



Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19. The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect, the company's public news and information website.

Elsevier hereby grants permission to make all its COVID-19-related research that is available on the COVID-19 resource centre - including this research content - immediately available in PubMed Central and other publicly funded repositories, such as the WHO COVID database with rights for unrestricted research re-use and analyses in any form or by any means with acknowledgement of the original source. These permissions are granted for free by Elsevier for as long as the COVID-19 resource centre remains active.

**ÉTUDE COMPARÉE DE TROIS SOUCHES DU CORONAVIRUS
DE LA GASTROENTÉRITE TRANSMISSIBLE:
CONDITIONS DE LA RÉPLICATION VIRALE
ET DE LA SYNTHÈSE DES ANTIGÈNES STRUCTURAUX**

par **T.D. Nguyen (*)**, **S. Bernard**, **E. Bottreau**, **I. Lantier**
et **J.M. Aynaud (**)**

INRA, Laboratoire de Pathologie Porcine, 37380 Nouzilly (France)

SUMMARY

COMPARISON OF THREE STRAINS OF THE TRANSMISSIBLE
GASTROENTERITIS CORONAVIRUS (TGEV): VIRAL REPLICATION
AND SYNTHESIS OF STRUCTURAL ANTIGENS

Purdue-115 and D-52 strains of TGEV were compared with the 188-SG strain, which was obtained by means of a survivor selection process in gastric juice of adult pig. The 188-SG strain was characterized by (a) low infectivity, (b) delayed and restricted growth associated with low and delayed RNA synthesis, and (c) a high content of structural antigens. In contrast, Purdue-115 and D-52 strains were characterized by (a) high infectivity, and (b) a normal pattern of virus replication and RNA and structural antigen synthesis. Tunicamycin induced the inhibition of synthesis of E1 and E2 glycoproteins (detected by the ELISA test using monoclonal and polyclonal antibodies) as well as a significant reduction in the NP protein. The inhibitory effect of tunicamycin was influenced by the cell type and virus strain.

KEY-WORDS: Coronavirus, Transmissible gastroenteritis, Antigen, Tunicamycine; Strains, Replication, ELISA, Infectivity, Pig.

Manuscrit soumis le 30 août 1986, accepté le 19 mars 1987.

(*) Adresse actuelle: Institut National de Recherches Vétérinaires Nga Tu Vong — Dong Da, Hanoi (Vietnam).

(**) Auteur à qui les demandes de tirés à part peuvent être adressées.

INTRODUCTION

La gastroentérite transmissible (GET) est une entérite néonatale mortelle, hautement contagieuse, causée par un coronavirus spécifique de l'espèce porcine; la GET est responsable de lourdes pertes économiques en production porcine. La relation entre le pouvoir pathogène du virus et d'éventuels marqueurs *in vitro* liés par exemple aux conditions de sa répllication, fait encore l'objet de controverse [9, 11, 14, 17]. Après un certain nombre de passages en série sur culture cellulaire, le virus GET perd une grande partie de son pouvoir pathogène. Des résultats récents suggèrent qu'il n'est pas possible de distinguer la souche atténuée 188-SG (utilisabile comme vaccin vivant oral chez la truie en vue de l'induction de l'immunité lactogène) des souches D-52 (dont la souche 188-SG tire son origine) et Purdue-115 (souche américaine de référence), par l'étude des conditions d'attachement *in vitro* des particules virales (*Ann. Rech. vétérin.*, 1987, sous presse). C'est pourquoi nous avons entrepris l'étude comparée de la replication de ces trois souches de virus GET dans deux systèmes cellulaires différents: les cellules ST (testicule de porc) et les cellules RPD (rein de porc).

Nous avons concentré nos efforts d'une part sur l'étude de la cinétique des synthèses virales et, d'autre part, sur l'analyse des antigènes structuraux du virus produit à la fin du cycle, à l'aide d'une batterie d'anticorps monoclonaux spécifiques du virus GET. La résistance de la souche 188-SG à l'acidité et à l'action des enzymes protéolytiques [1] suggère l'existence probable de changements structuraux ou conformationnels, qui pourraient être liés aux conditions de glycosylation des protéines virales. C'est pourquoi nous sommes aussi intéressés à l'influence d'une substance connue pour son activité à ce niveau: la tunicamycine.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Cellules.

La lignée de cellules de rein de porc RPD a été décrite précédemment [14]. La lignée de cellules de testicules de porc ST [16] a été fournie par le Dr E.H. Bohl (Wooster, Ohio, USA). Ces cellules sont cultivées en milieu MEM (milieu essentiel minimal) additionné de sérum de fœtus de veau (10 %).

Souches de virus de la GET.

La souche Purdue-115, qui a subi 115 passages sur cultures cellulaires, a fait l'objet de nombreuses publications [3, 8, 14, 19]. La souche D-52 a été obtenue après cinq

GET = gastroentérite transmissible.
MEM = milieu essentiel minimal.

p.i. = post-infection.

passages sur culture de rein de porc à partir d'une souche sauvage virulente isolée en France à partir d'un foyer de GET [14]. La souche 188-SG a été obtenue à partir de la souche D-52 par sélection de survie après 188 passages dans du contenu gastrique de porc, alternés avec des passages sur cultures cellulaires [1]. Pour chacune de ces trois souches, des stocks viraux ont été préparés sur cultures monocouches de cellules RPD (flacons «Falcon» de 150 cm²), après 18 h d'incubation p.i. (post-infection) à 37°C. Les stocks de virus sont conservés à -70°C.

Titration du pouvoir infectant du virus de la GET.

Le pouvoir infectant du virus GET est titré, à l'aide de la méthode des plages, sur cellules ST cultivées en monocouche dans des plaques plastiques (Costar) à six cupules. Les plages sont visibles sous l'agarose après deux jours d'incubation des cellules infectées à 37°C en présence de CO₂ à 5,5 %. La numération des plages est réalisée après coloration par le rouge neutre (10⁻⁴, p/v).

Cinétique de la synthèse de l'ARN, des protéines et de la formation virale en cycle unique.

Décrite précédemment [1], la technique pour l'étude du développement du virus en cycle unique a été reprise pour examiner la synthèse de l'ARN et des protéines et la formation des particules infectieuses virales. Les modifications suivantes ont été apportées : après l'attachement du virus, les inoculums ont été éliminés par deux lavages. Le milieu MEM additionné de 1 µg/ml d'actinomycine D et de 0,2 µCi/ml d'uridine ou de leucine tritiées, a été utilisé pour la culture des cellules infectées, qui ont été ensuite mises à incuber à 37°C. Prélevés en fonction du temps, les échantillons (0,1 ml chacun) ont été déposés sur des papiers filtre (Titertek cell harvester filter, Flow Laboratories). Après trempage pendant 1 h à 4°C dans de l'acide trichloroacétique 5 %, ces papiers sont rincés trois fois avec de l'alcool à 70° et séchés. La radioactivité de l'uridine ou de la leucine tritiée incorporée dans les macromolécules a été mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation LKB. Par ailleurs, les échantillons ainsi prélevés ont été stockés à moins 70°C pour titrage du pouvoir infectant du virus GET.

Ultracentrifugation isopycnique du matériel viral présent dans les cultures cellulaires à la fin du cycle (18 h p.i.).

Un millilitre de la suspension virale de chaque souche est déposé sur un gradient continu de saccharose (10-50 %) en tampon TESV (Tris-HCl 0,02 M, pH 7,4, EDTA 0,1 M, NaCl 0,1 M). Après 14 h de centrifugation à 80.000 g dans un rotor SW-27 (Beckman), des fractions de 1 ml sont collectées et analysées. Les titres infectieux, la quantité d'ARN (DO à 254nm), la quantité de protéine (DO à 280nm) et l'activité antigénique (ELISA) sont déterminés pour chaque fraction du gradient.

Influence de la tunicamycine sur la multiplication virale.

Les tapis cellulaires dans les plaques plastiques à six cupules (Costar) ont été infectés avec du virus GET à raison de 5 à 8 UFP/cellule. Après 60 min d'absorption à 37°C, l'inoculum est éliminé par deux lavages et remplacé par 3 ml de milieu MEM additionné de tunicamycine (Sigma) à différentes concentrations (de 0 à 5 µg/ml). Après 18 h d'incubation à 37°C en présence de CO₂ à 5,5 %, les cultures sont congelées et décongelées, et le titre du virus récolté est déterminé par la méthode des plages.

Les antigènes viraux néoformés sont titrés à l'aide d'un test ELISA. L'effet inhibiteur de la tunicamycine sur le rendement de la multiplication virale est exprimé par la baisse du titre infectieux et de la densité optique pour le test ELISA.

Titration des antigènes structuraux du coronavirus GET à l'aide d'une technique ELISA mixte.

Anticorps monoclonaux anti-coronavirus GET. — Une batterie d'anticorps monoclonaux de souris spécifiques du virus GET a été préparée récemment [15]. Un certain nombre d'entre eux ont été fournis par H. Laude et utilisés dans cette étude (tableau I).

Anticorps polyclonal anti-coronavirus GET. — Le sérum de la truie n° 5215, qui a été utilisée dans une étude antérieure [1], a servi à la préparation de l'anticorps polyclonal. Cette truie a été vaccinée par voie orale avec la souche 188-SG (8 semaines avant la mise-bas) et la portée de porcelets a été éprouvée (au 4^e jour d'âge); le sérum récolté lors de l'abattage (deux semaines après la mise-bas) présente un titre neutralisant de 65.000.

Préparation du conjugué. — Le marquage des anticorps à l'aide de la peroxidase a été réalisé selon la technique de Nakane et Kawaoi [18].

Détection des antigènes structuraux du coronavirus de la GET. — L'application de la technique ELISA-sandwich [7] aux études virologiques et immunologiques de la GET a été développée récemment [2]. La particularité de cette technique est la suivante: 1) la sensibilisation des plaques plastiques (Nunc, Immunoplate II, inter. Med.) a été faite seulement avec les anticorps monoclonaux anti-virus GET; 2) les conjugués révélateurs ont été préparés avec des anticorps monoclonaux et polyclonaux; le substrat est l'eau oxygénée et le chromogène est le 2,2'-azino-di-(acide 3-éthylbenzthiazoline sulphonique) (Boehringer); la DO à 405 nm a été mesurée avec un spectrophotomètre « Vernon »; 3) une réaction témoin est effectuée en parallèle avec des globulines de souris non immunisées pour la sensibilisation des plaques dans les mêmes conditions; et 4) les résultats sont exprimés par la différence entre les valeurs de densité optique des essais réalisés avec les anticorps monoclonaux et de ceux réalisés avec les immunoglobulines de souris non immunisées.

Traitement du virus GET par le métaperiodate. — Le virus semi-purifié par ultracentrifugation a été traité par le métaperiodate à différentes concentrations (0-7 mM) pendant 1 h à 37°C. Le traitement est arrêté par l'addition de glycérol (concentration finale 10 %).

TABLEAU I. — Caractéristiques des anticorps anti-coronavirus GET utilisés au cours de la présente étude.

Anticorps	Spécificité	Désignation	Isotype	Titre neutralisant
Monoclonal	anti-E1	25.22	G2a	< 20
"	anti-E2	10.4	ND	6400
"	" E2	20.9	G2b	50.000
"	" E2	25b21	G2b	32.000
"	" E2	51.13	G2A	256.000
"	anti-NP	22.6	G2a	< 20
Polyclonal	anti-GET	52.15		65.000

RÉSULTATS

Conditions de la réplication du virus en cycle unique en culture cellulaire.

1) **Cinétique d'apparition des particules infectieuses.** — Quel que soit le système cellulaire, la souche 188-SG se distingue des deux autres souches par un allongement de la phase de latence (fig. 1c et 1f). En particulier dans les cellules RPD, on observe un retard d'environ 3 h. De plus, la production de la souche 188-SG ne représente que 10 % de celle des deux autres souches. Cependant, la phase exponentielle présente une pente similaire pour les trois souches. Par rapport aux cellules RPD, les cellules ST offrent au virus GET des meilleures conditions pour sa réplication puisque celle-ci est plus précoce et plus productive (titres infectieux plus élevés).

2) **Cinétique de la synthèse de l'ARN et des protéines virales.** — Présentés par la figure 1 (a, b, d, e), les résultats sont les suivants. Par rapport aux deux autres souches, la souche 188-SG est caractérisée par une incorporation plus faible d'uridine tritiée. En revanche, la souche 188-SG présente une incorporation plus importante de la leucine tritiée, en particulier dans les cellules ST, ce qui suggère un niveau de synthèse de protéines plus élevée. Enfin, le système cellulaire a une influence importante: on constate en effet que la synthèse de l'ARN viral dans les cellules ST est presque le double de celle qui est observée dans les cellules RPD. Notons par ailleurs que la synthèse de l'ARN cellulaire est pratiquement négligeable en présence d'1 µg/ml d'actinomycine D.

Analyse des antigènes structuraux du virus GET produit à la fin du cycle.

1) **A partir des suspensions virales non purifiées des trois souches.** — La réaction ELISA a été réalisée avec des anticorps monoclonaux. Le matériel antigénique viral apparaît plus abondant pour la souche 188-SG que pour les deux autres souches, Purdue-115 et D-52 (fig. 2).

2) **A partir des fractions d'ultracentrifugation** (fig. 3). — Dans les fractions qui contiennent les particules virales infectieuses (correspondant à 39-40 % de saccharose, soit une DO de 1,17-1,18), les deux souches virales 188-SG et Purdue-115 présentent des quantités similaires d'ARN et de protéines (évaluées par la DO) alors que le titre infectieux de la souche 188-SG ($10^{5,8}$ PFU) est inférieur de 90 % à celui de la souche Purdue-115 ($10^{6,8}$ PFU). Dans des fractions pauvres en particules infectieuses mais riches en ARN (correspondant à 32-37 % de saccharose, soit une DO de 1,14-1,16) où sédimentent habituellement les membranes cellulaires, nos résultats révèlent une quantité d'antigènes NP similaire pour les deux souches virales. De plus, dans les fractions contenant peu ou pas d'ARN (correspondant à 27-32 % de saccharose, soit une DO de 1,11-1,14), l'association des antigènes E1 et NP est présente en quantité importante pour la souche Purdue-115; la

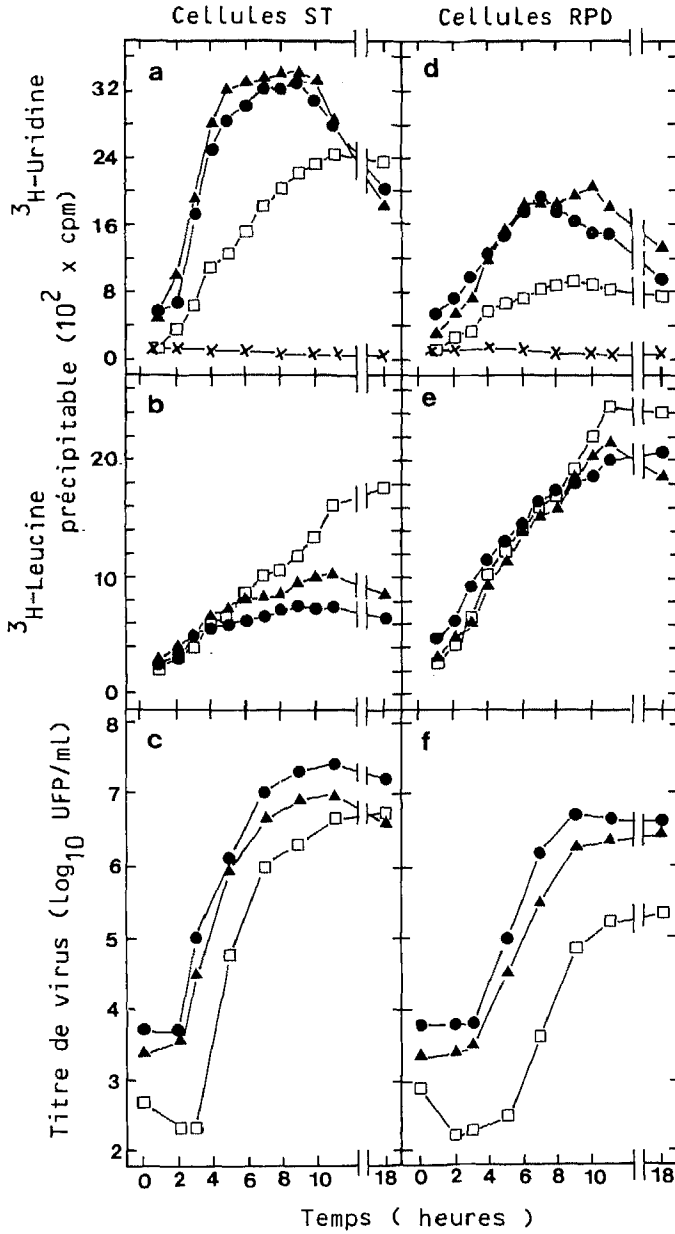


FIG. 1. — Influence du système cellulaire sur les conditions de la replication du virus GET en cycle unique, en présence d'actinomycine D (1 µg/ml), en fonction du temps.

Cellules ST = a, b et c; cellules RPD = d, e et f.

Souches: Purdue-115 = ●, D-52 = ▲ et 188-SG = □.

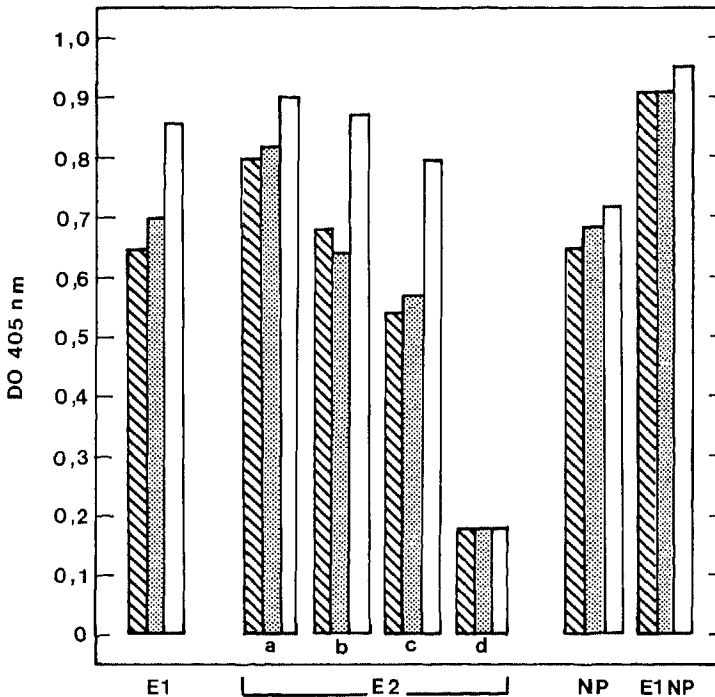


FIG. 2. — Analyse quantitative comparée des antigènes structuraux du virus GET présents dans des suspensions virales récoltées 18 h p.i. des cellules RPD et non purifiées.

Souches Purdue-115 (rayé), D-52 (pointillé) et 188-SG (blanc).

Les antigènes viraux sont détectés et titrés par ELISA avec 7 anticorps monoclonaux spécifiques des protéines E1 (25-22), E2 (a = 53-31, b = 20-9, c = 25b-21, d = 10-4), NP (22-6) et E1 plus NP.

souche D-52 présente de façon générale un comportement identique à celui de la souche Purdue-115 (résultats non présentés). En résumé, ces résultats mettent en évidence l'abondance particulière d'antigènes structuraux synthétisés par la souche 188-SG en culture cellulaire.

Influence de la tunicamycine sur le rendement en particules infectieuses.

L'addition de la tunicamycine dans le milieu a pour effet de diminuer le rendement en virus infectieux (fig. 4). L'effet inhibiteur de la tunicamycine est plus intense à la concentration de 1 $\mu\text{g/ml}$ pour la souche 188-SG. Par contre, pour les autres souches, on observe un effet inhibiteur proportionnel

à la concentration de tunicamycine. De plus, on constate les faits suivants : dans les cellules ST, la multiplication virale de la souche 188-SG est plus affectée par la tunicamycine que celle des autres souches ; inversement, dans les cellules RPD, la sensibilité à la tunicamycine est différente ; la souche 188-SG est moins affectée que les deux autres souches virales.

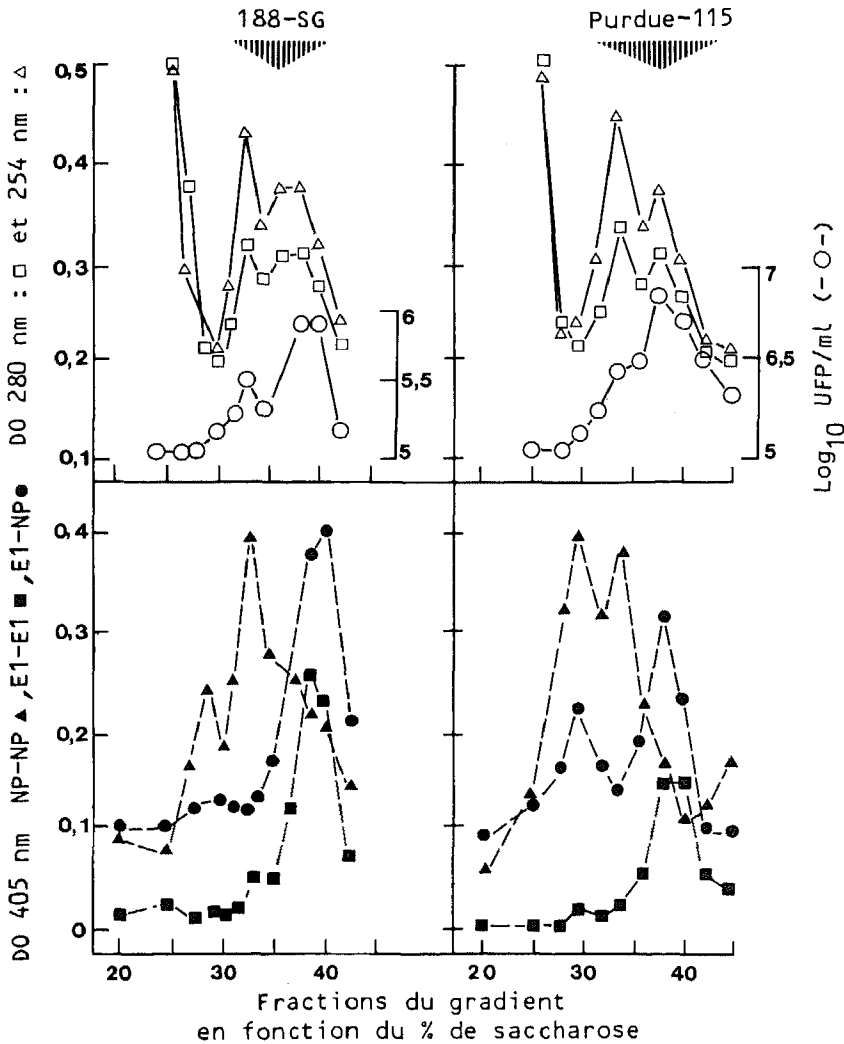


FIG. 3. — Ultracentrifugation isopycnic du matériel viral présent dans les cellules RPD, 18 h p.i. en cycle unique par le virus GET (souches 188-SG et Purdue-115).

Les antigènes structuraux NP et E1 sont titrés par un test ELISA utilisant des anticorps monoclonaux pour la sensibilisation et la révélation des plaques.

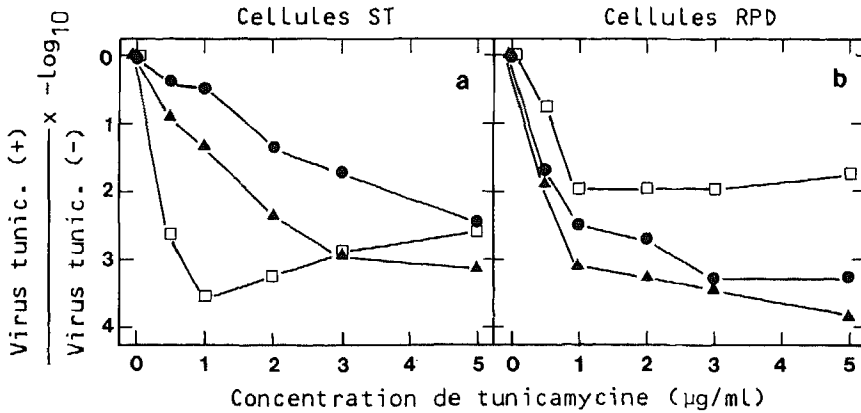


FIG. 4. — Influence de la tunicamycine sur la production des particules infectieuses du virus GET, 18 h p.i. des cellules ST (a) et de cellules RPD (b) en cycle unique.

Souches: Purdue-115 = ●, D-52 = ▲ et 188-SG = □.

Influence de la tunicamycine sur la synthèse des antigènes structuraux.

La détermination quantitative, par ELISA, des antigènes viraux contenus dans les suspensions virales démontre qu'en présence de la tunicamycine la synthèse globale des protéines virales diminue parallèlement à la formation des particules infectieuses (fig. 5). Les résultats de la réaction ELISA mettant en œuvre les anticorps monoclonaux, démontrent que la synthèse non seulement des glycoprotéines mais aussi de la nucléoprotéine est affectée par l'addition de la tunicamycine (fig. 6).

Influence du traitement du virus semi-purifié par le métaperiodate sur son activité antigénique.

Cette expérience a été menée à titre de contrôle pour permettre de savoir si l'altération des parties glycosidiques des glycoprotéines virales avait, ou non, une influence significative sur l'activité antigénique du matériel viral étudié dans ces conditions expérimentales (ELISA). Pour cela nous avons choisi le métaperiodate dont les interactions sur les sucres sont connues [4]. Le traitement d'une suspension virale (souche Purdue-115) semi-purifiée par ultracentrifugation n'a pas d'influence significative sur l'expression de l'activité antigénique, en ELISA, des glycoprotéines E1 et E2 jusqu'à la dose de 6 $\mu\text{g/ml}$.

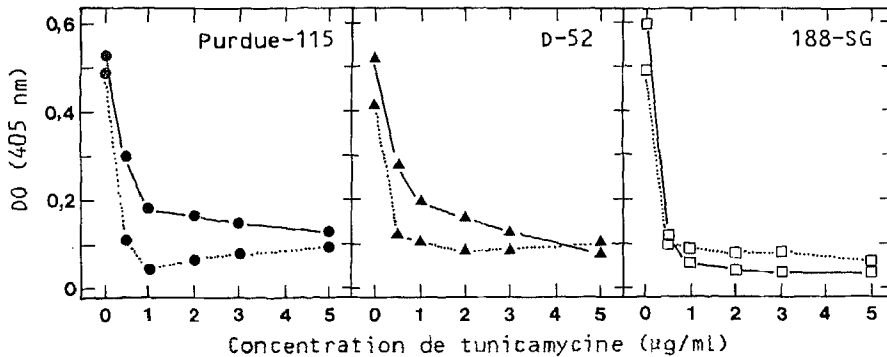


FIG. 5. — Influence de la tunicamycine sur la production globale des antigènes structuraux E1, E2 et NP du virus GET, 18 h p.i. des cellules ST (—) et des cellules RPD (···) en cycle unique.

Souches: Purdue-115 = ●, D-52 = ▲ et 188-SG = □.

Les antigènes structuraux sont titrés par un test ELISA utilisant, pour la sensibilisation des plaques, un mélange des différents anticorps monoclonaux spécifiques de chacune des trois protéines virales, et, pour la révélation, l'anticorps polyclonal 5215.

Au-delà de cette dose (7 µg/ml) le métaperiodate affecte l'antigénicité non seulement de deux glycoprotéines (E1 et E2) mais aussi de la nucléoprotéine (NP) qui n'est pas glycosylée (fig. 7).

DISCUSSION

La thermosensibilité de la réplication a été proposée dans le passé comme marqueur de la virulence du virus de la GET [9, 11]. Pourtant, récemment, à partir de huit souches du virus, Laude et coll. [14] ont montré que les conditions de la multiplication du virus en cycle unique, en fonction de la température, ne pouvaient pas être retenues comme marqueur. Nos résultats indiquent que le rendement de virus est étroitement associé à la synthèse de l'ARN de chaque souche. Les cinétiques de la synthèse de l'ARN et de la formation des particules infectieuses sont en effet comparables. Ainsi, le faible taux de synthèse de l'ARN pourrait déterminer indirectement l'absence de virulence de la souche 188-SG pour le porcelet nouveau-né [1]. La faible synthèse de l'ARN viral dans les cellules RPD pourrait également expliquer les difficultés rencontrées pour préparer des stocks de virus de titre élevé dans ces cellules (résultats non publiés).

En revanche, quel que soit le système cellulaire, une synthèse plus importante de protéines semble être une caractéristique propre à la souche 188-SG.

La différence de la synthèse des protéines entre les deux types de cellules, est déterminée par celle propre aux cellules (synthèse endogène) plutôt que par l'influence de la multiplication virale. Quelle que soit la souche, il est intéressant de noter que les conditions de synthèse des protéines sont différentes de

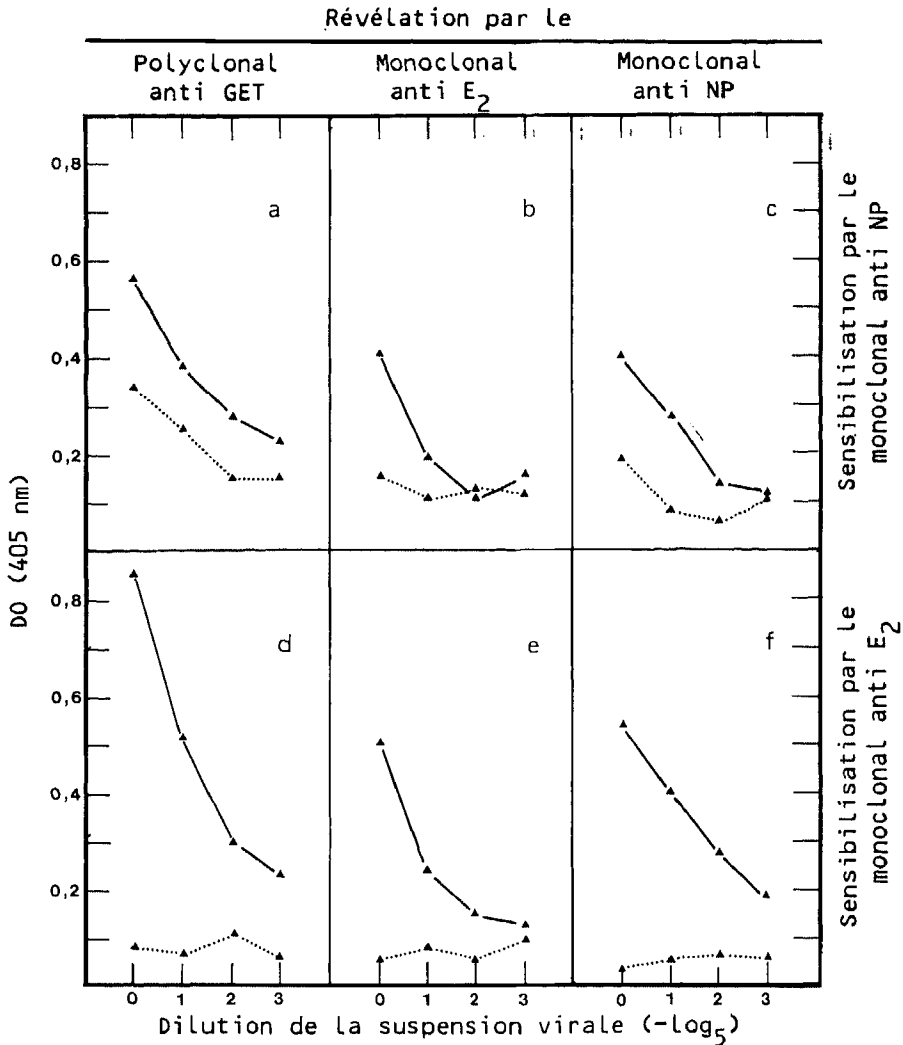


FIG. 6. — Influence de la tunicamycine (0,5 µg/ml) sur la production des antigènes structuraux E₂ et NP du virus GET (souche Purdue-115), 18 h p.i. des cellules RPD en cycle unique.

Les antigènes structuraux E₂ et NP présents dans les suspensions virales produites en présence (···) et en l'absence (—) de tunicamycine sont titrés par ELISA utilisant, pour la sensibilité des plaques, l'anticorps monoclonal anti-NP (a, b, c) et anti-E₂ (d, e, f). La révélation est réalisée par les anticorps suivants: polyclonal 5215 (a, c), monoclonal anti-E₂ (b, c) et monoclonal anti-NP (c, f).

celle de l'ARN. Dans le cas de la souche 188-SG, le faible niveau observé dans la synthèse d'ARN et dans l'apparition de particules infectieuses mais non dans la synthèse de protéines, n'a pas encore d'explication.

Pour la souche 188-SG, il existe un nombre élevé de particules virales physiquement complètes qui ne sont pas toutes infectieuses quel que soit le système cellulaire. En effet, malgré une quantité plus faible de particules infectieuses,

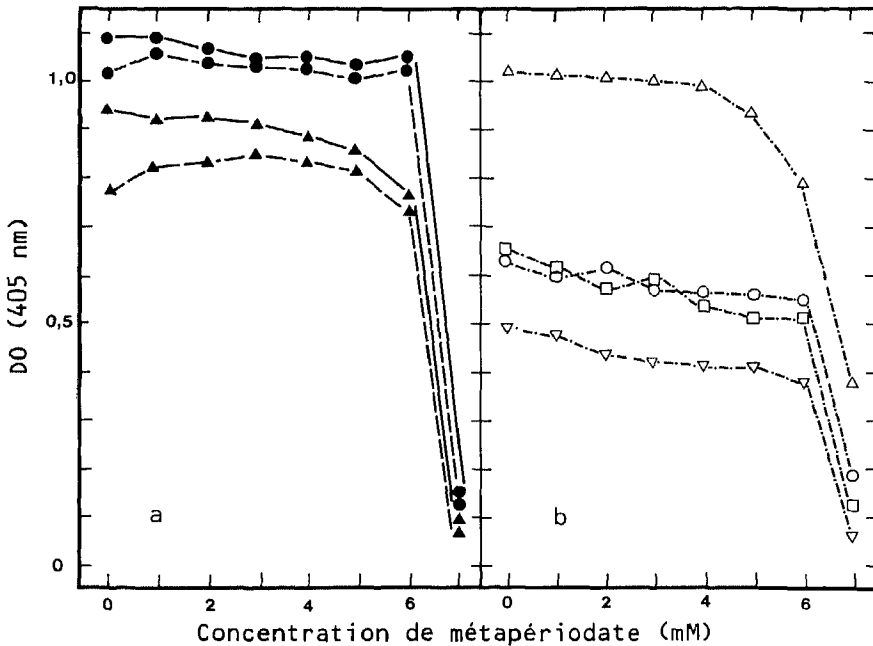


FIG. 7. — Influence du traitement d'une suspension de virus GET semi-purifié (souche Purdue-115) par le métaperiodate sur l'activité antigénique des protéines structurales révélée par ELISA.

		Anticorps utilisés dans la réaction ELISA-sandwich	
		Sensibilisation	Révélation
a)	● —	E1 (monoclonal)	5215 (polyclonal)
	● - -	E1 "	NP (monoclonal)
	▲ —	E2 "	5215 (polyclonal)
	▲ - -	E2 "	NP (monoclonal)
b)	□	NP "	E1 (monoclonal)
	▽	NP "	E2 "
	△	NP "	NP "
	○	NP "	5215 (polyclonal)

la souche 188-SG se révèle beaucoup plus riche en antigènes structuraux. Il semble donc que la souche 188-SG a la capacité d'induire une synthèse de matériel antigénique plus importante et que les particules virales néoformées sont apparemment complètes mais peu infectieuses, ce qui pourrait expliquer le bon pouvoir immunogène de cette souche administrée par voie orale chez la truie gestante en vue de la protection immunitaire passive du porcelet par le lait maternel.

Il est maintenant établi que la synthèse des protéines E1 et E2 du coronavirus GET est inhibée en présence de tunicamycine [10]. Dans notre étude les faits suivants doivent être notés.

Dans les cellules ST, la tunicamycine a un effet inhibiteur sur la formation du virus infectieux plus prononcé pour la souche 188-SG que pour les autres souches. En revanche dans les cellules RPD, un effet inverse est observé. Ainsi, il semble que la souche 188-SG, résistante à l'acidité et aux protéases digestives, est plus vulnérable à l'inhibition de la glycosylation. Les conditions de glycosylation des protéines sont dépendantes de la machinerie cellulaire [5, 6]. La différence d'activité de la tunicamycine observée entre les deux types de cellules pour une souche virale confirme cette observation.

Nos résultats expérimentaux montrent également que la synthèse non seulement des glycoprotéines mais aussi des protéines non glycosylées (NP) est diminuée en présence de tunicamycine. Nos résultats confirment donc que les protéines E1 et E2 du coronavirus GET sont toutes les deux N-glycosylées [10]. Par ailleurs, il est intéressant de noter que l'inhibition de la synthèse des protéines E1 et E2 entraîne parallèlement une diminution de la synthèse de la protéine NP. Dans le cas du virus de l'hépatite murine, la tunicamycine n'inhibe que la synthèse de protéine E2 [21]. Ainsi, dans le cas du virus GET la synthèse de E1 et E2 pourrait intervenir dans la régulation de la synthèse des autres composants du virus de la GET, dont la protéine NP.

Pendant, nos résultats ainsi que ceux de Rottier et coll. [20] à partir du virus de l'hépatite murine montrent que, en présence de la tunicamycine, des particules virales infectieuses continuent à être formées, bien que moins nombreuses (< 1 %). Selon Holmes et coll. [12], en présence de la tunicamycine, des particules virales « nues » (dépourvues de spicules) sont formées et dépourvues de pouvoir infectant. On sait en outre que la tunicamycine inhibe complètement la production de virus infectieux de l'herpesvirus bovin [22]. Les limites de la technique ELISA (réactions positives détectables à partir de 10^5 particules infectieuses) ne nous permet pas de déterminer si ces particules infectieuses produites en présence de tunicamycine sont « nues » ou pas. Le problème majeur qui s'est posé lors de la mise en œuvre de la technique ELISA était l'antigénicité des protéines virales synthétisées en présence et en absence de tunicamycine. Les arguments suivants sont en faveur d'une réactivité identique de ces protéines avec les anticorps monoclonaux: (1) les apo-protéines, E1 et E2, réagissent avec les anticorps induits par les virus complets [10, 13]; (2) nous n'avons pas constaté de différence dans le pouvoir neutralisant des anticorps sur le virus cultivé sur cellules ST ou sur cellules RPD,

malgré la différence de la sensibilité à tunicamycine; et (3) le traitement du virus purifié par le métaperiodate, qui modifie profondément les parties glycosydiques des glycoprotéines, n'a pas d'influence significative sur l'antigénicité des protéines virales évaluée à l'aide de la technique ELISA, sauf pour les concentrations de métaperiodate qui affectent également la nucléoprotéine (NP) non glycosylée; toutefois cet argument n'est valable que pour les épitopes 51.13, 25.22 et 22.6.

Nos résultats expérimentaux permettent de tirer les conclusions suivantes :

— par rapport aux souches D-52 et Purdue-115, la souche virale atténuée 188-SG se caractérise par une synthèse faible et tardive de l'ARN viral et par une synthèse de protéine plus active, ce qui entraîne la production d'une quantité plus importante de matériel viral antigénique constitué surtout par des virions possédant un pouvoir infectant faible pour les cellules ST et RPD;

— sur les cellules ST, la souche 188-SG est plus vulnérable à l'action inhibitrice de la tunicamycine sur la glycosylation;

— enfin, quelle que soit la souche de virus, l'inhibition de la synthèse des protéines E1 et E2 — par le biais de l'inhibition de la N-glycosylation par la tunicamycine — entraîne une diminution sensible de la formation de la protéine NP non glycosylée.

RÉSUMÉ

Nous avons réalisé l'étude comparative de la souche 188-SG et des souches Purdue-115 et D-52 de coronavirus de la gastroentérite transmissible. Obtenue par sélection de survie dans du contenu gastrique de porc adulte, la souche 188-SG se distingue des deux autres par les propriétés suivantes : a) un faible pouvoir infectant ; b) une multiplication tardive et modérée, liée à une synthèse tardive et faible d'ARN; et c) une richesse anormalement élevée en antigènes structuraux révélés par un test ELISA qui met en œuvre des anticorps monoclonaux et polyclonaux. La tunicamycine exerce un effet inhibiteur sur la synthèse des glycoprotéines E1 et E2. Parallèlement, on observe une réduction significative de la synthèse de la protéine NP non glycolysée. L'effet inhibiteur de la tunicamycine est modulé par des facteurs tenant d'une part au type de cellules utilisées et, d'autre part, à la souche de coronavirus.

MOTS-CLÉS: Coronavirus, Gastroentérite transmissible, Antigène, Tunicamycine; Souches, Réplication, ELISA, Pouvoir infectant, Porc.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Dr Hubert Laude qui nous a fourni la collection d'anticorps monoclonaux spécifiques du virus GET grâce auxquels ce travail a pu être réalisé.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] AYNAUD, J.M., NGUYEN, T.D., BOTTREAU, E., BRUN, A. & VANNIER, P., Transmissible gastroenteritis (TGE) of swine: survivor selection of TGE virus mutants in stomach juice of adult pigs. *J. gen. Virol.*, 1985, **66**, 1911-1917.
- [2] BERNARD, S., LANTIER, I., LAUDE, H. & AYNAUD, J.M., Detection of transmissible gastroenteritis coronavirus by a sandwich ELISA technique. *Amer. J. vet. Med.*, 1986, 2441-2444.
- [3] BOHL, E.H., GUPTA, R.P., OLQUIN, M.V.F. & SAIF, L.J., Antibody response in serum, colostrum and milk of swine after infection or vaccination with transmissible gastroenteritis virus. *Infect. Immun.*, 1972, **6**, 289-301.
- [4] CLAMP, J.R. & HOUGH, L., The periodate oxydation of amino acids with references to studies of glycoproteins. *Biochem. J.*, 1965, **94**, 17-24.
- [5] DAVIDSON, S.K. & HUNT, L., Sindbis virus glycoproteins are abnormally glycosylated in Chinese hamster ovary cells deprived of glucose. *J. gen. Virol.*, 1985, **66**, 1457-1468.
- [6] ROBERTSON, J.S., NAEVE, C.W., WEBSTER, G., BOOTMAN, J.S., NEWMAN, R. & SCHILD, G.C., Alteration in the hemagglutinin associated with adaptation of influenza B virus to growth in eggs. *Virology*, 1985, **143**, 166-174.
- [7] ENGVAL, E. & PERLMAN, P., Enzyme-linked immunosorbent assay. — III. Quantitation of specific antibodies by enzyme labeled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. *J. Immunol.*, 1972, **109**, 129-135.
- [8] FREDERIC, G.T. & BOHL, E.H., Local and systemic cell-mediated immunity against transmissible gastroenteritis, an intestinal infection of swine. *J. Immunol.*, 1976, **116**, 1000-1004.
- [9] FURUUCHI, S., SHIMIZU, Y. & KUMAGAI, T., Comparison of properties between virulent and attenuated transmissible gastroenteritis virus. *Nat. Inst. Anim. Health Q.*, 1975, **15**, 159-164.
- [10] GARWES, D.J., BONTIFF, L., MILLSON, G.C. & ELLEMAN, C.J., Defective replication of porcine transmissible gastroenteritis virus in a continuous cell line. *Advanc. exp. Med. Biol.*, 1984, **173**, 79-93.
- [11] HESS, R.G. & BACHMANN, P.A., *In vitro* differentiation and pH sensitivity of field and cell culture attenuated strains of transmissible gastroenteritis virus. *Infect. Immun.*, 1976, **13**, 1642-1646.
- [12] HOLMES, K.V., DOLLER, E.X. & BEHNKE, J.N., Analysis of the fonctions of coronavirus glycoproteins by differential inhibition of synthesis with tunicamycin. *Advanc. exp. Med. Biol.*, 1981, **142**, 133-142.
- [13] HU, S., BRUSZEWSKI, J., BOONE, T. & SOUZA, L., Cloning and expression of the surface glycoprotein gp195 of porcine transmissible gastroenteritis virus, in «Modern approches to vaccines» (R.M. Chanock and R.A. Lerner) (pp. 219-223). Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1984.
- [14] LAUDE, H., GELFI, J. & AYNAUD, J.M., *In vitro* properties of low and high passaged strains of transmissible gastroenteritis coronavirus of swine. *Amer. J. vet. Res.*, 1981, **42**, 447-449.
- [15] LAUDE, H., CHAPSAL, J.M., GELFI, J., LABIAU, S. & GROSCLAUDE, J., Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus. — I. Properties of monoclonal antibodies directed against virion proteins. *J. gen. Virol.*, 1986, **67**, 119-130.
- [16] McCURKIN, A.W. & NORMAN, J.O., Studies on transmissible gastroenteritis of swine. — II. Selected characteristics of a cytopathogenic virus common to five isolants from transmissible gastroenteritis. *Canad. J. comp. Med.*, 1966, **30**, 190-198.
- [17] MOCSARI, E., Physicochemical properties of field and cell culture-attenuated strains of swine transmissible gastroenteritis (TGE) coronavirus. *Acta vet. Acad. Sci. hung.*, 1980, **28**, 341-350.

- [18] NAKANE, P.K. & KAWAOI, A., Peroxidase-labelled antibody a new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.*, 1980, **22**, 1084-1091.
- [19] NGUYEN, T.D., BOTTREAU, E., BERNARD, S., LANTIER, I. & AYNAUD, J.M., Neutralizing secretory IgA and IgG do not inhibit attachment of transmissible gastroenteritis virus. *J. gen. Virol.*, 1986, **67**, 939-943.
- [20] ROTTIER, P.J.M., HORZINEK, M.C. & VAN DER ZEIJST, A.M., Viral protein synthesis in mouse hepatitis virus strain A59-infected cells: effects of tunicamycin. *J. Virol.*, 1982, **40**, 350-357.
- [21] STURMAN, L.S., The structure and behaviour of coronavirus. *Advanc. exp. Med. Biol.*, 1981, **142**, 1-18.
- [22] VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. & BABIUK, L.A., Effects of tunicamycin and monensin on biosynthesis, transport and maturation of bovine herpes virus type 1 glycoproteins. *Virology*, 1985, **143**, 104-118.