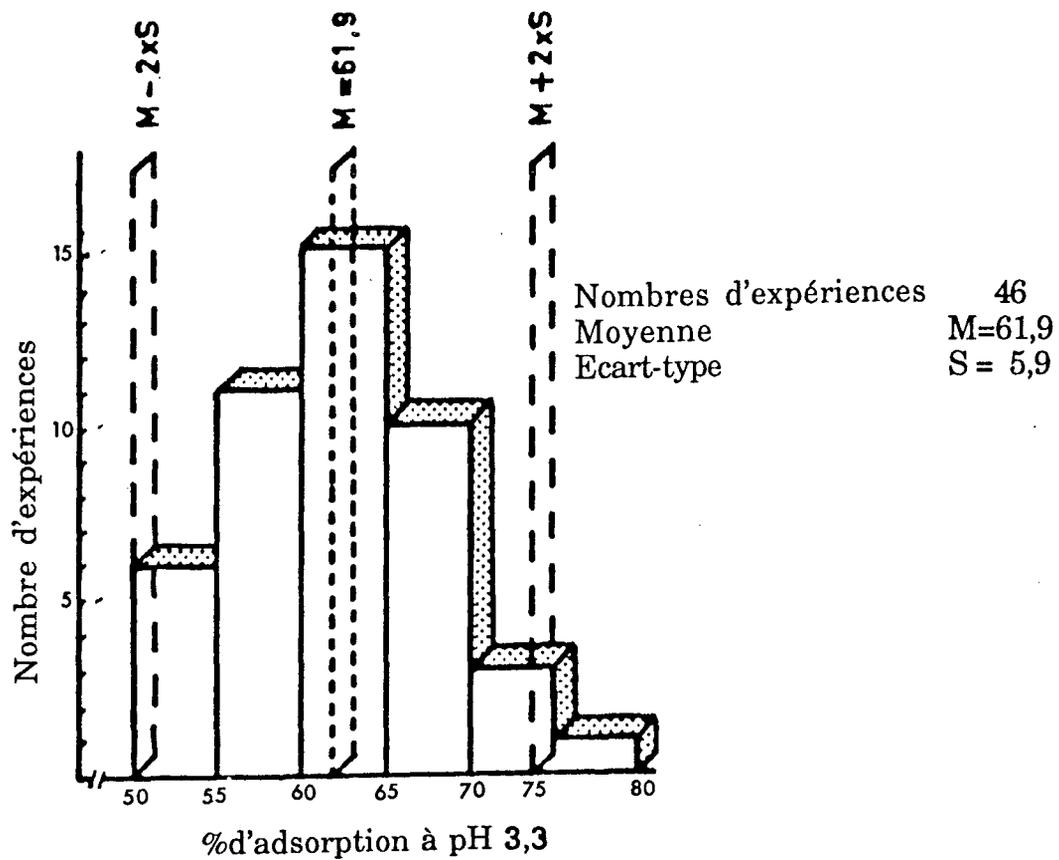


Fig. n° 34 : Rendement moyen d'adsorption.

Pour une quantité donnée de poudre de verre, la présence de chlorure d'aluminium permet une très légère augmentation du rendement d'adsorption, mais celle-ci est trop faible cependant pour être significative.

2.2.1.3 Rendement moyen d'adsorption

Les conditions d'adsorption étant définies, à savoir 10 ml d'eau ajustée à pH $3,3 \pm 0,2$ en présence de chlorure d'aluminium et de 1 g de poudre de verre, nous avons vérifié la reproductibilité du phénomène en réalisant une série d'expérimentations identiques.

Les pourcentages d'adsorption obtenus s'échelonnent de 51 à 76 %, un tiers des expérimentations donnant des valeurs comprises entre 60 et 65 %.

Le regroupement de ces résultats sous forme d'histogramme (fig. n° 34) met en évidence la distribution gaussienne de ces valeurs, le rendement moyen d'adsorption étant de 61,9 % et 95 % des résultats expérimentaux étant compris entre la valeur de la moyenne \pm deux fois l'écart type ($M \pm 2S$). En fonction de cette analyse statistique, il est donc possible de conclure que dans les conditions optimales de pH ($pH \leq 3,5$), le rendement moyen d'adsorption du BECV sur la poudre de verre est de l'ordre de 62 %.

2.2.2 Conditions optimales d'éluion

La désorption des virus de la poudre de verre est réalisée à pH alcalin par éluion à l'aide de solutions contenant des acides aminés ou des protéines. A ce pH, la poudre de verre et les virus étant l'un et l'autre chargés négativement, ces derniers se désorbent par répulsion électrostatique.

Différentes substances riches en protéines sont utilisées pour la préparation des solutions éluantes telles que le sérum de veau foetal utilisé en solution à 10 % (WALLIS et MELNICK - 1967 ; RAMIA et SATTAR - 1979), l'extrait de boeuf à 3 %, un mélange urée 4 M-lysine 0,05 M (FARRAH et BITTON - 1978), la caséine à 0,5 % ou encore le lait en poudre dégraissé en solution à 1 % dans du tampon glycine 0,05 M (BITTON *et al.* - 1979). FARRAH et BITTON (1979) ont proposé de remplacer les protéines de haut poids moléculaire par d'autres molécules plus petites telles que des acides aminés. Ils ont montré que le pouvoir éluant de ces substances dépendait de leur nature

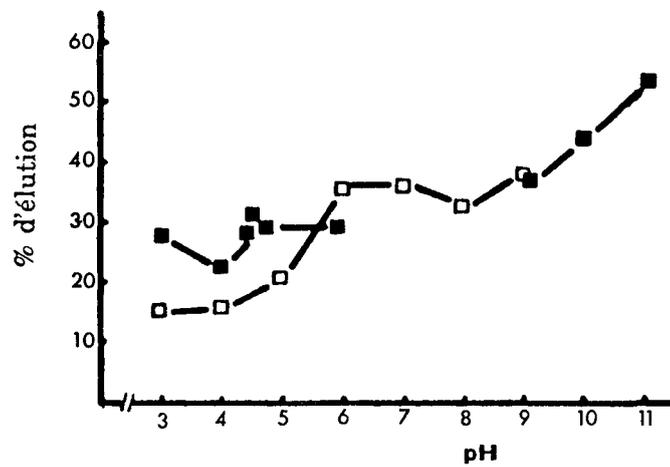


Fig. n° 35 : Elution du BECV de la poudre de verre.

- Elution par des solutions d'extrait de boeuf à 3 % de pH variant de 3 à 9.
- Elution par des solutions de glycine 0,05 M de pH variant de 3 à 11.

chimique mais aussi du support adsorbant utilisé. Ainsi, des acides aminés basiques tels que la glycine ou la lysine permettent l'élution des poliovirus adsorbés sur des filtres en fibre de verre mais pas sur des filtres à base de terre de diatomée. Par contre, des acides aminés acides tels que l'acide aspartique sont des éluants médiocres dans le cas de filtres en fibre de verre.

Parmi les éluants proposés, la solution de glycine 0,05 M pH 11,5 (HOMMA *et al.* - 1973 ; HILL *et al.* - 1976 ; LUCENA-GUTIERREZ - 1979 ; SARRETTE *et al.* - 1977 ; METCALF *et al.* - 1974) et la solution d'extrait de boeuf à 3 % pH 9 ou 9,5 (SOBSEY et JONES - 1979 ; BLOCK *et al.* - 1978 ; PAYMENT *et al.* - 1978) sont couramment employées au cours des techniques de concentration des virus par adsorption-élution. Afin de déterminer le pH optimal d'élution des coronavirus adsorbés sur la poudre de verre, le pouvoir éluant de ces deux solutions a été testé à différents pH.

L'analyse des résultats rassemblés sur la fig. n° 35 permet de constater qu'avec la solution d'extrait de boeuf à 3 %, le pourcentage de virus élués augmente régulièrement en fonction du pH, l'optimum étant atteint pour les pH allant de 6 à 9 avec un rendement d'élution variant de 37 à 40 %.

Avec la solution de glycine à 0,05 M, nous avons constaté des variations importantes de pH de certaines solutions éluantes entre le début et la fin de l'expérimentation. Les solutions de pH acide (pH 3 à 5) et alcalin (pH 9 à 11) sont restées stables. En revanche, les solutions de pH 6, 7 et 8 se sont révélées instables au contact de la poudre de verre à pH 3,3 si bien que les éluations prévues à ces pH se sont déroulées en réalité respectivement à pH 4,5, 4,7 et 5,9. La courbe d'élution (fig. n° 35) pour la solution de glycine est donc incomplète mais elle permet cependant de constater que le pourcentage de virus élués est le plus élevé à pH alcalin (pH 9 à 11) avec un rendement variant de 38 à 55 %.

Il apparaît donc que les deux solutions peuvent être utilisées pour l'élution des virus à condition d'opérer à pH réellement alcalin.

2.2.3 Stabilité du BECV en fonction du pH

Les résultats précédents permettent d'envisager la concentration des coronavirus de l'eau par adsorption-élution sur poudre de verre, mais ils ont été obtenus en mesurant la radioactivité liée à ces virus et n'apportent aucune information sur leur capacité de survie dans les conditions de

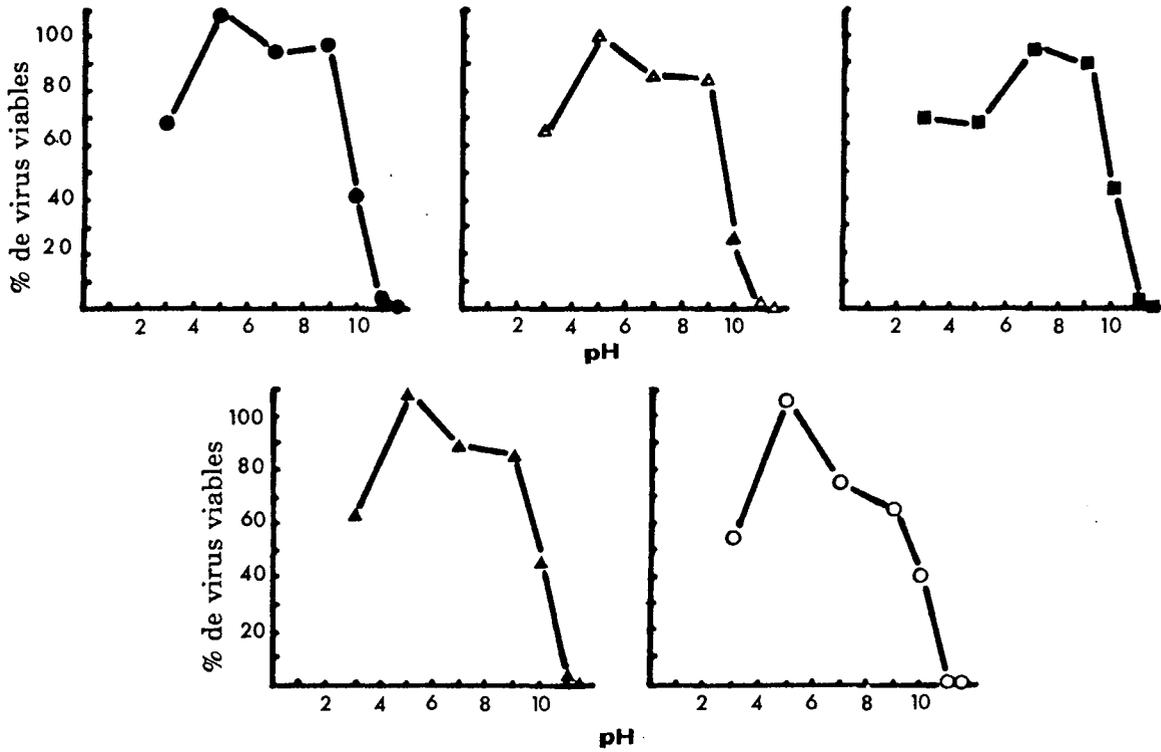


Fig. n° 36 : Influence du pH sur la viabilité du BECV en fonction du temps :

● temps de contact de 10 s ; △ 5 min ; ■ 10 min ;
 ▲ 20 min ; ○ 30 min .

l'expérimentation et en particulier sur leur pouvoir infectieux après élution à pH alcalin.

Il ressort des données bibliographiques que la stabilité des coronavirus a surtout été étudiée pour les pH acides (HESS et BACHMANN - 1976 ; CARTWRIGHT *et al.* - 1965 ; KAPIKIAN *et al.* - 1969). De plus, les résultats publiés sont difficilement interprétables car les conditions expérimentales et les souches virales testées diffèrent selon les auteurs (McINTOSH - 1974 ; LAMARRE et TALBOT - 1989). Il semble toutefois que la stabilité des coronavirus à pH acide dépende de l'espèce envisagée. On constate notamment que les coronavirus entériques supportent assez bien un pH 3 (SHARPEE *et al.* - 1976 ; LAPORTE et BOBULESCO - 1981a). Ceci est sans doute en relation avec leur tropisme digestif et explique qu'ils soient capables de traverser la barrière stomacale sans dommage. SHARPEE *et al.* (1976) ont d'ailleurs proposé de diviser les coronavirus en deux sous-groupes en fonction de leur stabilité à pH acide (pH 3) distinguant ainsi :

- d'une part, les coronavirus à tropisme respiratoire tel que le virus de la bronchite infectieuse aviaire (ESTOLA - 1966) et les coronavirus respiratoires humains (BRADBURNE et TYRRELL - 1971) qui sont affectés par de tels pH.
- et d'autre part, les coronavirus à tropisme digestif tels que le virus de la gastroentérite transmissible du porc (CARTWRIGHT *et al.* - 1965) et le coronavirus entérique bovin, qui sont stables à pH 3.

Nous n'avons trouvé aucune information concernant la résistance des coronavirus à des pH alcalins. En conséquence, une étude de la stabilité du BECV en milieu hydrique à différents pH (3 à 11,5) et en fonction du temps a été envisagée.

Pour chaque pH étudié, après des temps de contact variant de 10 s à 30 min, des échantillons de 100 ml d'EBDS contaminés par $2,9 \cdot 10^5$ UFP ont été neutralisés puis titrés par la technique des plages.

Les résultats de cette étude sont rassemblés sur la fig. n° 36 où sont représentés les pourcentages des virus détectés et, par conséquent, encore infectieux par rapport au nombre de virus introduits dans chaque échantillon d'eau.

Le BECV apparaît parfaitement stable pour les pH compris entre 5 et 9, le temps de contact ayant peu d'influence sur le pourcentage des virus retrouvés.

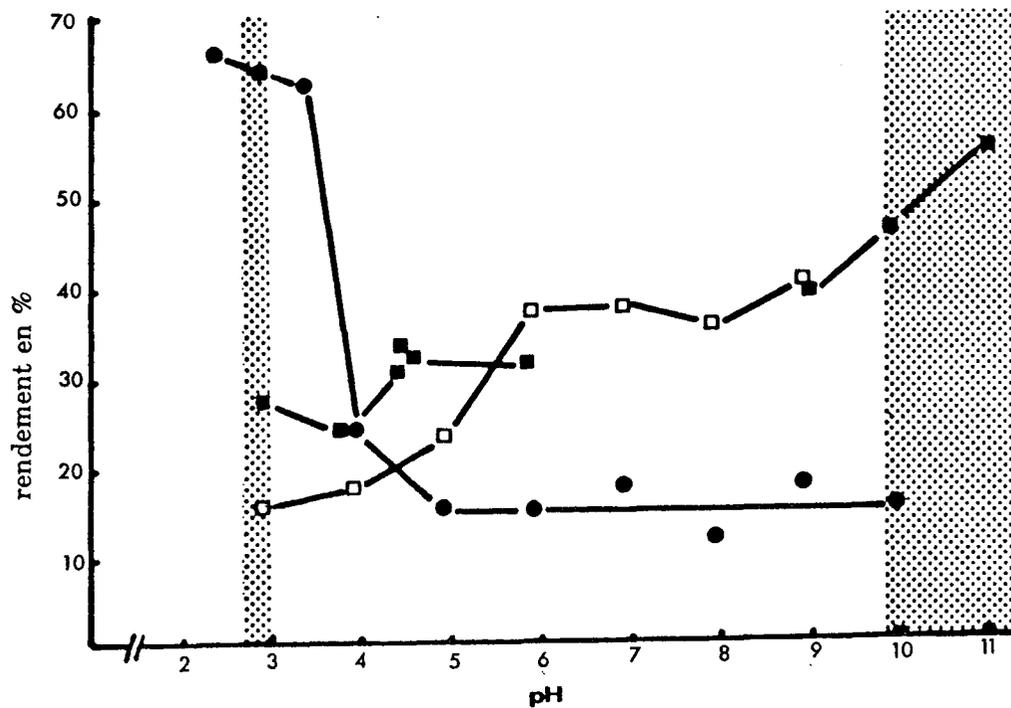


Fig. n° 37 : Influence du pH sur l'adsorption, l'élution, l'infectivité du BECV.

- Adsorption
- Elution par l'extrait de boeuf à 3 %
- Elution par la glycine 0,05 M
- ▨ Zone de pH incompatible avec la survie du BECV (viabilité < 50 %)

A pH 3, cette stabilité est moins bonne, 30 à 47 % des virus étant détruits selon le temps de contact considéré. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par LAPORTE et BOBULESCO (1981a) qui indiquent une diminution du titre de moins d'un log entre les pH 7 et 3 après un temps de contact de 30 min. Cette sensibilité du BECV à pH 3 pourrait expliquer en partie le faible pourcentage des virus détectés en culture cellulaire après élution à pH acide des virus concentrés sur immunoabsorbant.

En revanche, à pH alcalin, le BECV s'avère instable puisque 60 % des particules virales sont instantanément détruites à pH 10. A pH égal ou supérieur à 11, l'inactivation du BECV est pratiquement totale et immédiate.

L'analyse de ces résultats montre que la concentration des coronavirus par adsorption-élution sur poudre de verre, à partir du milieu hydrique, ne peut être envisagée que dans des conditions de pH compris entre 3 et 9, si l'on veut préserver autant que possible le pouvoir infectieux nécessaire à leur détection par culture cellulaire.

2.2.4 Discussion

La synthèse des résultats, obtenus au cours de l'étude des conditions d'adsorption et d'élution des coronavirus sur la poudre de verre, est présentée sous forme graphique dans la fig. n° 37. L'étude analytique de ces résultats fait ressortir que :

- l'adsorption du BECV sur la poudre de verre est optimale à pH inférieur ou égal à 3,5 avec un rendement moyen de 62 %. Ce rendement chute brusquement (10 à 27 %) si l'adsorption est réalisée à un pH supérieur à 3,5. Par ailleurs, les tests de viabilité effectués à pH acide montrent que la stabilité du BECV n'est pas totale à pH 3, 47 % des virus étant détruits après un temps de contact de 30 min. Dans ces conditions, l'utilisation de la technique implique d'effectuer l'adsorption à pH compris entre 3 et 3,5 tout en sachant qu'à ce pH, une partie des virus concentrés risque d'être inactivée.

- la présence de cations Al^{+++} n'améliore pas de façon significative l'adsorption du BECV sur la poudre de verre, mais n'est pas non plus défavorable. Aussi, les expérimentations effectuées dans la suite de ce travail ont été réalisées en leur présence. En effet, l'étude étant menée avec une eau bidistillée et en système clos, elle ne permet pas de mettre en évidence un

Tableau XIV : Rendement d'adsorption-élution obtenu dans les conditions optimales de pH.

Solution éluante	pH de l'adsorption	pH de l'élution	Rendement d'adsorption-élution
Extrait de boeuf à 3 %	$3,3 \pm 0,2$	$7 < \text{pH} < 9$	26 à 28 %
Glycine 0,05 M	$3,3 \pm 0,2$	$9 < \text{pH} < 11$	24 à 38 %

éventuel rôle favorable de ces ions trivalents dans le cas de recherche de coronavirus à partir d'eaux usées chargées en matières organiques.

- l'élution du BECV est optimale avec la solution d'extrait de boeuf à 3 % pour les pH compris entre 7 et 9, et avec la solution de glycine 0,05 M pour les pH compris entre 9 et 11. Etant donné qu'à pH 9, le BECV est stable au moins pendant un temps de contact de 20 min et qu'à pH supérieur à 9, cette stabilité diminue très rapidement, nous préconisons d'effectuer l'élution à pH compris entre 7 et 9 avec la solution d'extrait de boeuf à 3 % et à pH 9 avec la solution de glycine 0,05 M. Les pourcentages d'élution obtenus avec ces deux éluants sont sensiblement identiques (40 et 38 %). Toutefois, le pouvoir tampon de la solution de glycine étant assez médiocre, il est préférable d'effectuer l'élution avec la solution d'extrait de boeuf.

- il apparaît que la méthode d'adsorption-élution sur poudre de verre appliquée à la recherche du coronavirus entérique dans le milieu hydrique permet d'obtenir des rendements globaux relativement faibles puisque, pour une adsorption à pH 3,3 et une élution à pH 9, le rendement global de la technique s'établit entre 24 et 28 % (tableau XIV). Ces valeurs sont inférieures à celles obtenues lors de concentrations des entérovirus par la même technique. En effet, SARRETTE *et al.* (1977) d'une part, SCHWARTZBROD et LUCENA-GUTIERREZ (1978) d'autre part, obtiennent des taux moyens de récupération de l'ordre de 50 à 60 %. Cette différence s'explique sans doute par le fait que les entérovirus sont des virus nus, contrairement aux coronavirus qui sont des virus enveloppés présentant des zones hydrophobes non polaires.

Enfin, ces résultats étant obtenus à partir d'expérimentations réalisées sur de très faibles volumes d'eau, il est impératif de les confirmer ou de les infirmer par des expérimentations réalisées dans les conditions habituelles de concentration des virus à partir du milieu hydrique, c'est-à-dire avec des échantillons d'au moins 20 litres d'eau.

2.3 Recherche du BECV à partir d'échantillons d'eau

Cette étude a été réalisée en concentrant les virus par la technique d'adsorption-élution sur poudre de verre (SARRETTE *et al.* - 1977) avec l'appareillage décrit par SCHWARTZBROD et LUCENA-GUTIERREZ (1978)

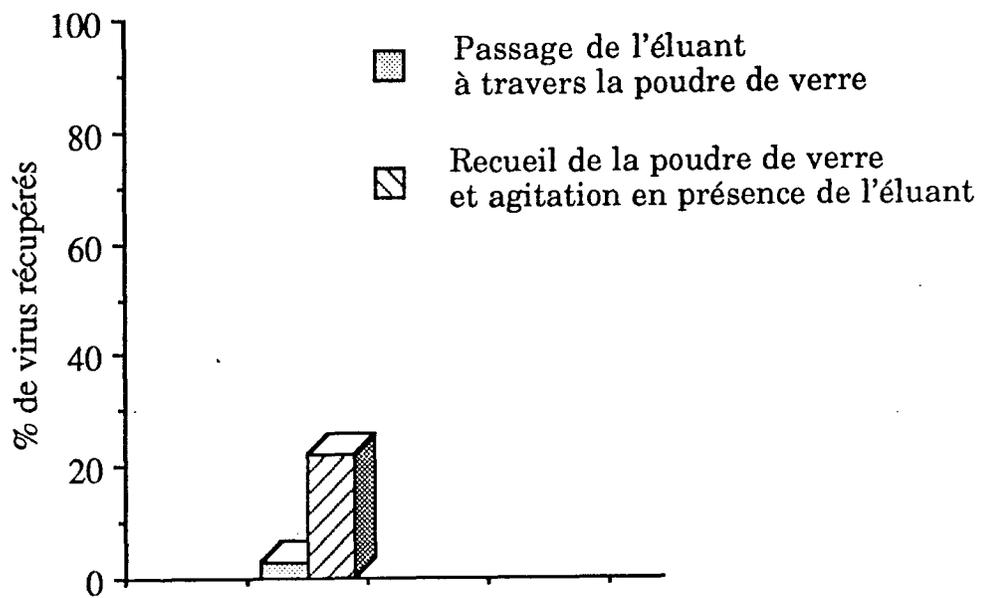


Fig. n° 38 : Concentration du BECV par la technique d'adsorption-élution sur poudre de verre.
Détermination du rendement par mesure de la radioactivité liée aux virus élués.

selon le protocole rapporté dans le chapitre "Matériel et Méthodes". La détection des virus concentrés a été menée selon trois procédés :

- mesure de la radioactivité liée à ces virus
- titrage par la technique des plages sur cellules HRT 18
- détection par hybridation moléculaire

2.3.1 Détection par mesure de la radioactivité liée aux virus élués

L'expérimentation a été réalisée avec des échantillons de 20 litres d'eau potable stérile, contaminés par 500 µl d'une suspension de BECV marqué au ^{14}C (soit 7.10^6 particules virales correspondant à une radioactivité totale de $9,3.10^4$ dpm). L'adsorption s'est déroulée à pH 3,3 en présence d'ions Al^{+++} à la concentration de 5.10^{-4} M. L'élution a été réalisée avec une solution d'extrait de boeuf à 3 % (pH 9) suivant deux protocoles différents :

- élution par simple passage de l'éluant à travers la poudre de verre selon la technique classique.
- après recueil de la poudre de verre, élution en présence d'éluant sous agitation lente pendant 5 à 10 min, le liquide d'élution étant ensuite séparé de la poudre par filtration.

En effet, des travaux effectués au laboratoire, avec le rotavirus, ont montré que l'élution réalisée sous agitation permettait d'améliorer le rendement d'élution.

Dans les deux cas, après recueil de l'éluat, une partie aliquote a été prélevée afin de mesurer la radioactivité et donc le matériel viral présent.

Les résultats obtenus sont présentés sur la fig. n° 38.

L'élution par simple passage de l'éluant à travers la poudre de verre est inefficace, 2,8 % seulement des particules virales étant retrouvées après concentration. L'élution réalisée sous agitation permet d'améliorer le rendement d'un facteur 10, 22 % des virus introduits au départ dans l'échantillon d'eau étant retrouvés après adsorption-élution sur poudre de verre.

2.3.2 Détection par titrage des virus sur culture cellulaire

Les résultats précédents, obtenus avec du BECV radioactif, ont permis de démontrer que la technique d'adsorption-élution sur poudre de verre permettait, bien que le rendement soit faible, de concentrer des coronavirus à partir de grands volumes d'eau contaminée.

La mise en évidence des virus concentrés a ensuite été envisagée par inoculation à des cultures cellulaires afin de vérifier leur infectiosité. De plus, le titrage par la technique des plages devrait permettre leur quantification.

Des échantillons de 20 litres d'eau potable stérile ont été contaminés par du BECV à raison de 2.10^7 UFP par échantillon, puis concentrés en réalisant l'élution sous agitation à pH 9 soit par la solution d'extrait de boeuf à 3 %, soit par du tampon glycine 0,05 M. Cependant, afin de limiter le volume d'éluat à tester sur les cultures cellulaires, les virus élués ont été rassemblés sous un faible volume par ultracentrifugation. Le culot de centrifugation homogénéisé dans du milieu de culture a été ensuite intégralement inoculé, après décontamination, à des tapis de cellules HRT 18 en vue d'une quantification. Pour chaque expérimentation, deux témoins ont été prévus, constitués d'une part, de cellules non inoculées et d'autre part, de cellules inoculées par l'éluat concentré obtenu à partir d'une eau non contaminée. Un titrage du virus a été réalisé en parallèle afin de contrôler le pouvoir infectieux du BECV utilisé ainsi que la réceptivité des cellules HRT 18.

Sur les six expérimentations réalisées, quel que soit l'éluant utilisé, aucune plage de lyse n'a pu être détectée. Nous avons constaté que les tapis cellulaires ayant reçu les éluats concentrés à l'état pur étaient endommagés, laissant supposer un effet toxique pour les cellules. Ceci n'est pas dû à l'inoculation du virus mais bien à une intolérance des cellules à l'éluat concentré. En effet, ce phénomène s'observe également avec un témoin négatif obtenu par concentration d'une eau non contaminée. Il est vrai que les cellules HRT 18 sont relativement sensibles. Adaptées à des conditions de culture précises, elles s'accommodent mal du moindre changement, ne serait-ce que d'un nouveau lot de sérum de veau foetal. Par ailleurs, le titrage du virus ainsi que le témoin cellules se sont révélés conformes à notre attente.

L'examen en microscopie électronique des éluats concentrés a permis la mise en évidence des particules virales éluées. La recherche s'est avérée aisée laissant supposer leur présence en assez grand nombre (de l'ordre de 10^6). Cependant, les virus observés étaient très dégradés. La plupart d'entre eux étaient très déformés et avaient perdu tout ou partie de leurs spicules.

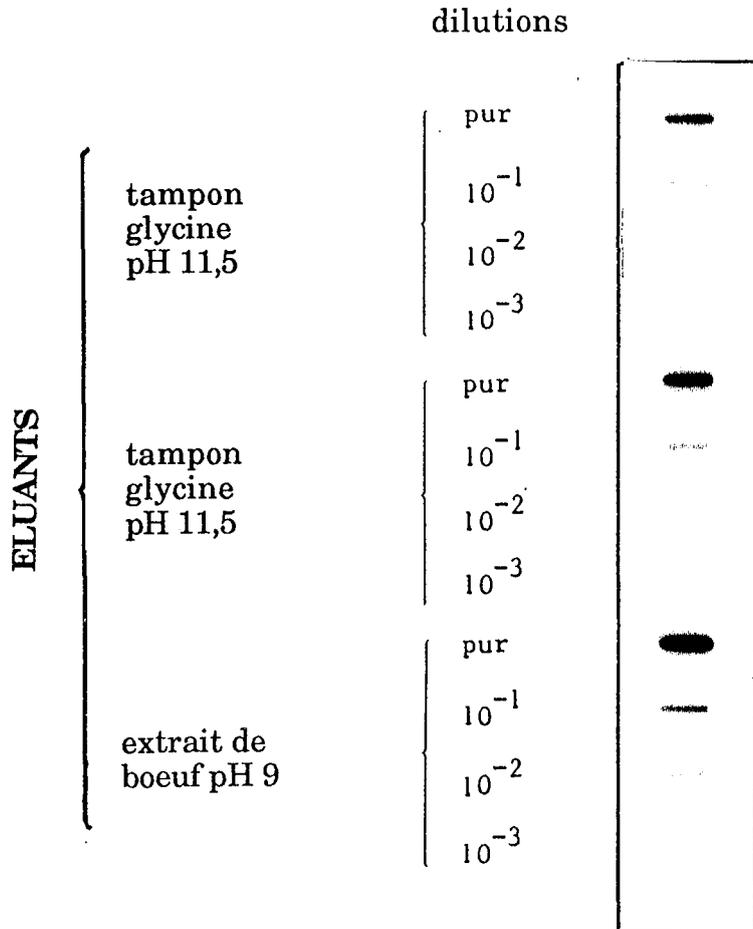


Fig. n° 39 : Mise en évidence du BECV dans le milieu hydrique par hybridation moléculaire.

- Concentration par adsorption-élution sur poudre de verre.
- Détection des acides nucléiques extraits après traitement par la protéinase K avec la sonde 174 marquée au ^{32}P

2.3.3 Détection par hybridation moléculaire

Les particules virales éluées mais très endommagées, ne pouvant être révélées grâce à leur pouvoir infectieux, leur mise en évidence a été envisagée par la technique d'hybridation moléculaire mise au point dans la première partie de ce travail.

L'étude a porté sur trois expériences effectuées à partir d'échantillons de 20 l d'eau contaminés expérimentalement par 1.10^9 UFP de BECV.

L'éluion des virus de la poudre de verre a été menée soit avec de l'extrait de boeuf à pH 9, soit à l'aide d'un tampon glycine à pH 11,5. N'ayant pas à préserver le pouvoir infectieux des particules virales, nous avons délibérément utilisé des conditions d'éluion énergiques afin de "décrocher" le maximum de virus de la poudre de verre : pH très alcalin et agitation vigoureuse de la poudre de verre en suspension dans l'éluant.

Les particules virales, plus ou moins dégradées, ont été récupérées puis concentrées par ultracentrifugation. Les acides nucléiques extraits après traitement par la protéinase K ont été déposés sous différentes dilutions sur une membrane de nitrocellulose par *slot blot*, puis hybridés avec la sonde d'ADNc 174 marquée au ^{32}P .

L'autoradiogramme de 48 h est présenté sur la fig. n° 39.

Nous obtenons un signal positif jusqu'à la dilution 10^{-1} pour les éluions réalisées en tampon glycine et 10^{-2} pour celles réalisées avec l'extrait de boeuf. Dans ce dernier cas, un signal de faible intensité est également détecté à la dilution 10^{-3} après un temps d'autoradiographie de 72 h.

L'éluion par l'extrait de boeuf donne de meilleurs résultats qu'avec le tampon glycine, comme cela a déjà été constaté au cours des expériences de concentration effectuées avec du virus marqué au ^{14}C . Le signal positif observé à la dilution 10^{-2} laisse supposer qu'au minimum 3 pg d'ARN viral ont été déposés sur la membrane de nitrocellulose, soit l'équivalent de $2,6.10^5$ particules virales. Par conséquent, l'échantillon déposé pur contiendrait au moins l'équivalent de $2,6.10^7$ virus.

Le rendement global de la technique serait donc au minimum de 2,6 %, ce qui peut paraître très faible mais s'explique par les nombreuses étapes qu'implique ce protocole. En effet, nous avons montré, en utilisant du virus

marqué au ^{14}C , que le rendement de la technique d'adsorption-élution sur poudre de verre n'était que de 22 %. Les étapes d'ultracentrifugation, d'extraction et de purification des acides nucléiques sont également cause de perte de matériel. Enfin, si l'extraction des acides nucléiques a été réalisée avec toutes les précautions nécessaires à la manipulation des ARN, au cours des étapes précédentes, en particulier pendant la phase d'élution où un grand nombre de particules virales sont lésées, l'ARN est très vulnérable à l'action des RNases. La sensibilité de la technique est cependant suffisante pour permettre une détection à la dilution 10^{-2} . Une estimation théorique permet de supposer que le seuil limite de détection correspond à une charge virale de l'ordre de 1.10^7 particules, dispersées dans l'échantillon d'eau à analyser.

2.4 Discussion

La recherche du BECV a été menée à partir de grands volumes d'eau contaminée expérimentalement. Cette étude a comporté deux étapes successives :

- la concentration des virus par adsorption sur poudre de verre suivie d'une élution.
- leur détection par inoculation sur culture cellulaire ou par hybridation moléculaire.

2.4.1 Concentration

Des essais de concentration sur poudre de verre, réalisés avec du BECV marqué au ^{14}C , donnent un rendement d'adsorption-élution de l'ordre de 22 % qui, bien que relativement faible, correspond au rendement attendu à l'issue des essais préliminaires (24 à 28 %).

L'observation en microscopie électronique des virus élués confirme que la concentration des coronavirus dispersés dans le milieu hydrique peut être réalisée par ce procédé. Toutefois, la désorption des particules virales de la poudre de verre est difficile, un simple passage de l'éluant au travers de celle-ci étant insuffisant. L'élution sous agitation est plus efficace mais les virus recueillis sont très endommagés.

2.4.2 Détection

Après élution, la détection des virus par inoculation à des cultures de cellules HRT 18 s'est avérée impossible. Plusieurs facteurs doivent intervenir, à des degrés divers, dans cet échec :

- une partie des particules virales (estimée à 40 % d'après l'étude de l'influence du pH sur la viabilité du BECV) a perdu son pouvoir infectieux après séjour à pH 3,3 pendant les 20 min nécessaires au déroulement de la phase d'adsorption sur la poudre de verre.
- le contact avec l'éluat concentré semble mal toléré par les cellules HRT 18, les rendant sans doute peu réceptives à l'infection. Les effets toxiques observés tout particulièrement avec l'extrait de boeuf, détériorant le tapis cellulaire, peuvent à eux seuls expliquer qu'aucune plage de lyse caractéristique ne soit observée.
- les virus élués très endommagés et ayant perdu tout ou partie de leurs spicules ne peuvent plus s'adsorber sur la membrane plasmique des cellules HRT 18.

En revanche, leur présence a pu être détectée par hybridation moléculaire à l'aide de la sonde ADNc radioactive.

En effet, un des avantages de ce procédé est de pouvoir détecter des particules virales après leur inactivation par des agents physiques ou chimiques, non seulement mortes mais même en partie dégradées.

Cependant, pour les besoins de l'expérimentation, cette étude a été réalisée à partir d'échantillons d'eau fortement contaminés (1.10^9 particules virales dans 20 l d'eau) et de telles conditions ont peu de chance de se retrouver dans l'environnement.

La sensibilité de la technique est insuffisante pour permettre la détection de quelques particules virales susceptibles de polluer le milieu hydrique. L'emploi d'un système d'amplification, soit du signal de détection, soit du matériel nucléique à détecter, est donc nécessaire avant d'envisager l'utilisation de ce procédé pour la mise en évidence des virus au sein de l'environnement.

Des études ont déjà été réalisées dans ce sens, notamment pour la recherche de populations microbiennes présentes dans différentes niches écologiques d'eau douce (STEFFAN *et al.* - 1989). L'hybridation moléculaire, dans ce cas, est réalisée après étalement sur milieu sélectif ou non, la culture

permettant l'amplification des microorganismes présents. Toutefois, dans le cas du BECV, la dégradation des particules virales étant inévitable au cours de la phase de concentration, leur amplification par inoculation à un système cellulaire sensible ne peut être envisagée.

Dans le cas du poliovirus ou du virus de l'hépatite A, des travaux réalisés à partir d'échantillons d'eau par MARGOLIN *et al.* (1986) ont permis la détection de 1 fg d'ARN équivalant à 1 UFP. Ces auteurs utilisent une sonde radioactive constituée par le plasmide pBR322 recombiné entier avec son insert spécifique d'ADNc. L'insert s'hybride avec l'ARN cible du poliovirus immobilisé sur le support et les régions de la sonde restées libres sont disponibles pour une hybridation avec un excès d'ADN plasmidique présent dans la solution d'hybridation. L'ensemble forme une structure en réseau rassemblant un grand nombre de molécules marquées au ^{32}P et permettant une amplification du signal.

D'autres techniques permettent une augmentation significative de la sensibilité et peuvent être envisagées. La PCR (Polymerase Chain Reaction) permet, après transcription de l'ARN en ADNc, d'obtenir des milliers de copies de l'ADN cible (facteur d'amplification de 2.10^5) à l'aide d'une réaction *in vitro* qui utilise l'ADN polymérase thermostable de *Thermus aquaticus* (Taq polymérase). Le produit amplifié peut être détecté directement par électrophorèse sur gel d'agarose ou par hybridation avec une sonde complémentaire (SAIKI *et al.* - 1988 ; JESTIN *et al.* - 1990 ; BELAK et BALLAGI-PORDANY - 1990).

D'autres systèmes, d'emploi plus aisé et ne nécessitant pas de cycle thermique, sont récemment apparus. C'est ainsi que le système NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) (KIEVITS *et al.* - 1990) et la Q β réplique isolée du bactériophage Q β (LIZARDI *et al.* - 1988) permettent l'amplification aussi bien des séquences d'ARN que d'ADN simple brin. Dans le système de la Q β amplification, la sonde spécifique de la séquence cible recherchée est introduite dans un ARN particulier, le MDV 1, substrat naturel de la Q β réplique. Ainsi, après hybridation avec la séquence cible, suivie d'une deshybridation par thermoélution, l'ARN recombinant (et donc la sonde) peut être considérablement amplifié puis mis en évidence et quantifié par une méthode colorimétrique.

Grâce à ces techniques, la sensibilité n'est plus un facteur limitant des tests d'hybridation moléculaire, ce qui devrait permettre, pour notre part, d'utiliser, pour la détection, non plus une sonde radioactive mais la sonde marquée à la peroxydase couplée au système ECL.



CONCLUSION

Les coronavirus sont impliqués dans de nombreuses maladies affectant l'homme et les animaux. Grâce au développement des techniques de biologie moléculaire, une connaissance plus approfondie des différents membres de ce groupe viral a été rendue possible. Ils présentent des caractéristiques morphologiques et structurales communes, ainsi qu'une même stratégie originale de réplication. Toutefois, la pathogénie et l'épidémiologie des infections qu'ils provoquent sont mal connues. Il serait en particulier souhaitable d'étudier la propagation des enzooties et épizooties, l'influence éventuelle de l'environnement dans leur survenue, ou encore le rôle pathogène des coronavirus dans les maladies entériques humaines.

Pour réaliser de telles études, il est indispensable de disposer de tests performants permettant la recherche des coronavirus tant dans les milieux biologiques qu'au sein de l'environnement. Les techniques de diagnostic actuelles, quand elles existent, sont lourdes et coûteuses (culture cellulaire, microscopie électronique), ou manquent de spécificité et de sensibilité (tests d'hémagglutination, immunoenzymatiques ou fluorescents).

Parmi les techniques nouvelles de diagnostic rapide utilisées en virologie, l'hybridation moléculaire connaît un essor important. Ce travail a donc été consacré au développement d'un test de détection des coronavirus basé sur ce procédé, sensible, spécifique et facile à mettre en oeuvre.

Le coronavirus entérique bovin (BECV) a été choisi comme modèle d'étude, en raison d'une part, de son implication dans le développement d'entérites mortelles ayant une grave incidence économique dans les élevages bovins, d'autre part, de sa capacité à se multiplier *in vitro* dans un système cellulaire sensible pouvant conduire à une production importante de virions.

La voie qui a été choisie pour l'obtention de sondes capables de s'hybrider avec l'ARN viral a été le clonage de l'ARN génomique extrait du BECV purifié, ARN monocaténaire polyadénylé, en réalisant la synthèse d'ADNc à partir d'amorces aléatoires ou d'amorces oligo dT. L'hétéroduplex ARN-ADNc formé a été inséré dans le plasmide pBR322, puis cloné dans *E. coli*. Après sélection, les clones d'ADNc obtenus (205 à l'aide d'amorces aléatoires et 178 à l'aide de l'amorce oligo dT) ont été analysés et 24 d'entre eux, de taille comprise entre 1,8 et 2 kb, ont été étudiés par cartographie de restriction. Trois

clones (160-174-216), constitués de la plus grande partie des gènes codant pour la nucléocapside et la protéine transmembranaire du virus, ont été retenus. L'insert 174, pouvant être excisé facilement du plasmide recombiné par l'enzyme Pst I sans coupures internes, a été utilisé préférentiellement pour la production d'une sonde moléculaire d'ADNc. Deux types de marquage de la sonde ont été comparés : marquage radioactif au ^{32}P par la technique des amorces aléatoires et marquage enzymatique par couplage covalent à la peroxydase et détection par chimiluminescence.

L'hybridation moléculaire par *slot blot* a été utilisée pour la détection de l'ARN génomique extrait du BECV purifié, ainsi que pour sa mise en évidence dans des cultures de cellules HRT 18 infectées.

La sonde radioactive permet de détecter 1 à 3 pg d'ARN viral, soit environ 2.10^5 génomes, tandis que la sonde enzymatique, moins sensible, limite la détection à 100 pg d'ARN. Toutefois, cette dernière a l'avantage d'être d'emploi facile, son marquage est rapide (10 min), le temps de détection du signal est court (1 à 2 min), enfin, la sonde marquée est stable pendant plusieurs mois.

La détection directe du BECV à partir de cellules infectées est possible. Cependant, un prétraitement des échantillons par la protéinase K, suivi de l'extraction des acides nucléiques, améliore la sensibilité du test. Les protéines et macromolécules pouvant entrer en compétition avec l'ARN viral au niveau des sites d'adsorption de la membrane support étant, dans ce cas, éliminées, l'accessibilité de la sonde à l'ARN est ainsi facilitée. Cet effet est particulièrement appréciable pour les tests utilisant la sonde froide qui, par hybridation avec les échantillons non déprotéinisés, est à l'origine de fixations aspécifiques gênant l'interprétation.

L'amélioration de la sensibilité de la méthode a été tentée par utilisation simultanée des trois sondes sélectionnées et marquées. Toutefois, aucune amplification significative du signal d'hybridation ni abaissement du seuil de sensibilité de la méthode n'ont été observés. Ceci peut s'expliquer par l'existence de zones de recouvrement pouvant favoriser la réassociation des sondes en solution, au détriment de l'hybridation sur la membrane.

Ce test d'hybridation moléculaire à l'aide de la sonde 174 permet l'identification spécifique du BECV. En effet, aucune hybridation n'a été constatée, ni avec les acides nucléiques d'autres virus entériques tel l'ARN du rotavirus, ni même avec ceux d'autres membres de la famille des *Coronaviridae*, virus de la gastroentérite du porcelet (TGEV) par exemple (dont le gène codant pour la protéine membranaire présente 50 % d'homologie avec celui du BECV). Ainsi, l'identification des différents groupes antigéniques de la famille des *Coronaviridae* pourrait être envisagée par hybridation moléculaire. Il serait, de plus, possible, par un choix judicieux des séquences nucléotidiques cibles, d'identifier spécifiquement les membres d'un même groupe antigénique.

Ce test d'hybridation moléculaire présente un intérêt diagnostique potentiel en biologie clinique vétérinaire et humaine. Ainsi, la technique s'est vérifiée suffisamment sensible pour permettre son application directe à la recherche du BECV dans des fécès de veaux atteints d'entérite. Les résultats préliminaires obtenus à l'aide de la sonde radioactive sont encourageants et nous incitent à entreprendre, dès à présent, une étude de terrain élargie portant sur un grand nombre d'échantillons afin d'estimer la sensibilité et la spécificité de ce test, comparativement aux autres techniques actuellement disponibles (ELISA ou hémagglutination). Nous envisageons également d'utiliser ce procédé pour des recherches au sein de l'environnement.

En effet, à ce jour, aucune étude n'a été publiée concernant le rôle joué par l'eau et l'environnement dans l'apparition des entérites à coronavirus, sans doute en raison des difficultés rencontrées pour la détection de ces virus dans des milieux où ils sont présents en faible quantité.

Ainsi, leur détection nécessite au préalable une étape de concentration afin de rassembler sous un faible volume les virus initialement dispersés. Les techniques, actuellement proposées pour la concentration des virus présents dans les milieux hydriques, ont une efficacité limitée et variable suivant les virus concernés. Au cours de ce travail, deux procédés de concentration ont été étudiés.

- Une technique d'immunoaffinité, mettant en jeu des anticorps monoclonaux anti-BECV, a été développée. Un immunoadsorbant magnétique a été préparé par couplage à des billes de Magnogel des anticorps, soit prépurifiés par simple précipitation, soit purifiés par chromatographie sur

colonne de protéine A-sépharose. La réaction d'affinité s'est déroulée en maintenant le gel en suspension dans l'eau à analyser. Dans des conditions optimales de concentration de l'immunoadsorbant, 79 à 94 % des particules virales sont immobilisées. La désorption s'est avérée difficile et efficace seulement à pH acide et dans le cas de l'immunoadsorbant préparé avec les anticorps monoclonaux prépurifiés. La chute du rendement d'adsorption, observée lors de la réutilisation répétée du même immunoadsorbant, est le reflet indirect de ces difficultés d'élution.

- Une technique d'adsorption-élution sur poudre de verre a également été testée. Elle fait intervenir des forces électrostatiques impliquant une adhésion passive et aspécifique sur le verre. L'étude a été réalisée avec du BECV marqué au ^{14}C afin de définir les conditions optimales de concentration.

Pour être efficace, l'adsorption du BECV sur la poudre de verre doit être effectuée à un pH inférieur ou égal à 3,5. La présence d'ions Al^{+++} susceptibles d'assurer la liaison entre les charges négatives de la capsid virale et les sites négatifs de l'adsorbant n'ont pas permis d'améliorer le rendement moyen de l'adsorption qui est de 62 %.

L'élution de 40 % des virus adsorbés est obtenue à pH 9 à l'aide d'une solution de glycine ou d'extrait de boeuf.

Cette technique, appliquée à de grands volumes d'eau contaminée, permet un rendement global de récupération de 22 %.

Ainsi, les deux modalités d'adsorption, passive ou spécifique, du BECV sur un support, sont réalisables en vue d'isoler des virus dispersés dans le milieu hydrique. Cependant, l'élution des virus du support, soit par répulsion électrostatique, soit par dissociation de l'immunocomplexe, est délicate et la détection, par culture cellulaire, des virus élués s'est avérée impossible.

Leur observation en microscopie électronique a montré, qu'à la suite des traitements d'élution, les particules virales sont très endommagées, l'enveloppe est lésée et on note une perte importante des spicules empêchant toute multiplication virale *in vitro*. En revanche, la détection par hybridation moléculaire est, dans ces conditions, réalisable. Toutefois, le rendement global de la technique est très faible. Le seuil limite de détection correspond à une charge virale de l'ordre de 10^7 particules dispersées dans l'échantillon à analyser, concentration beaucoup trop élevée par rapport à la contamination virale de l'environnement.

A cette fin de recherche, le test de détection du BECV utilisant les sondes moléculaires devrait donc être couplé avec l'emploi d'un système d'amplification, soit du signal de révélation, soit du matériel nucléique à détecter. La culture cellulaire susceptible d'assurer ce rôle d'amplification ne pouvant pas être utilisée, la voie d'amplification par Polymerase Chain Reaction (PCR), que nous nous proposons de tester dans un proche avenir, devrait lever l'écueil de la sensibilité du test d'hybridation moléculaire et ainsi permettre d'amorcer une large étude épidémiologique et préciser l'incidence des affections à BECV dans l'ensemble des maladies entériques bovines.

ANNEXES

ANNEXE 1 - Traitement du matériel et des réactifs utilisés en biologie moléculaire

L'ensemble de l'expérimentation est réalisée avec du matériel stérilisé.

Pour la manipulation de petites quantités d'ARN ou d'ADN, les tubes Eppendorf et les cônes pour pipettes automatiques sont siliconés afin de limiter les pertes par adsorption sur les parois (MANIATIS - 1982).

Les ARN étant très sensibles à l'action des RNases, leur manipulation nécessite de prendre certaines précautions :

- Il est préférable d'utiliser des récipients en matière plastique à usage unique et stériles, considérés comme exempts de RNase.
- La verrerie est traitée par chauffage à 250°C pendant au moins 4 h.
- L'eau et les solutions sont additionnées de 0,1 % de DEPC (inhibiteur de RNase) et incubées à 37°C pendant 12 h, puis autoclavées à 120°C pendant 15 min.
- De l'eau traitée au DEPC est utilisée pour préparer les solutions à base de tris qui est instable en présence de ce réactif.
- Le port de gants à usage unique est indispensable afin d'éviter toute contamination des solutions en cours de manipulations.

ANNEXE 2 : Extraction des acides nucléiques au phénol-chloroforme

La solution d'acides nucléiques est additionnée d'un égal volume de phénol saturé ou d'un mélange phénol-chloroforme (v/v).

Après 5 min d'agitation, l'émulsion est centrifugée 15 s afin de séparer la phase aqueuse de la phase organique. La phase aqueuse supérieure contenant les acides nucléiques en solution est récupérée. Deux à trois extractions sont ainsi réalisées successivement, suivies d'une à deux extractions avec un mélange chloroforme-alcool isoamylique (24 v/1 v).

ANNEXE 3 : Concentration des acides nucléiques

Les acides nucléiques sont précipités par l'éthanol en présence d'une concentration en cations monovalents de l'ordre de 0,3 M.

Cette concentration en cations monovalents est obtenue :

- en diluant l'échantillon dans du tampon TE lorsque la solution d'acides nucléiques est fortement concentrée en sels.

- en ajoutant la quantité nécessaire d'une solution d'acétate de sodium 3 M si cette concentration est trop faible.

La solution d'acides nucléiques est ensuite mélangée à 2 à 3 volumes d'éthanol et conservée 1 à 2 h à 4°C.

Le mélange est centrifugé 30 à 45 min à 12 000 g, puis le surnageant est éliminé. Le précipité est lavé avec une solution d'éthanol à 70 %, séché et dissous dans le tampon et le volume souhaité, puis conservé à - 20°C.

ANNEXE 4 : Mesure de la quantité d'acides nucléiques

La détermination de l'absorbance à 260 nm d'une solution d'ADN ou d'ARN permet de calculer sa concentration en acides nucléiques.

- 1 UA = 50 µg/ml d'ADN double brin
- 1 UA = 40 µg/ml d'ARN ou d'ADN simple brin

Le rapport des absorbances à 260 nm et 280 nm permet d'évaluer la pureté de l'acide nucléique.

$$A \frac{260}{280} = 1,8 \quad \text{dans le cas d'un ADN pur}$$

$$A \frac{260}{280} = 2 \quad \text{dans le cas d'un ARN pur}$$

ANNEXE 5 : Détection de la radioactivité

Radioactivité liée aux virus marqués

Le comptage des échantillons aqueux est réalisé dans l'Instagel, liquide scintillant accepteur d'eau. Il est possible d'homogénéiser 1 ml d'échantillon aqueux dans 10 ml de liquide scintillant. La radioactivité est mesurée au compteur à scintillation liquide.

Radioactivité liée à l'ADN

La détermination de la radioactivité liée à l'ADN est réalisée par précipitation des acides nucléiques à l'acide trichloracétique (TCA). En effet, seules vont précipiter les macromolécules et non les nucléotides libres.

La précipitation est réalisée sur 1 à 2 µl de l'échantillon. Lorsque la quantité de matériel est trop faible, il est nécessaire d'ajouter 100 µl d'une solution d'ADN entraîneur (ADN de sperme de saumon dénaturé à 500 µg/ml dans de l'EDTA 20mM).

L'ADN est précipité par 5 ml d'une solution de TCA 10 % pendant 15 min à 0°C. Le précipité est filtré sur un disque de papier WHATMAN GF/C. Le filtre est abondamment rincé par du TCA 10 %, puis par 5 ml d'éthanol absolu, séché et déposé dans une fiole de liquide scintillant (cocktail T - Scintran).

En parallèle, la radioactivité totale de l'échantillon est mesurée, une fraction aliquote de 1 à 2 µl étant déposée sur un filtre WHATMAN GF/C et introduite, après séchage, dans une fiole de liquide scintillant.

Autoradiographie (PHILLIPS *et al.* - 1986)

- Directe

Le gel marqué au ^{32}P , fixé et séché, est mis en contact direct avec un film radiologique à température ambiante.

- En présence d'écran intensificateur (LASKEY - 1980)

Le film est intercalé entre le gel ou la membrane de nitrocellulose marqués au ^{32}P et un écran intensificateur. L'ensemble est placé à -80°C dans une cassette d'autoradiographie.

Dans tous les cas, les films sont développés avec les produits KODAK (révélateur LX24 et fixateur AL4).

ANNEXE 6 : Microscopie électronique

L'observation des suspensions virales nécessite une coloration négative au phosphotungstate de sodium à 2 % (pH 6,8). La grille carbonée est déposée pendant 2 min sur une goutte de la suspension virale dont l'excès est ensuite éliminé. Puis elle est transportée sur une goutte de colorant pendant 2 min, et séchée.

Lorsque la suspension virale contient des molécules de saccharose (purification du virus), une double coloration négative est réalisée, la grille étant transportée successivement sur deux gouttes de colorant pendant 1 à 2 min.

L'observation des grilles est réalisée à l'aide d'un microscope PHILIPS EM 300.

ANNEXE 7 : Préparation des tubes de dialyse

Des tubes de dialyse de 2,5 cm de large, coupés en morceaux de 10 à 20 cm, sont portés 10 min à ébullition dans un grand volume de tampon NaHCO_3 1 %, EDTA 1 mM, puis rincés abondamment à l'eau distillée, autoclavés 10 min à 120°C et conservés à 4°C (MANIATIS - 1982).

Ces tubes seront rincés à l'eau distillée avant usage et manipulés avec des gants.

BIBLIOGRAPHIE

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

AKASHI H., INABA Y., MIURA Y., SATO K., TOKUHISA S., ASAGI M. and HAYASHI Y. (1981)
Propagation of the kakegawa strain of bovine coronavirus in suckling mice, rats and hamsters.
Arch. Virol., 67 : 367-370.

ALBRETSON C., HAUKANES B.I., AASLAND R. and KLEPPE K. (1988)
Optimal conditions for hybridization with oligonucleotides : a study with *myc*-oncogene DNA probes.
Anal. Biochem., 170 : 193-202.

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

AMSTRONG J., NIEMANN H., SMEEKENS S., ROTTIER P. and WARREN G. (1984)
Sequence and topology of a model intracellular membrane protein E1 glycoprotein from a coronavirus.
Nature, 308 : 751-753.

AMSTRONG J., SMEEKENS S. and ROTTIER P. (1983)
Sequence of the nucleocapsid gene from murine coronavirus MHV-A59.
Nucl. Acids Res., 11 : 883-891.

ANDERSON M.L.M. and YOUNG B.D. (1988)
Quantitative filter hybridization.
In "Nucleic acid hybridization - a practical approach", HAMES B.D., HIGGINS S.J. (eds), I.R.L. Press, 4 : 73-111.

ARGENZIO R.A. (1985)
Pathophysiology of neonatal calf diarrhea.
Vet. Clinics of North America, Large Animal, 1 : 461-470.

AVRAMEAS S., GOUD B. et DODIN A. (1983)
Technologie nouvelle pour la recherche directe dans les eaux de bactéries ou de virus pathogènes pour l'homme et les animaux.
Rapport final de contrat n° 802404, 12 p.

AVRAMEAS S. and TERNYNCK T. (1969)
The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for preparation of immunoadsorbents.
Immunochemistry, 6 : 53-66.

BAILY J.M., KLEMENT J.F. and McALLISTER W.T. (1983)
Relationship between promoter structure and template specificities exhibited by the bacteriophage T₃ and T₇ RNA polymerases.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80 : 2814-2818.

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

BARNETT B.B., SPLENDLOVE R.S., PETERSON M.W., HSU L.Y.,
LA SALLE V.A. and EGBERT L.N. (1975)
Immunofluorescent cell assay of neonatal calf diarrhea virus.
Can. J. Comp. Med., 39 : 462-465.

BELAK S. and BALLAGI-PORDANY A. (1990)
Detection of bovine leukemia virus and bovine viral diarrhoea virus by the polymerase chain reaction and by oligonucleotides probes.
Abstracts VIII th International Congress of Virology, Berlin.

BERIL C. et SCHWARTZBROD L. (1989)
Détection des rotavirus dans les moules.
Microbiol. Alim. Nut., 10 : 61-69.

BERNINGER M., HAMMER M., HOYER B. and GERIN L. (1982)
An assay for the detection of the DNA genome of hepatitis B virus in serum.
J. Med. Virol., 9 : 57-68.

BINNS M.M., BOURSNEILL M.E.G., CAVANAGH D., PAPPIN D.J.C.
and BROWN T.D.K. (1985a)
Cloning and sequencing of the gene encoding the spike protein of the coronavirus IBV.
J. Gen. Virol., 66 : 719-726.

BINNS M.M., BOURSNEILL M.E.G., FOULDS I.J. and BROWN T.D.K. (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.

BIRNBOIM H.C. and DOLY J. (1979)
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucl. Acids Res., 7 : 1513-1523.

- BITTON G., FELDBERG B.N. and FARRAH S.R. (1979)
Concentration of enteroviruses from seawater using non-fat dry milk and casein.
Water Air Soil Pollut., 12 : 187-195.
- BLOCK J.C., JORET J.C., MORLOT M. et FOLIGUET J.M. (1978)
Recherche des entérovirus dans les eaux superficielles par adsorption-élution sur microfibre de verre.
Techn. Sci. Munic., L'eau, 3 : 181-184.
- BLOCK J.C. and SCHWARTZBROD L. (1989)
Viruses in water systems : detection and identification.
VCH Publishers, New-York, 136 p.
- BOBULESCO P. (1983)
Etude des protéines structurales du coronavirus entérique bovin. Comparaison structurale et antigénique avec une souche de coronavirus entérique d'origine humaine.
Thèse de doctorat de 3^è Cycle, Université de Paris VII, 79 p.
- BOFFEY S.A. (1983)
Plasmid isolation.
In : "Techniques in Molecular Biology", WALKER J.M., GAASTRA W. (eds), Croom Helm, 12 : 187-195.
- BOIREAU P., CRUCIERE C. and LAPORTE J. (1990)
Nucleotide sequence of the glycoprotein S gene of bovine enteric coronavirus and comparison with the S proteins of two mouse hepatitis virus strains.
J. Gen. Virol., 71 : 487-492.
- BORDENAVE G. (1977)
La préparation d'anticorps purs à l'aide d'immunoabsorbants.
Dans : "Les techniques de l'immunofluorescence et les réactions immuno-enzymatiques", FAURE M., DUPOUEY P., MORELEC M.J. (eds), Cours de l'Institut Pasteur, Maloine, Paris : 127-139.
- BOSCH A., PINT R.M., BLANCH A.R. and JOFFRE J. (1988)
Detection of human rotavirus in sewage through two concentration procedures.
Wat. Res., 22 : 343-348.
- BOURSNELL M.E.G., BINNS M.M., FOULDS I.J. and BROWN T.D.K. (1985)
Sequence of the nucleocapsid genes from two strains of avian infectious bronchitis virus.
J. Gen. Virol., 66 : 573-580.

- BOURSNELL M.E.G., BROWN T.D.K. and BINNS M.M. (1984)
Sequence of the membrane protein gene from avian coronavirus IBV.
Virus Res., 1 : 303-314.
- BOURSNELL M.E.G., BROWN T.D.K., FOULDS I.J., GRENN P.F.,
TOMLEY F.M. and BINNS M.M. (1987)
Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious
bronchitis virus.
J. Gen. Virol., 68 ; 57-77.
- BRADBURNE A.F. and TYRRELL D.A.J. (1971)
Coronaviruses of man.
Progr. Med. Virol., 13 : 373-403.
- BRAYTON P.R., GANGES R.G. and STOHLMAN S.A. (1981)
Host cell nuclear fonction and murine hepatitis virus replication.
J. Gen. Virol., 56 : 457-460.
- BRAYTON P.R., LAI M.M.C., PATTON D.F. and STOHLMAN S.A. (1982)
Characterization of two RNA polymerase activities induced by mouse
hepatitis virus.
J. Virol., 42 : 847-853.
- BRAYTON P.R., STOHLMAN S.A. and LAI M.M.C. (1984)
Further characterization of mouse hepatitis virus RNA-dependent RNA
polymerases.
Virology, 133 : 197-201.
- BRIAN D.A., DENNIS D.E. and GUY J.S. (1980)
Genome of porcine transmissible gastroenteritis virus.
J. Virol., 34 : 410-415.
- BRIDGER J.C., WOODE G.N. and MEYLING A. (1978)
Isolation of coronaviruses from neonatal calf diarrhea in Great Britain and
Denmark.
Vet. Microbiol., 3 : 101-113.
- BROES A., OPDENBOSCH E.V. et WELLEMANS G. (1984)
Isolement d'un coronavirus chez des bovins atteints d'entérite hémorragique
hivernale (Winter dysentery) en Belgique.
Ann. Méd. Vét., 128 : 299-303.
- BROWN T.D.K., BOURSNELL M.E.G. and BINNS M.M. (1984)
A leader sequence is present on mRNA A of avian infectious bronchitis virus.
J. Gen. Virol., 65 : 1437-1442.

BRUGERE-PICOUX J. (1985)

La réhydratation chez les veaux diarrhéiques.

Rec. Méd. Vét., 161 : 257-274.

BRUN A., DAUVERGNE M., ESPINASSE J., RAYNAUD G.

and SOULEBOT J.P. (1982)

Prevention of viral gastroenteritis in newborn calves using an inactivated bivalent vaccine.

Congrès International des Maladies du bétail, Amsterdam.

BUDZILOWICZ C.J., WILCZYNSKI S.P. and WEISS S.R. (1985)

Three intergenic regions of coronavirus mouse hepatitis virus strain A59 genome RNA contain a common nucleotide sequence that is homologous to the 3' end of the viral mRNA leader sequence.

J. Virol., 53 : 834-840.

BUREAU D. and DAUSSANT J. (1981)

Immunoaffinity chromatography of proteins, a gentle and simple desorption procedure.

J. Immunol. Meth., 41 : 387-392.

CARTWRIGHT S.F., HARRIS H.M., BLANDFORD T.B., FINCHAM I.

and GITTER M. (1965)

A cytopathic virus causing a transmissible gastroenteritis in swine. I. Isolation and properties.

J. Comp. Path., 75 : 387-396.

CASEY J. and DAVIDSON N. (1977)

Rates of formation and thermal stabilities of RNA:DNA and DNA:DNA duplexes at high concentrations of formamide.

Nucl. Acids Res., 4 : 1539-1552.

CAUL E.O. and EGGLESTONE S.I. (1977)

Further studies on human enteric coronaviruses.

Arch. Virol., 54 : 107-117.

CAVANAGH D. (1983)

Coronavirus IBV : structural characterization of the spike protein.

J. Gen. Virol., 64 : 2577-2580.

CAVANAGH D., BRIAN D.A., ENJUANES L., HOLMES K.V., LAI M.M.C., LAUDE H., SIDDELL S.G., SPAAN W., TAGUCHI F. and TALBOT P.J. (1990)

Recommandations of the coronavirus study group for the nomenclature of the structural proteins, mRNAs and genes of coronaviruses.

Virology, 176 : 306-307.

- CAVANAGH D. and DAVIS P.J. (1986)
 Coronavirus IBV : removal of spike glycopolyptide S1 by urea abolishes infectivity and hemagglutination but no attachment to cells.
 J. Gen. Virol., 67 : 1443-1448.
- CANAVAGH D. and DAVIS P.J. (1987)
 Coronavirus IBV : relationship among recent European isolates studied by limited proteolysis of the virion glycopolyptides.
 Avian Pathology, 16 : 1-13.
- CHANY C., MOSCOVICI O., LEBON P. and ROUSSET S. (1982)
 Association of coronavirus infection with neonatal necrotizing enterocolitis.
 Pediatrics, 69 : 209-214.
- CHALON M.P. , MILNE R.W. and VAERMAN J.P. (1979)
 Interactions between mouse immunoglobulins and staphylococcal protein A.
 Scand. J. Immunol., 9 : 359-364.
- CHOU S.M.D., THOMAS C. and MERIGAN M.D. (1983)
 Rapid detection and quantitation of human cytomegalovirus in urine through DNA hybridization.
 N. Eng. J. Med. 306 : 921-924.
- COHEN S.N., CHANG A.C.Y. and HSU L. (1972)
 Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria : genetic transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA.
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69 : 2110-2114.
- COMPTON S.R., ROGERS D.B., HOLMES K.V., FERTSCH D., REMENICK J. and Mc GOWAN J.J. (1987)
In vitro replication of mouse hepatitis virus strain A59.
 J. Virol., 61 : 1814-1820.
- CROUCH C.F., RAYBOULD T.J.G. and ACRES S.D. (1984)
 Monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine enteric coronavirus.
 J. Clin. Microb., 19 : 388-393.
- CRUCIERE C. (1988)
 Contribution à l'étude d'un coronavirus : analyse des ARN poly (A+) induits lors de la réplication du coronavirus entérique bovin. Détermination et analyse de la séquence de sa nucléocapside.
 Thèse de Doctorat de Biochimie, Université de Paris, VII, 148 p.

- CRUCIERE C. and LAPORTE J. (1988)
Sequence and analysis of bovine enteritic coronavirus (F15) genome. I
Sequence of the gene coding for the nucleocapsid protein ; analysis of the
predicted protein.
Ann. Inst. Pasteur Virol., 139 : 123-138.
- CYR-COATS K.S., STORZ J., HUSSAIN K.A. and SCHNORR K.L. (1988)
Structural proteins of bovine coronavirus strain L9 : effects of the host cell and
trypsin treatment.
Arch. Virol., 103 : 35-45.
- CZERNY C.P. and EICHHORN W. (1989)
Characterization of monoclonal and polyclonal antibodies of bovine enteric
coronavirus : establishment of an efficient ELISA for antigen detection in feces.
Vet. Microbiol., 20 : 111-122.
- DAVID F., RUIZ J.C. et LUCOTTE G. (1989)
Notre expérience de la détection de l'ADN du virus de l'hépatite B par
hybridation moléculaire.
Immunoanal. Biol. Spéc. 17 : 43-47.
- DEA S., ROY R.S. and BEGIN M.E. (1980)
Bovine coronavirus isolation and cultivation in continuous cell lines.
Am. J. Vet. Res. 41 : 30-38.
- DEETZ T.R., SMITH E.R., GOYAL S.M., GERBA C.P., VOLLET J.J., TSAI L.,
DUPONT H.L. and KESWICK B.H. (1984)
Occurrence of rota - and enteroviruses in drinking water and environmental
water in a developing nation.
Wat. Res., 18 : 567-571.
- DE GROOT R.J., MADURO J., LENSTRA J.A., HORZIMEK M.C.,
VAN DER ZEUST B.A.M. and SPAAN W.J.M. (1987)
cDNA cloning and sequence analysis of the gene encoding the peplomer
protein of feline infectious peritonitis virus.
J. Gen. Virol., 68 : 2639-2646.
- DENNIS D.E. and BRIAN D.A. (1982)
RNA-dependent RNA polymerase activity in coronavirus-infected cells.
J. Virol., 42 : 153-164.
- DEREGT D., SABARA M. and BABIUK L.A. (1987)
Structural proteins of bovine coronavirus and their intracellular processing.
J. Gen. Virol., 68 : 2863-2877.

- DOUGHRI A.M. and STORZ J. (1977)
Light and ultrastructural pathologic changes in intestinal coronavirus infection of newborn calves.
Zbl. Vet. Med. B., 24 : 367-385.
- EFSTRATIADIS A. and VILLA-KOMAROFF L. (1979)
Cloning of double-stranded cDNA.
In "Genetic engineering : Principles and Methods", SETLOW J.K. HOLLANDER A. (eds), Plenum Press, New York : 15-36.
- EL-GHORR A.A., SNODGRASS D.R. and SCOTT F.M.M. (1988)
Evaluation of an immunogold electron microscopy technique for detecting bovine coronavirus.
J. Vir. Meth., 19 : 215-224.
- EL-GHORR A.A., SNODGRASS D.R., SCOTT F.M.M. and CAMPBELL Z. (1989)
A serological comparison of bovine coronavirus strains.
Arch. Virol., 104 : 241-248.
- ELLENS D.J., VAN BALKEN J.A.M. and DELEEUW P.W. (1978)
Diagnosis of bovine coronavirus infections with hemadsorption-elution-hemagglutination assay (HEHA) and with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
Proceedings of the Second International Symposium on Neonatal Diarrhea, Saskatoon : 321-329.
- ENNS R.K. (1988)
DNA probes : an overview and comparison with current methods.
Lab. Med., 19 : 295-300.
- ESTOLA T. (1966)
Studies on the infectious bronchitis virus of chickens isolated in Finland with reference to the serological survey of its occurrence.
Acta Vet. Scand. Suppl., 18 : 1-111.
- ESTOLA T. (1967)
Sensitivity of suckling mice to various strains of infectious bronchitis virus.
Acta. Vet. Scand., 8 : 86-87.
- EY P.L., PROWSE S.J. and JENKIN C.R. (1978)
Isolation of pure IgG₁, IgG_{2a} and IgG_{2b} immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose.
Immunochemistry, 15 : 429-436.
- FARRAH S.R. and BITTON G. (1978)
Elution of poliovirus adsorbed to membrane filters.
Appl. Env. Microbiol., 36 : 982-984.

FARRAH S.R. and BITTON G. (1979)
Low molecular weight substitutes for beef extract as eluents for poliovirus adsorbed to membrane filters.
Can. J. Microbiol., 25 : 1045-1051.

FARRAH S.R., GOYAL S.M., GERBA C.P., WALLIS C.
and SHAFFER P.T.B. (1976)
Characteristics of humic acid and organic compounds concentrated from tapwater using the aquella virus concentrator.
Water Res., 10 : 897-901.

FEDIDA M., MARTEL J.L., PERRIN B., MOUSSA A. et COUDERT M. (1983)
Enquêtes épidémiologiques réalisées en France sur les diarrhées néonatales.
Rec. Méd. Vét., 159 : 191-201.

FEINBERG A.P. and VOGELSTEIN B. (1983)
A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.
Anal. Biochem. 132 : 6-13.

FLEWETT T.H. (1978)
Electron microscopy in the diagnosis of infectious diarrhea.
J. Am. Vet. Med. Ass., 173 : 538-543.

FLORES J., PURCELL R.H., PEREZ I., WYATT R., BOEGGEMAN E.,
SERENO M., WHITE L., CHANOCK R.M. and KAPIKIAN A.Z. (1983)
A dot hybridization assay for detection of rotavirus.
Lancet, 12 : 555-558.

FOLIGUET J.M., LAVILLAUREIX J. et SCHWARTZBROD L. (1973)
Virus et eaux : Mise en évidence des virus dans le milieu hydrique.
Rev. Epidem. Mec. Soc. Santé Publ., 21 : 185-259.

FORDE B.G. (1983a)
Synthesis of cDNA for molecular cloning.
In : "Techniques in Molecular Biology" WALKER J.M., GAASTRA W. (eds),
Croom Helm, 9 : 167-184.

FORDE B.G. (1983b)
Molecular cloning of cDNA : bacterial transformation and screening of transformants.
In : "Techniques in Molecular Biology" WALKER J.M., GAASTRA W. (eds),
Croom Helm, 12 : 221-238.

FREMONT Y. (1981)
Utilisation d'un vaccin à virus vivant contre le rotavirus et le coronavirus.
Bull. GTV, 5 : 5-14.

FREMONT Y. (1983)

Vaccination antirotavirus et anticoronavirus chez les bovins. Eléments pratiques du choix entre les vaccinations de la vache et du veau. *Rec. Méd. Vét.*, 159 : 345-349.

GERDES J.C., KLEIN L., DEVALD B.L. and BURKS J.S. (1981)

Coronavirus isolates SK and SD from multiple sclerosis patients are serologically related to murine coronaviruses A59 and JHM and human coronavirus OC43 but not to human coronavirus 229E. *J. Virol.*, 38 : 231-238.

GILLESPIE D. and SPIEGELMAN S. (1965)

A quantitative assay for DNA : RNA hybridization with DNA immobilized on a membrane. *J. Mol. Biol.*, 12 : 829-842.

GOUET P., CONTREPOIS M., DUBOURGUIER H.C., RIOU Y., SCHERRER R., LAPORTE J., VAUTHEROT J.F., COHEN J. and L'HARIDON R. (1978)

The experimental production of diarrhoea in colostrum deprived axenic and gnotoxenic calves with enteropathogenic *E. coli*, rotavirus, coronavirus and a combined infection of rotavirus and *E. coli*. *Am. J. Vet. Res.*, 43 : 41-49.

GOYAL S.A. and GERBA C.P. (1983)

Viradel method for detection of rotavirus from seawater. *J. Virol. Methods*, 7 : 279-285.

GRINSTED J. and BENNETT P. (1984)

Isolation and purification of plasmid DNA. *Meth. Microbiol.*, 17 : 121-131.

GUBLER U. and HOFFMAN B.J. (1983)

A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene*, 25 : 263-269.

GUESDON J.L. and AVRAMEAS S. (1976)

Polyacrylamide-agarose beads for the preparation of effective immuno-adsorbents. *J. Immunol. Methods*, 11 : 129-133.

GUESDON J.L. and AVRAMEAS S. (1977)

Magnetic solid phase enzyme-immunoassay. *Immunochemistry*, 14 : 443-447.

- GUESDON J.L., COURCON J. and AVRAMEAS S. (1978)
Magnetically responsive polyacrylamide agarose beads for the preparation of immunoabsorbents.
J. Immunol. Meth., 21 : 59-63.
- HECKERT R.A., SAIF L.J. and MYERS G.W. (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. Microb., 19 : 217-231.
- HESS R.G. and BACHMANN P.A. (1976)
In vitro differentiation and pH sensitivity of field and cell culture-attenuated strains of transmissible gastroenteritis virus.
Infect. Immun., 13 : 1642-1646.
- HIENZLE T.E., ABRAHAM S., HOGUE B.G. and BRIAN D.A. (1990)
Structure and orientation of expressed bovine coronavirus hemagglutinin-esterase protein.
J. Virol., 64 : 1834-1838.
- HIERHOLZER J.C. (1976)
Purification and biophysical properties of human coronavirus 229 E.
Virology, 75 : 155-165.
- HILL W.F., JAKUBOWSKI W., AKIN E.W. and CLARKE N.A. (1976)
Detection of virus in water : sensitivity of the tentative standard method for drinking water.
Appl. Env. Microbiol., 31 : 254-261.
- HILZ H., WIEGERS V. and ADAMIETZ P. (1975)
Stimulation of proteinase K action by denaturing agents : application to the isolation of nucleic acids and the degradation of "masked proteins".
Eur. J. Biochem., 56 : 103-108.
- HOGUE B.G. and BRIAN D.A. (1986)
Structural proteins of human respiratory coronavirus OC43.
Virus Res., 5 : 131-144.
- HOLMES K.V. (1986)
Replication of coronaviruses.
In "Fundamental Virology", FIELDS B.N., KNIPE D.M. (eds), Raven Press, New-York, 768 p.
- HOLMES K.V. and BEHNKE J.N. (1981)
Evolution of a coronavirus during persistent infection *in vitro*.
In "Biochemistry and Biology of coronavirus". TERMEULEN V., SIDDELL S., WEGE H. (eds), Plenum Press, New-York, 142 : 287-299.

- HOLMES K.V., DOLLER E.W. and STURMAN L.S. (1981)
Tunicamycin-resistant glycosylation of a coronavirus glycoprotein :
demonstration of novel type of viral glycoprotein.
Virology, 115 : 334-344.
- HOMMA A., SOBSEY M.D., WALLIS C. and MELNICK J.L. (1973)
Virus concentration from sewage.
Water Res., 7 : 945-950.
- HORZINEK M.C., LUTZ H. and PEDERSEN N.C. (1982)
Antigenic relationships among homologous structural polypeptides of
porcine, feline and canine coronaviruses.
Infection and Immunity, 37 : 1148-1155.
- HUDSON D. and JOHNSON J. (1986)
Management of diarrhea in neonatal beef calves.
Med. Vet. Pract., 68 : 132-136.
- HUNT E. (1985)
Age predisposition of diarrheal disease in the neonatal calf.
Vet. Clinics of North America, Large Animal, 1 : 653-654.
- JACOBS L., SPAAN W.J.M., HORZINEK M.C.
and VAN DER ZEIJST B.A.M. (1981)
Synthesis of subgenomic mRNA's of mouse hepatitis virus is initiated
independently : evidence from UV transcription mapping.
J. Virol., 39 : 401-406.
- JESTIN A., FOULON T., PERTUISET B., BLANCHARD P.
and LABOURDET M. (1990)
Rapid detection of pseudorabies virus genomic sequences in biological samples
from infected pigs using polymerase chain reaction DNA amplification.
Vet. Microbiol., 23 : 317-328.
- JIMENEZ G., CORREA I., MELGOSA M.P., BULLIDO M.J.
and ENJUANES L. (1986)
Critical epitopes in transmissible gastroenteritis virus neutralization.
J. Virol., 60 : 131-139.
- JOFRE J., BLASI M., BOSCH A. and LUCENA F. (1989)
Occurrence of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* and other viruses in
polluted marine sediments.
Wat. Sci. Tech., 21 : 15-19.

JORET J.C. (1981)

Etudes comparatives de méthodes de concentration des virus : applications au milieu hydrique.

Thèse de doctorat d'Université en Sciences Naturelles,
Université de Nancy I : 180 p.

KAFATOS F.C., JONES C.W. and EFSTRATIADIS A. (1979)

Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure.

Nucl. Acids Res., 7 : 1541-1552.

KAPIKIAN A.Z., JAMES H.D.Jr., KELLY S.J., DEES J.H., TURNER H.C.,
McINTOSH K., KIM H.W., PARROTT R.H., VINCENT M.M.
and CHANOCK R.M. (1969)

Isolation from man of "avian infectious bronchitis virus-like" viruses (coronaviruses) similar to 229E virus, with some epidemiological observations.

J. Infect. Dis., 119 : 282-290.

KAPKE P.A. and BRIAN D.A. (1986)

Sequence analysis of the porcine transmissible gastroenteritis coronavirus nucleocapsid protein gene.

Virology, 151 : 41-49.

KAPKE P.A., TUNG F.Y.T., HOGUE B.G., BRIAN D.A., WOODS R.D.
and WESLEY R. (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.

KEENAN K.P., JERVIS H.R., MARCHWICKI R.H. and BINN L.N. (1976)

Intestinal infection of neonatal dogs with canine coronavirus 1-71 : Studies by virologic, histologic and immunofluorescent techniques.

Am. J. Vet. Res., 37 : 247-256.

KESSICK M.A. and WAGNER R.A. (1978)

Electrophoretic mobilities of virus adsorbing filter materials.

Water Res., 12 : 263-268.

KIEVITS T., GEMEN B.V., SOOKNAMAN R. and LENS P.F. (1990)

Enzymatic amplification of nucleic acids *in vitro* at one temperature.

Abstracts VIII th International Congress of Virology, Berlin.

KING B. and BRIAN D.A. (1982)

Bovine coronavirus structural proteins.

J. Virol., 42 : 700-701.

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

KLENK H.D. and ROTT R. (1981)
Cotranslational and posttranslational processing of viral glycoproteins.
Curr. Top. Microbiol. Immunol., 90 : 19-48.

KNOBLER R.L., TUNISON L.A., LAMPERT P.W. and OLDSTONE M.A. (1982)
Selected mutants of mouse hepatitis virus type 4 (JHM-strain) induce different CNS diseases. Pathobiology of disease induced by wild type and mutants ts 8 and Ts15 in Balb/c and SJL/J mice.
Am. J. Pathol., 109 : 157-168.

KOHLER G. and MILSTEIN C. (1975)
Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.
Nature, London, 256 : 495-497.

KRONVALL G., SEAL U.S., FINSTAD J. and WILLIAMS R.C.Jr. (1970)
Phylogenetic insight into evolution of mammalian Fc fragment of γ G globulin using staphylococcal protein A.
J. Immunol., 104 : 140-147.

KRUSE P.E. (1983)
The importance of colostral immunoglobulins and their absorption from the intestine of the newborn animals.
Ann. Rech. Vet., 14 : 349-353.

LAEMMLI U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature, 227 : 680-685.

LAI M.M.C., BARIC R.S., BRAYTON P.R. and STOHLMAN S.A. (1984)
Characterization of leader RNA sequences on the virion and mRNAs of mouse hepatitis virus, a cytoplasmic RNA virus.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 81 : 3626-3630.

LAI M.M.C., PATTON C.D., BARIC R.S. and STOHLMAN S.A. (1983)
Presence of leader sequences in the mRNA of mouse hepatitis virus.
J. Virol., 46 : 1027-1033.

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

LAI M.M.C., and STOHLMAN S.A. (1978)
RNA of mouse hepatitis virus.
J. Virol., 26 : 236-242.

LAMARRE A. and TALBOT P.J. (1989)
Effect of pH and temperature on the infectivity of human coronavirus 229E.
Can. J. Microbiol., 35 : 972-974.

LANDRY M.L. and FONG C.K.Y. (1986)
Nucleic acid hybridization in the diagnosis of viral infectious (Review).
Clin. Lab. Med., 5 : 513-529.

LANGONE J.J. (1982)
Protein A of *Staphylococcus aureus* and related immunoglobulin receptors produced by *Streptococci* and *Pneumococci*.
Adv. in Immunol., 32 : 157-253.

LAPORTE J. and BOBULESCO P. (1981a)
Growth of human and canine enteritic coronaviruses in a highly susceptible cell line : HRT 18.
In "Perspectives in Virology" Pollard M (ed), New York, XI : 189-193.

LAPORTE J. and BOBULESCO P. (1981b)
Polypeptide structure of bovine enteritic coronavirus : comparison between a wild strain purified from feces and a HRT 18 cell adapted strain.
In "Biochemistry and Biology of coronavirus", TER MEULEN V., SIDDELL S., WEGE H. (eds), Plenum Press, New-York, 142 : 181-184.

LAPORTE J., BOBULESCO P. et ROSSI F. (1980)
Une lignée cellulaire particulièrement sensible à la réplication du coronavirus entérique bovin : les cellules HRT 18.
C. R. Acad. Sc., Paris, Série D, 290 : 623-626.

LAPORTE J., L'HARIDON R. and BOBULESCO P. (1979)
In vitro culture of bovine enteritic coronavirus (BEC).
Colloques de l'INSERM "Enterites virales chez l'homme et l'animal", 90 : 99-102.

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

LARSON D.J., MOREHOUSE L.G., SOLORZANO R.F. and KINDEN D.A. (1979)
Transmissible gastroenteritis in dogs : experimental intestinal infection with transmissible gastroenteritis virus.
Am. J. Vet. Res., 40 : 477-486.

- LASKEY R.A. (1980)
The use of intensifying screens or organic scintillator of visualizing radioactive molecules resolved by gel electrophoresis.
Meth. Enzymol., 65 : 363-371.
- LAUDE H., CHARLEY B. and GELFI J. (1984)
Replication of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) in swine alveolar macrophages.
J. Gen. Virol., 65 : 327-332.
- LAUDE H., RASSCHAERT D. and HUET J.C. (1987)
Sequence and N-terminal processing of the transmembrane protein E1 of the coronavirus transmissible gastroenteritis virus.
J. Gen. Virol., 68 : 1687-1693.
- LAVAL A., VALIERGUE H. et LAURENT J.L. (1988)
Pathologie digestive du veau en élevage allaitant.
Rec. Méd. Vét., 164 : 551-564.
- LEARY J.J., BRIGATI D.J. and WARD D.C. (1983)
Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose : *bio-blots*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80 : 4045-4049.
- LEMON S.M., BINN L.N. and MARCHWICKI R.H. (1983)
Radioimmunofocus assay for quantification of hepatitis A virus in cell cultures.
J. Clin. Microbiol., 17 : 834-839.
- LE PREVOST C., VIRELIZIER J.L. and DUPUY J.M. (1975)
Immunopathology of mouse hepatitis virus type 3 infection.
III-Clinical and virologic observation of a persistent viral infection.
J. Immunol., 115 : 640-643.
- LEVY-LEBLOND E., OTH D. and DUPUY J.M. (1979)
Genetic study of mouse sensitivity to MHV-3 infection : influence of the H-2 complex.
J. Immunol., 122 : 1359-1362.
- LEWIS L.D. and PHILLIPS R.W. (1972)
Water and electrolyte losses in neonatal calves with acute diarrhea. A complete balance study.
Cornell Vet., 62 : 596-607.
- LEWIS L.D. and PHILLIPS R.W. (1978)
Pathophysiologic changes due to coronavirus induced diarrhea in the calf.
JAVMA, 173 : 636-638.

L'HARIDON R., SCHERRER R., VAUTHEROT J.F., LA BONNARDIERE C., LAPORTE J. and COHEN J. (1981)

Adaptation d'un isolement de coronavirus entérique bovin à la culture cellulaire et caractérisation de la souche obtenue.

Ann. Rech. Vét., 12 : 243-251.

LIU S., BIRCH C., COULEPIS A. and GUST I. (1984)

Radioimmunofocus assay for detection and quantitation of human rotavirus.

J. Clin. Microbiol., 20 : 347-350.

LIZARDI P.M., GUERRA C.E., LOMELI H., TUSSIE-LUNA I. and KRAMER F.R. (1988)

Exponential amplification of recombinant-RNA hybridization probes.

Biotechnol., 6 : 1197-1202.

LUCENA-GUTIERREZ F. (1979)

Contribution à l'étude de la concentration des virus par adsorption-élution sur poudre de verre. Application à la recherche des virus dans le milieu hydrique. Thèse de doctorat de 3^e Cycle de Nutrition, Sciences de l'Alimentation et Biochimie Appliquée, Université de Nancy I : 172 p.

LUNDIN A. and HALLANDER L.O.B. (1986)

Mechanisms of horseradish peroxidase catalysed luminol reaction in presence and absence of various enhancers.

J. Biol. Chemilumin., 1 : 186-187.

MACHAMER C.E. and ROSE J.K. (1987)

A specific transmembrane domaine of coronavirus E1 glycoprotein is required for its retention in the golgi region.

J. Cell. Biol., 105 : 1205-1214.

MACKENZIE M.R., WARNER N.L. and MITCHELL G.F. (1978)

The binding of murine immunoglobulins to staphylococcal protein A.

J. Immunol., 120 : 1493-1496.

MAC NAUGHTON M.R. (1978)

The genomes of three coronaviruses.

FEBS Letters, 94 : 191-194.

MAC NAUGHTON M.R., DAVIES H.A. and NERMUTH M.V. (1978)

Ribonucleoprotein-like structures from coronavirus particles.

J. Gen. Virol., 39 : 545-549.

MAC NAUGHTON M.R., HASONY H.J., MADGE M.H. and REED S.E. (1981)

Antibody to virus components in volunteers experimentally infected with HCV 229E group viruses.

Infect. Immun., 31 : 845-849.

- MAHY B.W.J., SIDDELL S., WEGE H. and TER MEULEN V. (1983)
RNA-dependent RNA polymerase activity in murine coronavirus infected cells.
J. Gen. Virol., 64 : 103-111.
- MALLUCCI L. (1966)
Effect of chloroquine on lysosomes and on growth of mouse hepatitis virus (MHV-3)
Virology, 28 : 355-362.
- MANDEL M. and HIGA A. (1970)
Calcium-dependent bacteriophage DNA infection.
J. Mol. Biol., 53 : 159-162.
- MANIATIS T., FRITSCH E. and SAMBROOK J. (1982)
Molecular cloning : a laboratory manual.
Ed. Cold Spring Harbor., 545 p.
- MARGOLIN A.B., HOWLETT M.J. and GERBA C.P., (1986)
Use of a cDNA *dot-blot* hybridization technique for detection of enteroviruses in water.
Proc. of Water quality technology, Am.Water Works Asan., Denver : 87-95.
- Mc DONNEL M.W., SIMON M.N. and STUDIER W.F. (1977)
Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels.
J. Mol. Biol., 110 : 119-146.
- Mc INTOSH K. (1974)
Coronavirus : a comparative review.
Curr. Tropics Microbiol. Immunol., 63 : 85-129.
- Mc INTOSH K. (1990)
Coronavirus.
In "Principles and Practice of Diseases". Eds MANDELL G.L., DOUGLAS R.G., BENNETT J.E. : 1251-1253.
- Mc INTOSH K., CHAO R.K., KRAUSE H.E., WASIL R., MOCEGA H.E. and MUFSON M.A. (1974)
Coronavirus infections in acute lower respiratory tract disease in infants.
J. Infect. Dis., 130 : 502-510.
- MEBUS C.A. (1978)
Pathogenesis of coronaviral infection calves.
J. Am. Vet. Med. Assoc., 173 : 631-632.

MEBUS C.A., NEWMAN L.E. and STAIR E.L. (1975)
Scanning electron light and immunofluorescent microscopy of intestine of gnotobiotic calf infected with calf diarrheal coronavirus.
Am. J. Vet. Res., 36 : 1719-1725.

MEBUS C.A., STAIR E.L., RHODES M.B. and TWIEHAUS M.J. (1973a)
Pathology of neonatal calf diarrhoea induced by a coronavirus-like agent.
Vet. Path., 10 : 45-64.

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

MEBUS C.A., TORRES-MEDINA A. and TWIEHAUS M.J. (1976)
Immune response to orally administered calf reovirus-like-agent and coronavirus vaccine.
Dev. Biol. Stand 33 : 396-403.

MELTON D.A., KRIEG P.A., REBAGLIATI M.R., MANIATIS T., ZINN K.
and GREEN M.R. (1984)
Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SPG promoter.
Nucl. Acids Res., 12 : 7035-7056.

MERRIL C.R., GOLDMAN D., SEDMAN S.A. and EBERT M.H. (1980)
Ultrasensitive strain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins.
Science, 211 : 1437-1438.

METCALF T.G., WALLIS C. and MELNICK J.L. (1974)
Environmental factors influencing isolation of enteroviruses from polluted surface waters.
Appl. Microbiol., 27 : 920-926.

MIFFLIN T.E. (1989)
Use and applications of nucleic acid probes in the clinical laboratory.
Clin. Chem., 35/9: 1819-1825.

MOCKETT A.P.A., CAVANAGH D. and BROWN T.D.K. (1984)
Monoclonal antibodies to the S1 spike and membrane proteins of avian infectious bronchitis coronavirus strain Massachusetts M41.
J. Gen. Virol., 65 : 2281-2286.

MONSAN P., PUZO G. et MAZARGUIL H. (1975)
Etude du mécanisme d'établissement des liaisons glutaraldéhyde-protéines.
Biochimie, 57 : 1281-1292.

- MOON H.W. (1978)
Mechanisms in the pathogenesis of diarrhea : a review.
J. Am. Vet. Med. Ass., 172 : 443-448.
- MORRIN M., LARIVIERE S. and LALLIER R. (1976)
Pathological and microbiological observations made on spontaneous cases of acute neonatal calf diarrhea.
Can. J. Comp. Med., 40 : 228-240.
- MOSCOVICI O., CHANY C., LEBON P., ROUSSET S. et LAPORTE J. (1980)
Association d'infection à coronavirus avec l'entérocolite hémorragique du nouveau-né.
C. R. Acad. Sc., Paris, 290 série D : 869-872.
- MOTSENBOCKER M.A. (1988)
Sensitivity limitations encountered in enhanced horseradish peroxidase catalysed chemiluminescence.
J. Biolum. Chemilum., 2 : 9-16.
- MURASUGI A. and WALLACE R.B. (1984)
Biotin-labeled oligonucleotides : enzymatic synthesis and use as hybridization probes.
D.N.A., 3 : 269-277.
- NIEMANN H. and KLENK H.D. (1981)
Glycoprotein E1 of coronavirus A59. A new type of viral protein.
In "Biochemistry and Biology of coronavirus", TER MEULEN V., SIDDELL S., WEGE H. (eds), Plenum Press, New-York : 119-132.
- OSTERHAUS A.D.M.E., HORZINEK M.C.
and WIRAHADIREJA R.M.S. (1978)
Feline infectious peritonitis virus. II-Propagation in suckling mouse brain.
Zbl. Vet. Med. B., 25 : 301-307.
- PARKER M.D., COX G.J., DEREGT D., FITZPATRICK D.R.
and BABIUK L.A. (1989)
Cloning and *in vitro* expression of the gene for the E3 haemagglutinin glycoprotein of bovine coronavirus.
J. Gen. Virol., 70 : 155-164.
- PARKER M.D., YOO D. and BABIUK L.A. (1990)
Expression and secretion of the bovine coronavirus hemagglutinin esterase glycoprotein by insect cells infected with recombinant baculoviruses.
J. Virol., 64 : 1625-1629.
- PATEL J.R., DAVIES H.A., EDINGTON N., LAPORTE J.
and MAC NAUGHTON M.R. (1982)
Infection of a calf with the enteric coronavirus strain Paris.
Arch. Virol., 73 : 319-327.

- PATTERSON S. and BINGHAM R.W. (1976)
Electron microscope observations on the entry of avian infectious bronchitis virus into susceptible cells.
Arch. Virol., 52 : 191-200.
- PAYMENT P., GERBA C.P. , WALLIS C. and MELNICK J.L. (1976)
Methods for concentrating viruses from large volumes of estuarine water on plated membranes.
Water Res., 10 : 893-896.
- PAYMENT P., TRUDEL M. et PAVILANIS V. (1978)
Evaluation de l'efficacité de la technique d'adsorption-élution du poliovirus 1 sur filtres en fibre de verre : application à l'analyse virologique de 100 ml à 1.000 l d'eau.
Can. J. Microbiol., 24 : 1413-1416.
- PAYNE H.R. and STORZ J. (1988)
Analysis of cell fusion induced by bovine coronavirus infection.
Arch. Virol., 103 : 27-33.
- PEACOCK S.L., MAC IVER C.M. and MONOHAN J.J. (1981)
Transformation of *E. coli* using homopolymer linked plasmid-chimeras.
Biochem. Biophys. Acta, 655 : 243-250.
- PEDERSEN N.C., WARD J. and MENGELING W.L. (1978)
Antigenic relationship of the feline infectious peritonitis virus to coronaviruses of other species.
Arch. Virol., 58 : 45-53.
- PENSAERT M. and CALLEBAUT P. (1978)
The coronaviruses. Clinical and structural aspects with some practical implications.
Ann. Med. Vet., 122 : 301-322.
- PERDUE E.M., BECK K.C. and REUTER J.H. (1976)
Organic complexes of iron and aluminium in natural waters.
Nature, London, 260 :418-420.
- PFLEIDERER M., SKINNER M.A. and SIDDELL S.G. (1986)
Coronavirus MHV-JHM : nucleotide sequence of the mRNA that encodes the membrane protein.
Nucl. Acids Res., 14 : 6338-6339.
- PHILLIPS C.A., SMITH A.G. and HAHN E.J. (1986)
Recent developments in autoradiography
in "Proceedings from the Second International Symposium on the Synthesis and Application of Isotopically Labelled Compounds.", MUCCINO R.R. (ed), Elsevier, New York : 189-194.

POMMIER P. et HUMBERT E. (1989)

Enquête sur les problèmes sanitaires et zootechniques liés à la qualité de l'eau de boisson en élevage.

Rec. Méd. Vét., 165 : 367-372.

RAMIA S. and SATTAR S.A. (1979)

Second step concentration of viruses in drinking and surface waters using polyethylene glycol hydroextraction.

Can. J. Microbiol., 25 : 587-592.

RASSCHAERT D. and LAUDE H. (1987)

The predicted primary structure of the peplomes protein E2 of the porcine coronavirus transmissible gastroenteritis virus.

J. Gen.Virol., 68 : 1883-1890.

RENZ M. and KURZ C. (1984)

A colorimetric method for DNA hybridization.

Nucl. Acids Res., 12 : 3435-3444.

RETZEL E.F., COLLET M.S. and FARA A.J. (1980)

Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid by the avian myeloblastosis retrovirus reverse transcriptase *in vitro* : optimum conditions required for transcription of large ribonucleic acid templates.

Biochemistry, 19 : 513-520.

REYNOLDS D.J. (1983)

Coronavirus replication in the intestinal and respiratory tracts during infection of calves.

Ann. Rech. Vet., 14 : 445-446.

REYNOLDS D.J., CHASEY D., SCOTT A.C. and BRIDGER J.C. (1984)

Evaluation of ELISA and electron microscopy for the detection of coronavirus and rotavirus in bovine faeces.

Vet. Rec., 114 : 397-401.

REYNOLDS D.J., DEBNEY T.G., HALL G.A., THOMAS L.H.

and PARSONS K.R. (1985)

Studies on the relationship between coronaviruses from the intestinal and respiratory tracts of calves.

Arch. Virol., 85 : 71-83.

RHONE MERIEUX (1984)

Pathologie néonatale du veau.

Biologie et chimiothérapie vétérinaire, 32 p.

- ROBBINS S.G., FRANA M.F., MAC GOWAN J.J., BOYLE J.F.
and HOLMES K.V. (1986)
RNA-binding proteins of coronavirus MHV : detection of monomeric and
multimeric N protein with an RNA overlay-protein blot assay.
Virology, 150 : 402-410.
- ROSETO A., VAUTHEROT J.F., BOBULESCO P. et GUILLEMIN M.C. (1982)
Isolement d'hybrides cellulaires secrétant des anticorps spécifiques du
coronavirus entérique bovin.
C.R. Acad. Sc. Paris, Série III, 294 : 347-351.
- ROTTIER P.J., AMSTRONG J. and MEYER D.J. (1985)
Signal recognition particle-dependent insertion of coronavirus E1, an
intracellular membrane glycoprotein.
J. Biol. Chem., 260 : 4648-4652.
- ROTTIER P.J., HORZINEK M.C. and VAN DER ZEIJST B.A.M. (1981a)
Viral protein synthesis in mouse hepatitis virus strain A59 infected cells :
effect of tunicamycine.
J. Virol., 40 : 350-357.
- ROTTIER P.J., LOCKER J.K., ROSE J.K. and GRIFFITHS G. (1990)
Coronavirus M glycoprotein: membrane topogenesis and intracellular
targeting.
VIII th International Congress of Virology, Berlin.
- ROTTIER P.J. and ROSE J.K. (1987)
Coronavirus E1 glycoprotein expressed from cloned cDNA localized in the
golgi region.
J. Virol., 61 : 2042-2045.
- ROTTIER P.J.M., SPAAN W.J.M., HORZINEK M.
and VAN DER ZEIJST B.A.M. (1981b)
Translation of three mouse hepatitis virus (MHV-A59) subgenomic RNAs in
Xenopus laevis oocytes.
J. Virol., 38 : 20-26.
- ROTTIER P.J., VRANDENBURG P., AMSTRONG J.,
VAN DER ZEIJST B.A.M. and WARREN G. (1984)
In vitro assembly of the murine coronavirus-membrane protein E1.
Adv. Exp. Med. Biol., 173 : 53-64.
- ROYCHOUDBURY R., JAY E. and WU R. (1976)
Terminal labeling and addition of homopolymer tracts to duplex DNA
fragments by terminal desoxynucleotidyl transferase.
Nucl. Acids Res., 3 : 863-877.

- RUNNELS P., MOON H.W., WHIPP S.C., MATHEWS P.J.
and WOOD G.N. (1980)
Interaction of rotavirus and enterotoxigenic *Escherichia coli* (E.T.E.C.) in
gnotobiotic calves.
Proceedings of third V.I.D.O. International Symposium on Neonatal Diarrhea,
University of Saskatchewan : 343-358.
- SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J., HIGUCHI R.,
HORN G.T., MULLIS K.B. and ERLICH H.A. (1988)
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA
polymerase.
Science, 239 : 487-491.
- SANDERS D.E. (1985)
Field management of neonatal diarrhea.
Vet. Clinics of North America, Large Animal, 1 : 621-637.
- SARRETTE B.A., DANGLLOT C.D. and VILAGINES R. (1977)
A new and simple method for recuperation of enteroviruses from water.
Water Res., 11 : 355-358.
- SATO K., INABA Y., KUROGI H., TAKAHASHI E., SATODA K.,
OMORI T. and MATUMOTO M. (1977)
Hemagglutination of calf diarrhea coronavirus.
Vet. Microbiol., 2 : 83-87.
- SATO K., INABA Y., TOKUHISA S., MIURA S., KANEKO N.,
ASAGY M. and MATUMOTO M. (1984)
Detection of bovine coronavirus in feces by reversed passive
hemagglutination.
Arch. Virol., 80 : 23-31.
- SAUNDERS J.R., DOCHERTY A. and HUMPHREYS G.O. (1984)
Transformation of bacteria by plasmid DNA.
Meth. Microbiol., 17 : 61-95.
- SAVOYSKY E. (1989)
Etude de la structure du coronavirus entérique bovin : clonage et séquençage
du gène de la glycoprotéine infectieuse E1.
Thèse de doctorat de Biochimie-Pharmacologie, Univ. Nancy I : 181 p.
- SAVOYSKY E., BOIREAU P., FINANCE C. and LAPORTE J. (1990)
Sequence and analysis of BECV F15 Matrix protein.
Res. Virol., 141 : 411-425.

- SAWICKI S.G. and SAWICKI D.L. (1986)
 Coronavirus minus-strand RNA synthesis and effect of cycloheximide on coronavirus RNA synthesis.
J. Virol., 57 : 328-334.
- SCHERRER R. and LAPORTE J. (1983)
 Rotaviroses et Coronaviroses du veau.
Rec. Méd. vét., 159 : 173-183.
- SCHMIDT M.F.C. (1982)
 Acylation of viral spike glycoproteins, a feature of enveloped RNA viruses.
Virology, 116 : 327-338.
- SCHMIDT I., SKINNER M. and SIDDELL S. (1987)
 Nucleotide sequence of the gene encoding the surface projection glycoprotein of coronavirus MHV-JHM.
J. Gen. Virol., 68 : 47-56.
- SCHWARTZBROD L. et LUCENA-GUTIERREZ F. (1978)
 Concentration des entérovirus dans les eaux par adsorption sur poudre de verre : proposition d'un appareillage simplifié.
Microbia, 4 : 55-68.
- SCHWARTZBROD L., LUCENA-GUTIERREZ F. et FINANCE C. (1979)
 Etude quantitative de la population virale dans l'affluent et l'effluent d'une station d'épuration d'eaux résiduaires.
J. Fr. Hydrol., 10 : 7-20.
- SHARPEE R.L., MEBUS C.A. and BASS E.P. (1976)
 Characterization of a calf diarrheal coronavirus.
Am. J. Vet. Res., 37 : 1031-1041.
- SHIEH C.K., SOE L.H., MAKINO S., CHANG M.F., STOHLMAN S.A. and LAI M.M.C. (1987)
 The 5'-end sequence of the murine coronavirus genome : implications for multiple fusion sites in leader-primed transcription.
Virology, 156 : 321-330.
- SHOCKLEY L.J., KAPKE P.A., LAPPS W., BRIAN D.A., POTGIETER L.N.D. and WOODS R. (1987)
 Diagnosis of porcine and bovine enteric coronavirus infections using cloned cDNA probes.
J. Clin. Microbiol., 25 : 1591-1596.
- SIDDELL S.G. (1983)
 Coronavirus JHM : coding assignments of subgenomic mRNAs.
J. Gen. Virol., 64 : 113-125.

SIDDELL S.G. (1986)

Genomic organization of murine coronavirus MHV.

In "Positive strand RNA viruses" UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, New series, BRINTON M.A., RUECKERT R.R.(eds), 54 : 127-136.

SIDDELL S.G., ANDERSON R., CAVANAGH D., FUJIWARA K., KLENK H.D., MAC NAUGHTON M.R., PENSAERT M., STOHLMAN S.A., STURMAN L. and VAN DER ZEIJST B.A.M. (1983a)

Taxonomy : *Coronaviridae*.

Intervirology, 20 : 181-189.

SIDDELL S.G., BARTHEL A. and TER MEULEN V. (1981)

Coronavirus JHM : a virion-associated protein Kinase.

J. Gen. Virol., 53 : 235-243.

SIDDELL S., WEGE H. and TER MEULEN V. (1982)

The structure and replication of coronaviruses.

Curr. Top. Microbiol. Immunol., 99 : 131-163.

SIDDELL S., WEGE H. and TER MEULEN V. (1983b)

Review article : The biology of coronaviruses.

J. Gen. Virol., 64 : 761-776.

SMITH E.M. and GERBA C.P. (1982)

Development of a method for detection of human rotavirus in water.

Appl. Environ. Microbiol., 43 : 1440-1450.

SNODGRASS D.R., FAHEY K.J., WELLS P.W., CAMPBELL I. and WHITELOW A. (1980)

Passive immunity in calf rotavirus infections maternal vaccination increases and prolongs immunoglobulin G1 antibody secretion in milk.

Infect. Immun., 28 : 334-349.

SNODGRASS D.R., TERZOLO H.R., SHERWOOD D., CAMPBELL I., MENZIES J.D. and SYNGE B.A. (1986)

Aetiology of diarrhoea in young calves.

Vet. Rec., 119 : 31-33.

SOBSEY M.D. and JONES B.L. (1979)

Concentration of poliovirus from tapwater using positively charged microporous filters.

Appl. Env. Microbiol., 37 : 588-595.

SORENSEN O., COULTER-MACKIE M., PERCY D. and DALES S. (1981)

In vivo and *in vitro* models of demyelinating diseases.

In "Biochemistry and Biology of coronaviruses", TER MEULEN V., SIDDELL S., WEGE H. (eds), Plenum Press, New-York : 142 : 271-286.

- SOULEBOT J.P., DAUVERGNE M., BENET G., BRUN A., GUILLEMIN F. et ESPINASSE J. (1981)
Utilisation d'un vaccin à virus inactivé contre le rotavirus bovin.
Bull. GTV, 5 : 17-26.
- SPAAN W., CAVANAGH D. and HORZINEK M.C. (1988)
Review article - Coronaviruses : structure and genome expression.
J. Gen. Virol., 69, 2939-2952.
- SPAAN W.J.M., ROTTIER P.J.M., HORZINEK M.C.
and VAN DER ZEIJST B.A.M. (1981)
Isolation and identification of virus-specific mRNAs in cells infected with
mouse hepatitis virus (MHV-A59).
Virol., 108 : 424-434.
- STAIR E.L., RHODES M.B., WHITE R.G. and MEBUS C.A. (1972)
Neonatal calf diarrhea : purification and electron microscopy of a
coronavirus-like agent.
Am. J. Vet. Res., 33 : 1147-1156.
- STEFFAN R.J., BREEN A., ATLAS R.M. and SAYLER G.S. (1989)
Application of gene probe methods for monitoring specific microbial
populations in freshwater ecosystems.
Can. J. Microbiol., 35 : 681-685.
- STEINMANN J. (1981)
Detection of rotavirus in sewage.
Appl. Environ. Microbiol., 41 : 1043-1045.
- STERN D.F., BURGESS L. and SEFTON B.M. (1982)
Structural analysis of virion proteins of the avian coronavirus infectious
bronchitis virus.
J. Virol., 42 : 208-219.
- STERN D.F. and KENNEDY S.I.T. (1980)
Coronavirus multiplication strategy. II mapping the avian infectious
bronchitis virus intracellular RNA species to the genome.
J. Virol., 36 : 440-449.
- STERN D.F. and SEFTON B.M. (1982)
Coronavirus proteins : structure and functions of the oligosaccharides of the
avian bronchitis virus glycoproteins.
J. Virol., 44 : 804-812.
- STOHLMAN S.A. and FRELINGER J.A. (1978)
Resistance to fatal central nervous system disease by mouse hepatitis virus
strain JHM 1-genetic analysis.
Immunogen., 6 : 277-281.

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

STOHLMAN S.A. and WEINER L.P. (1981)
Chronic central nervous system demyelination in mice after JHMV virus infection.
Neurology, 31 : 38-44.

STORZ J. and ROTT R. (1981)
Reactivity of antibodies in human serum with antigens of an enteropathogenic bovine coronavirus.
MMI, 169 : 169-178.

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

STUDIER F.W. (1973)
Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels.
J. Mol. Biol., 79 : 237-248.

STURMAN L.S. (1981)
The structure and behaviour of coronavirus A59 glycoprotein.
In "Biochemistry and biology of coronaviruses", TER MEULEN V., SIDDELL S., WEGE H. (eds), Plenum Press, New-York : 1-18.

STURMAN L.S. and HOLMES K.V. (1983)
The molecular biology of coronaviruses.
Adv. Virus Res., 28 : 35-112.

STURMAN L.S. and HOLMES K. (1985)
The novel glycoproteins of coronaviruses.
Trends in Biochemical Sciences, 10 : 35-112.

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

STURMAN L.S., RICHARD C.S. and HOLMES K.V. (1985)
Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus : activation of cell-fusing activity of virions by trypsin and separation of two different 90 K cleavage fragments.
J. Virol., 56 (3) : 904-911.

- TER MEULEN V. (1987)
Coronaviruses : a group with unique features.
Virus Research 7 : 99-102.
- TERNYNCK T. and AVRAMEAS S. (1971)
Effect of electrolytes and of distilled water on antigen-antibody complexes.
Biochem. J., 125 : 297-302.
- THIEBAULT J.J. (1988)
Physiopathologie de la diarrhée.
Rev. Méd. Vét., 139 : 961-966.
- THOMAS C.M. (1984)
Analysis of clones.
Meth. Microbiol., 17 : 163-195.
- THOMAS P. (1980)
Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose.
Proc. Natl. Acad. Sci., 77 (9) : 5201-5205.
- THORPE G.H.G., KRICKA L.J., MOSELEY S.B. and WHITEHEAD T. (1985)
Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction : application in luminescence-monitored enzyme immunoassays.
Clin. Chem., 31 : 1335-1341.
- TOMPKINS W.A.F., WATRACH A.M., SCHMALE J.D., SCHULTZ R.M. and HARRIS J.A. (1974)
Cultural and antigenic properties of newly established cell strains derived from adenocarcinomas of the human colon and rectum.
J. Natl. Cancer Inst., 52 : 1101-1110.
- TRAAVIK T., MEHL R. and KJELDSBERG E. (1977)
"Runde" virus, a coronavirus-like agent associated with seabirds and ticks.
Arch. Virol., 55 : 25-38.
- TRAINCARD F., TGERNYNCK T., DANCHIN A. et AVRAMEAS S. (1983)
Une technique immunoenzymatique pour la mise en évidence de l'hybridation moléculaire entre acides nucléiques.
Ann. Inst. Pasteur Immunol., 134 D : 399-405.
- TYRREL D.A.J., ALMEIDA J.D., CUNNINGHAM C.H., DOWLE W.R., HOFSTAD M.S., Mc INTOSH K., TAJIMA M., ZAKSTELSKAYA L.Y., EASTERDAY B.C., KAPIKIAN A. and BINGHAM R.W. (1975)
Coronaviridae.
Intervirology, 5 : 76-82.

- TYRREL D.A.J. and BYNOE M.L. (1965)
Cultivation of a novel type of common-cold virus in organ cultures.
Br. Med. J., 1 : 1467-1470.
- TZIPORI S. (1981)
The aetiology and diagnosis of calf diarrhea.
Vet. Rec., 108 : 510-514.
- UNDERDAHL N.R., MEBUS C.A., STAIR E.L., RHODES M.D., Mc GILL L.D.
and TWIEHAUS M.J. (1974)
Isolation of transmissible gastroenteritis virus from lungs of market weight
swine.
Amer. J. Vet. Res., 35 : 1209-1216.
- VALLET A. (1983)
Aspects cliniques des entérites diarrhéiques néonatales des veaux.
Rec. Méd. Vét., 159 : 261-267.
- VALLET A. et NAVETAT H. (1988)
Pathologie des veaux âgés de 2 semaines à 3 mois.
Rev. Méd. Vét., 139 : 801-814.
- VAN BALKEN J.A.M., DE LEEUW P.W., ELLENS D.J.
and TRAVER P.J. (1978-1979)
Detection of coronavirus in calf faeces with haemadsorption-elution-
haemagglutination assay (HEHA)
Vet. Microbiol., 3 : 205-211.
- VAUCHER Y.E., RAY C.G., MINNICH L.L., PAYNE C.M.,
BECK D. and LOWE P. (1982)
Pleomorphic envelopped virus-like particles associated with gastrointestinal
illness in neonates.
J. Infect. Dis., 145 : 27-36.
- VAUTHEROT J.F. (1981)
Plaque assay for titration of bovine enteric coronavirus.
J. Gen. Virol., 56 : 451-455.
- VAUTHEROT J.F., LAPORTE J., MADELAINE M.F., BOBULESCO P.
and ROSETO A. (1984)
Antigenic and polypeptide structure of bovine enteric coronavirus as defined
by monoclonal antibodies.
In "Molecular biology and pathogenesis of coronaviruses", ROTTIER P.J.M.,
VANDER ZEIJST B.A.M., SPAAN W.J.M. and HORZINEK M. (eds), Plenum
publishing corporation : 117-132.

VAUTHEROT J.F., L'HARIDON R., SCHERRER R. and LAPORTE J. (1981)
Titration des anticorps anti-coronavirus bovin par la méthode ELISA et l'immunofluorescence indirecte.

In "Réunion de la Société Française de Microscopie" Méthodes de diagnostic rapide : 5 p.

VERBEEK A., DEB S. and TIJSSEN P. (1990)

Detection of bovine enteric coronavirus in clinical specimens by hybridization with cDNA probes.

Mol. Cell. Probes, 4 : 107-120.

VERBEEK A. and TIJSSEN P. (1988)

Biotinylated and radioactive cDNA probes in the detection by hybridization of bovine enteric coronavirus.

Mol. Cell. Probes, 2 : 209-223.

VIRELIZIER J.L., DAYAN A.D. and ALLISON A.C. (1975)

Neuropathological effects of persistent infection of mice by mouse hepatitis virus.

Insect. Immun., 12 ; 1127-1140.

VISCIDI R., LAUGHTON B., HANVANICH M., BARTELETT J. and YOLKEN R. (1984)

Improved enzyme immunoassays for the detection of antigens in fecal specimens. Investigation and correction of interfering factors.

J. Immunol. Methods, 67 : 129-143.

VLASAK R., LUYTJES W., LEIDER J., SPAAN W. and PALESE P. (1988)

The E3 protein of bovine coronavirus is a receptor destroying enzyme with acetylase activity.

J. Virol., 62 : 4686-4690.

WALLIS C., HENDERSON M. and MELNICK J.L. (1972)

Enterovirus concentration on cellulose membranes.

Appl. Microbiol., 23 : 476-480.

WALLIS C. and MELNICK J.L. (1967)

Concentration of viruses from sewage by adsorption on Millipore membranes.

Bull. OMS, 36 : 219-225.

WATSON C.J. and JACKSON J.F. (1985)

An alternative procedure for the synthesis of double-stranded cDNA for cloning in phage and plasmid vector.

In "DNA cloning : a practical approach" (part 2) GLOVER D.M. (ed), Oxford, Washington, IRL Press : 79-88.

- WEGE H., MULLER A. and TER MEULEN V. (1978)
Genomic RNA of the murine coronavirus JHM.
J. Gen. Virol., 41 : 217-227.
- WEGE H., SIDDELL S. and TER MEULEN V. (1982)
The biology and pathogenesis of coronaviruses.
Curr. Top. Microb. Immunol., 99 : 165-200.
- WEISS S. (1983)
Coronaviruses SD and SK share extensive nucleotide homology with murine coronavirus MHV-A59 more than that shared human and murine coronaviruses.
Virology, 126 : 669-677.
- WEISS S.R. and LEIBOWITZ J.L. (1983)
Characterization of murine coronavirus RNA by hybridization with virus-specific cDNA probes.
J. Gen. Virol., 64 : 127-133.
- WEISSENBACH J., BISHOP C. et BUENDIA M.A. (1986)
Clonage d'un cDNA dans *Escherichia coli*.
Cours pratique de Génie Génétique, INSERM (ed), 128 : 79 p.
- WELLEMANS G., ANTOINE H., BOTTON Y. et VAN OPDENBOSCH E. (1977)
La fréquence du virus Corona dans les troubles digestifs du jeune veau en Belgique.
Ann. Méd. Vét., 121 : 411-420.
- WELLEMANS G. and VAN OPDENBOSCH E. (1979)
Prevention of neonatal calf diarrhea by prolongation of secretion of antibodies in the milk at a high level.
In Colloque INSERM "Viral enteritis in human and animals", BRICOUT F. and SCHERRER R. (eds), 90 : 369-372.
- WESTON P.D. and AVRAMEAS S. (1971)
Proteins coupled to polyacrylamide beads using glutaraldehyde.
Biochemical and Biophysical research communications, 45 : 1574-1580.
- WHITE B. and BANCROFT F. (1982)
Cytoplasmic dot hybridization.
J. Biol. Chem., 257 : 8569-8572.
- WHITEHEAD T.P., THORPE G.H.G. and CARTER T.J.N. (1983)
Enhanced luminescence procedure for sensitive determination of peroxidase-labeled conjugates in immunoassay.
Nature, Londres, 305 : 158-159.

WHITLOCK R.H. (1984)

Therapeutic strategies involving antimicrobial treatment of the gastrointestinal tract in large animals.

J. Am. Vet. Med. Ass., 185 : 1210-1213.

WILHELMSSEN K.C., LEIBOWITZ J.L., BOND C.W. and ROBB J.A. (1981)

The replication of murine coronaviruses in enucleated cells.

Virology, 110 : 225-230.



DEMANDE D'IMPRIMATUR

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I,

présenté par : Madame Jocelyne COLLOMB

SUJET : APPROCHE MOLECULAIRE ET PHYSICO-CHIMIQUE DE LA DETECTION DU
CORONAVIRUS ENTERIQUE BOVIN DANS L'ENVIRONNEMENT

JURY : Président : Pr C. FINANCE
Rapporteurs : Pr J.C. BLOCK - Dr J. LAPORTE
Examineurs : Pr L. SCHWARTZBROD - Dr M.C. LETT

Vu et approuvé,

Nancy, le 7 Mai 1991

Le Président de Jury de Thèse,

Professeur C. FINANCE



Vu et approuvé,

Nancy, le 14 mai 1991

Le Responsable du Groupe de Formation
Doctorale "Biologie-Médicament",



G. SIEST

Vu et approuvé,

Nancy, le 14 mai 1991

Le Doyen de la Faculté,



C. VIGNERON

Vu et approuvé,

Nancy, le 21 MAI 1991 n° 214

Le Président de l'Université
de Nancy I,



RESUME

Une étude de la structure moléculaire et des caractéristiques physico-chimiques du coronavirus entérique bovin (BECV) a été envisagée afin de développer des techniques de détection de ce virus dans les milieux biologiques et l'environnement.

Le clonage de l'ARN génomique a été réalisé dans *E. coli*. L'analyse de la banque d'ADNc obtenue a permis de sélectionner un fragment de 2 kb, comprenant la majeure partie des gènes codant pour les protéines virales N et M, et utilisé comme sonde pour la mise au point d'un test d'hybridation moléculaire par *slot blot*. Deux techniques de marquage de la sonde ont été comparées : marquage radioactif au ^{32}P et marquage enzymatique par couplage covalent à la peroxydase et révélation par chimiluminescence. La sonde radioactive permet de détecter 1 à 3 pg d'ARN viral, soit 2.10^5 génomes, tandis que la sonde enzymatique, moins sensible, limite la détection à 100 pg d'ARN. Le test s'est avéré applicable à la détection du BECV produit en culture de cellules HRT 18 et présent dans les fécès de veaux atteints d'entérite.

La recherche du BECV dans le milieu hydrique nécessite une étape de concentration préalable faisant intervenir les caractéristiques physico-chimiques et antigéniques du virus. Ainsi, une technique d'immunoaffinité utilisant des anticorps monoclonaux et un procédé d'adsorption-élution sur poudre de verre ont été analysés. Dans chacun des cas, l'isolement des virus dispersés dans l'eau est efficace. Leur élution du support, par dissociation de l'immunocomplexe ou par répulsion électrostatique, entraîne une dégradation de l'enveloppe virale empêchant toute mise en évidence par inoculation à des cellules HRT 18. En revanche, les virus concentrés ont pu être détectés par hybridation moléculaire. La conduite d'études épidémiologiques nécessitera cependant d'améliorer le seuil de détection par amplification du système de révélation ou du matériel nucléaire viral.

MOTS CLES

Clonage - Concentration - Coronavirus entérique bovin - Hybridation moléculaire - Immunoadsorption - Milieu hydrique - Sonde d'ADNc.