

Le coronavirus respiratoire porcin PRCV : un virus émergent pas comme les autres

H. Laude*
D. Rasschaert*
B. Delmas*
J.-F. Eleouët*

Résumé. À partir de 1984, un virus respiratoire inconnu jusqu'alors, responsable d'une infection essentiellement inapparente, a rapidement et massivement diffusé au sein de la population porcine européenne. Quelques années plus tard, des virus aux caractéristiques similaires ont été identifiés aux États-Unis. Tout porte à croire que cet agent, désigné PRCV, dérive du coronavirus TGEV, l'agent causal de la gastro-entérite transmissible. L'objectif de cet article est de faire le point des connaissances accumulées sur ce nouvel agent et sur l'infection qu'il engendre, l'accent étant mis sur les données moléculaires. Ces dernières ont en effet permis de préciser la nature des événements associés à l'émergence du PRCV. Tous les génotypes connus de PRCV se caractérisent par la présence de délétions multiples, dont l'une touche le gène spécifiant la protéine de spicule. L'étude de ce virus a assurément ouvert des pistes qui devraient déboucher sur une meilleure compréhension du déterminisme auquel obéit le tropisme – intestinal ou respiratoire – de ce groupe de coronavirus, dont certains infectent l'homme.

Mots clés : *Coronavirus – Virus émergent – Porcine respiratory coronavirus – PRCV – TGEV – Pneumotropisme – Entérotropisme.*

Summary. Since 1984, a previously unrecognized respiratory coronavirus, causing a mostly unapparent infection, has rapidly and massively spread within the swine population in Europe. A few years later, viruses with similar characteristics have been identified in the USA. The agent, designated PRCV, appears to be derived from the porcine enteropathogenic virus TGEV. The aim of this review is to analyze the data regarding this new agent and the infection it induces, mainly from a molecular point of view. Indeed, such investigations have greatly contributed to elucidate the nature of the events involved in the emergence of PRCV. All the PRCV genotypes known to date are characterized by the presence of multiple deletions, one of each targets the gene encoding the spike protein. The study of this virus has undeniably brought new insights about the bases determining the tropism – either intestinal or respiratory – of this group of coronaviruses, some of which infect humans.

Key words : *Coronavirus – Emerging virus – Porcine respiratory coronavirus – PRCV – TGEV – Pneumotropism – Enterotropism.*

* Unité de virologie immunologie moléculaires, INRA, 78350 Jouy-en-Josas

Tirés à part : H. Laude

Ces dernières années ont vu se manifester un regain d'attention pour les virus émergents ou réurgents qui menacent l'espèce humaine, un phénomène auquel les espèces animales n'échappent pas non plus. L'espèce porcine ne demeure pas en reste, ainsi qu'on peut en juger : 1991, extension d'une infection responsable de désordres respi-

ratoires et dysgénésiques due à un artérovirus inconnu jusqu'alors, le PRRSV, devenu en l'espace de quelques années un agent pathogène majeur en Europe comme aux États-Unis ; 1997, résurgence de viroses hautement contagieuses que l'on croyait à tort jugulées, telles que la peste porcine classique, qui a conduit à l'abattage de dizaines de

milliers d'animaux dans plusieurs pays d'Europe, et la fièvre aphteuse dont la brutale apparition à Taïwan, premier fournisseur du marché asiatique, a entraîné la perte de près de 5 millions de têtes en quelques mois.

Cet article se rapporte à un épisode déjà plus ancien mais à certains égards tout aussi édifiant, causé par un virus respiratoire du porc inconnu jusqu'en 1984, et qui, à partir de cette date, a très rapidement et massivement infecté l'ensemble du cheptel européen. L'affaire fit grand bruit à l'époque, bien que l'infection soit pratiquement silencieuse au plan clinique, et qu'elle n'ait eu, tout compte fait, qu'une faible répercussion sur la production porcine. Ainsi que l'ont clairement démontré les études menées depuis pour identifier ce nouvel agent, le virus PRCV (acronyme international pour *porcine respiratory coronavirus*) est très étroitement apparenté à un coronavirus bien connu chez le porc, le TGEV (*transmissible gastroenteritis virus*), agent causal de la gastro-entérite transmissible. En fait, comme on le verra plus loin, tout porte à croire que le PRCV représente un variant du virus entéropathogène TGEV, spontanément apparu sur le terrain.

L'épidémiosurveillance révèle l'entrée en lice d'un nouvel agent

La gastro-entérite transmissible (GET) est une virose bien connue depuis les années 1940, responsable de pertes économiques très importantes dans la plupart des pays producteurs de viande porcine. Maladie très contagieuse, elle

atteint les animaux de tous âges, mais sévit avec une particulière gravité chez le nouveau-né, avec un taux de mortalité souvent proche de 100 % chez les porcelets de moins de deux semaines [1, 2]. En France, comme dans les pays avoisinants, elle a longtemps évolué sous une forme endémique, selon un mode cyclique, avec un taux d'infection allant jusqu'à 30 % des élevages.

Au cours des années 1983-1985, des contrôles sérologiques de routine effectués dans divers pays d'Europe, dont la Belgique, la France et la Grande-Bretagne, ont révélé une augmentation très significative de la prévalence en anticorps anti-TGEV dans les élevages alors même qu'aucun accroissement d'épisodes diarrhéiques évocateurs de GET n'était observé [3-5]. C'est dans le laboratoire de M. Pensaert, à Gand, que l'agent causal a été isolé pour la première fois à partir d'écouvillonnages nasaux pratiqués sur des animaux sentinelles qui, après introduction dans l'élevage, avaient montré une séroconversion en l'absence de signes cliniques [6]. Le virus a pu être propagé dans des cultures de cellules épithélioïdes de porc, telles que la lignée ST, couramment utilisée pour multiplier le TGEV. En microscopie électronique, les virions avaient l'aspect typique des coronavirus, caractérisés par une couronne de spicules particulièrement proéminents et renflés à leur extrémité, d'où cette famille de virus tire son nom (*figure 1, A*). L'infectiosité était neutralisable par un sérum anti-TGEV, et la réinoculation à des porcelets nouveau-nés du virus isolé en culture engendrait une infection asymptomatique.

Durant la seconde moitié des années 1980, l'infection s'est étendue à l'ensemble des pays européens avec une

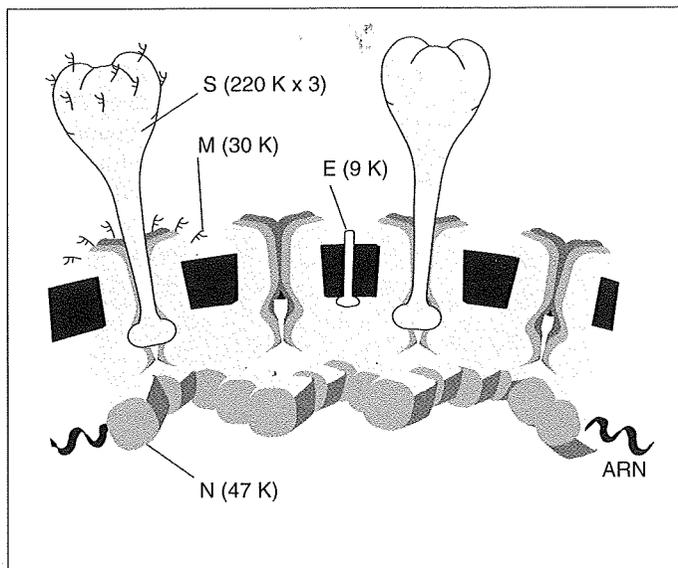
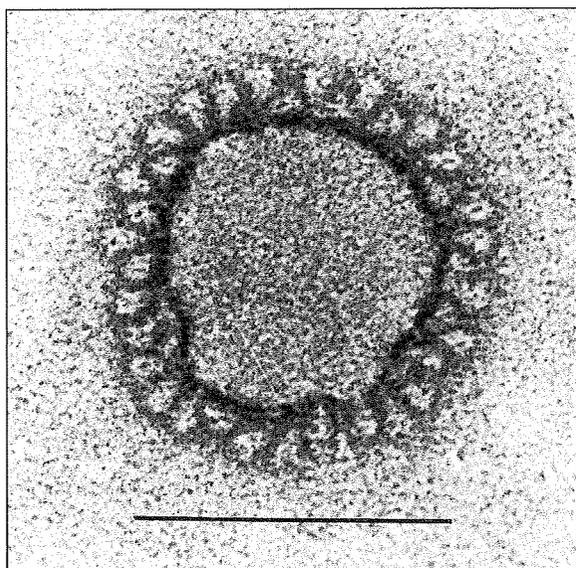


Figure 1. A. Aspect d'une particule de PRCV examinée en microscopie électronique après coloration négative (cliché Rob Ruigrock, EMBL, Grenoble). Barre = 100 nm. B. Vue schématique montrant la topologie des protéines associées aux virions de TGEV. Le nombre de spicules par virion est estimé à une centaine.

prévalence proche de 100 %, à telle enseigne que se procurer des animaux séronégatifs vis-à-vis du TGEV à l'issue de cette première vague relevait pour ainsi dire de la gageure... Le fait que le virus ait diffusé d'une manière aussi rapide et efficace, y compris dans un pays tel que le Danemark [7], dont les normes d'hygiène sont particulièrement exigeantes et qui jusqu'alors était indemne de TGEV, plaide fortement en faveur d'une dissémination par voie aérienne. Des virus ayant des caractéristiques similaires à celles du PRCV européen ont depuis été isolés aux États-Unis, en Asie et dans les pays de l'Est [8, 9]. L'émergence soudaine de ce nouvel agent n'a pas manqué de susciter une légitime interrogation quant à son origine. L'un des scénarios évoqués était particulièrement préoccupant puisqu'il mettait en cause une intervention humaine, à savoir des essais d'immunisation par voie aérienne utilisant une souche de TGEV atténuée, tels qu'ils furent un temps pratiqués en Europe de l'Est, et qui auraient pu avoir pour conséquence de générer un variant au tropisme respiratoire exacerbé. Un phénomène naturel de recombinaison intergénomique entre TGEV et un autre coronavirus sérologiquement apparenté, tel que celui du chat ou du chien, ou un franchissement accidentel de la barrière d'espèce par un coronavirus non répertorié sévissant chez une espèce sauvage, furent également envisagés [9]. C'est un travail d'investigation centré sur l'organisation génomique et la structure antigénique du PRCV qui apporta non seulement des éléments de réponse à cet égard, mais également des outils permettant de distinguer commodément ces deux virus, dont l'étroite proximité rendait les techniques de sérologie classiques inopérantes.

Le PRCV : un virus TGEV au tropisme tissulaire profondément altéré

Les coronavirus infectent les animaux – oiseaux compris – et l'homme avec une spécificité d'hôte assez étroite et un tropisme électif pour l'épithélium des surfaces muqueuses [10]. La majorité d'entre eux provoquent une infection aiguë, restreinte à la sphère digestive ou respiratoire. Leur réplication s'accomplit dans le cytoplasme de la cellule et induit en général un effet cytopathique marqué. Le TGEV est un virus typiquement entéropathogène, dont la multiplication est essentiellement limitée à l'intestin grêle, lequel constitue à la fois le site de multiplication primaire et le siège principal des lésions [1, 11]. Là, le virus se réplique sélectivement dans les entérocytes différenciés, provoquant ainsi une desquamation accélérée qui aboutit à une atrophie rapide et prononcée des villosités intestinales, directement responsable du syndrome de malabsorption-déshydratation observé. L'organe cible est atteint par la voie orale, après franchissement de la barrière sto-

macale, ce qui est exceptionnel pour un virus enveloppé. L'immunofluorescence permet de détecter la présence d'antigène viral dans les entérocytes quelques heures après une administration *per os* de virus, excluant donc un site de réplication intermédiaire [11].

Chez les animaux infectés par le PRCV, c'est incontestablement le tractus respiratoire qui devient le site majeur de multiplication du virus. Il est aisément isolé à partir de la muqueuse nasale, des amygdales, de la trachée et des poumons. Des titres infectieux de l'ordre de 10^8 TCID₅₀/g de tissu ont été mesurés dans le lobe pulmonaire apical d'animaux âgés d'une semaine infectés expérimentalement par voie oronasale [12, 13]. L'immunofluorescence révèle que le virus se réplique dans les cellules épithéliales des muqueuses nasales et trachéales, et, au niveau du poumon, surtout dans l'épithélium alvéolaire, mais aussi celui des bronches et bronchioles. De l'antigène viral est également présent dans les macrophages alvéolaires. À l'inverse du TGEV, le PRCV infecte l'intestin grêle de manière très ténue, même suite à une administration *per os* [12-14]. La présence du virus n'est mise en évidence que dans un faible nombre de cellules, et seulement chez des animaux infectés très jeunes.

Bien que se multipliant intensément dans la sphère respiratoire, le PRCV y exerce un pouvoir pathogène pour le moins discret. Divers essais d'inoculation expérimentale ont fourni des données contrastées, allant, selon les auteurs, de l'absence totale de signes cliniques à une atteinte respiratoire plus ou moins bénigne, incluant dyspnée, éternuement et fièvre modérée [6, 13, 15-17]. Sur le terrain, l'infection à PRCV est très généralement décrite comme étant inapparente et, même en tenant compte de quelques observations discordantes [4, 9, 18, 19], il est indubitable que ce n'est pas l'apparition de désordres respiratoires dans les élevages qui a focalisé l'attention sur ce nouveau type d'infection. Il n'est cependant pas exclu que divers facteurs environnementaux ou des infections intercurrentes puissent moduler l'infection dans le sens d'une aggravation de la symptomatologie [20].

Les observations précédentes ont parfois conduit à assimiler le phénotype du PRCV à celui d'un TGEV qui aurait perdu son tropisme intestinal et, par voie de conséquence, l'essentiel de son pouvoir pathogène. Or cela revient à supposer que le TGEV possède d'emblée un double tropisme, à la fois intestinal et respiratoire. Sur ce dernier point, la littérature apporte des données contradictoires dont la confrontation est souvent malaisée, mais que l'on peut tenter de résumer comme suit. Les études qui font état d'une multiplication notable de TGEV dans la sphère respiratoire portent en majorité sur des souches ayant subi une, voire plusieurs dizaines de passages en culture cellulaire [9, 21-23]. À l'inverse, la réplication de souches sauvages, telles que les souches de référence Miller et Purdue,

y apparaît extrêmement limitée, avec toutefois des exceptions possibles [8, 24, 25].

En somme, le TGEV posséderait un tropisme respiratoire « latent », peut-être plus ou moins accentué selon les souches, et que la propagation *ex vivo* tend certainement à exacerber, à l'inverse de l'entérovirulence. Cela étant, l'intensité de la multiplication dans les voies aériennes ou les poumons ne semble jamais atteindre celle observée avec le PRCV européen, lequel présenterait donc bien un pneumotropisme substantiellement accru par rapport au TGEV. D'autres faits viennent étayer cette dernière notion. Un étude de l'immunité muqueuse induite lors d'une infection expérimentale par voie oronasale a montré que le TGEV stimulait fortement les tissus lymphatiques associés à l'intestin mais faiblement les tissus lymphatiques bronchiques [26]. Ensuite, aucune souche de TGEV n'a par le passé manifesté une telle capacité de diffusion sur le terrain. Il est donc douteux que la modification de tropisme du PRCV puisse se résumer à une simple perte d'entérotropisme.

Le coronavirus TGEV : organisation génomique et structurale

Le génome des coronavirus est constitué d'une molécule d'ARN non segmentée d'environ 30 kilobases (kb), ce qui en fait le plus grand génome à ARN connu à ce jour. De polarité positive, l'ARN génomique (ARNg) se montre infectieux après transfection dans le cytoplasme de la cellule. Outre sa taille inhabituelle, ce génome se caractérise par une relative plasticité que reflète la présence de quatre domaines polymorphes au sein desquels le nombre et la nature des gènes peut varier d'un sous-groupe à l'autre, un peu à l'image de ce qui s'observe chez les rétrovirus complexes. Le nombre des cadres de lecture (ORF) varie en effet de 7 à 11 selon les virus [27]. Cependant, l'organisation générale du génome, notamment la taille imposante du gène 1 et l'ordre des gènes communs, est conservée, comme l'atteste la séquence nucléotidique complète établie à ce jour pour quatre virus, dont le TGEV [28].

Le génome de ce dernier compte 9 ORF (figure 2). Les deux premiers ORF en région 5', désignés 1a et 1b, de 12 et 8 kb respectivement, occupent à eux seuls plus des deux tiers du génome. Traduits directement à partir de l'ARNg, ils codent pour deux polyprotéines d'environ 400 K (1a) et 700 K (1a + 1b). La fusion des deux ORF s'effectue avec une efficacité d'environ 30 % selon un mécanisme de saut de phase -1 du ribosome, favorisé par une structure de type pseudonœud. ORF1a code notamment pour deux types de protéases censées participer à la maturation des polyprotéines. Les activités polymérase, hélicase, etc. nécessaires à la réplication et à la transcription apparaissent regroupées

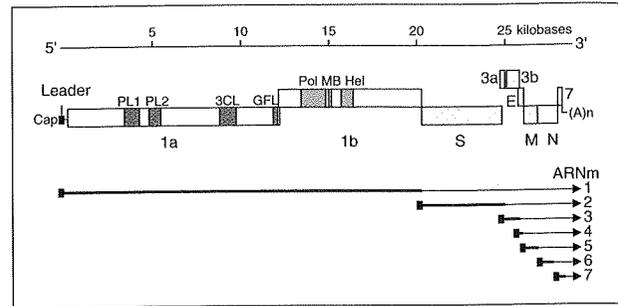


Figure 2. Organisation et expression du génome du TGEV. L'ARN génomique (ARNg), long de 28 580 nt, se subdivise en deux régions distinctes. Le gène 1 (ou locus *pol*) code pour deux polyprotéines, 1a et 1a + 1b, dont dérivent des sous-unités polypeptidiques qui interviennent soit dans leur maturation protéolytique (1a), soit dans la réplication et la transcription virale (1b). Domaines fonctionnels prédits dans le locus *pol* : PL : *papain-like* ; 3CL : *poliovirus 3C-like* ; GFL : *growth factor-like* ; Pol : polymérase ; MB : *metal binding* ; Hel : hélicase. L'information génétique de la région 3' du génome ($\approx 8,5$ kb) s'exprime par l'intermédiaire d'ARN de taille sous-génomique (ARNsg), coterminaux en 3' et munis en 5' d'une séquence *leader* identique à l'extrémité 5' de l'ARNg. Ces ARNsg, numérotés de 2 à 7, spécifient les quatre protéines structurales S, M, E et N et les protéines non structurales ns3a, ns3b et ns7. La partie traductionnellement active des ARNsg et sg est figurée par un trait gras.

dans l'ORF1b. Le locus *pol* (polyprotéine), dont l'exploration n'a débuté que récemment, reste un peu la *terra incognita* des coronavirus.

Les sept autres ORF sont regroupés dans les 8,5 kb restant à l'extrémité 3' du génome, qui a été plus amplement étudiée [29-31]. Ils codent d'une part pour les quatre protéines structurales S, M, E et N communes à l'ensemble des coronavirus, et d'autre part pour trois protéines supposées non structurales et dont la fonction reste totalement inconnue : 3a, 3b et 7. L'information génétique contenue dans cette région 3'-proximale est exprimée par l'intermédiaire d'une série d'ARNm de taille subgénomique – ou ARNsg –, au nombre de six chez la plupart des souches de TGEV [31]. Les ARNsg sont synthétisés selon un processus de transcription discontinue, au cours duquel une séquence dite *leader* (≈ 90 nt dans le cas du TGEV), identique à l'extrémité 5' de l'ARNg, est fusionnée avec le corps de l'ARNsg. Une séquence hexamérique conservée CUAAC, ou séquence TIS (*transcription intergenic sequence*), présente sur l'ARNg en amont des ORF, joue un rôle clé, encore incomplètement élucidé, dans la synthèse des différentes espèces d'ARNsg [27, 31, 32]. Les ARNg et sg sont coterminaux en 3' mais fonctionnellement monocistroniques car seul l'ORF positionné en 5' est activement traduit. Seul fait exception l'ARNm 3, à partir duquel s'expriment les ORF 3a et 3b. Une souche de TGEV (Miller) utilise cependant une unité transcription-

nelle distincte pour exprimer ORF3b [33], l'ARNm surnuméraire étant alors désigné 3-1. La stratégie d'expression passant par la synthèse d'une série d'ARN cotermi- naux est partagée par les coronavirus, les torovirus et les artérovirus, trois groupes de virus animaux désormais réunis dans l'ordre des *Nidovirales* [27].

L'organisation polypeptidique des virions – quatre protéines seulement – est relativement simple eu égard à la capacité codante du génome [34, 35] (*figure 1, B*). La nucléocapside, dont la structure – symétrie hélicoïdale ou polygonale – est encore sujette à discussion, est constituée de la phosphoprotéine N (47 K), qui est associée à l'ARNg [36]. L'enveloppe comporte deux protéines majeures. La protéine S (220 K), fortement glycosylée, forme les spicules par trimérisation [37, 38]. On a coutume (en référence à un site de clivage existant dans d'autres sous- groupes de coronavirus) de subdiviser la molécule en deux régions : S1 (\approx moitié N-terminale), qui correspond à la partie globulaire des spicules, et S2, qui comprend la tige, un segment transmembranaire et un court segment interne. La glycoprotéine M (\approx 30 K) est au contraire enfouie dans l'enveloppe virale (trois segments transmembranaires) et au sein de la particule, et ne laisse émerger qu'un bref ectodomaine d'une trentaine d'acides aminés [29]. La protéine E (ou sM) est une petite protéine transmembranaire (9 K) qui n'est présente qu'à une vingtaine d'exemplaires dans les virions, mais qui, en association avec M, joue un rôle déterminant dans le processus de bourgeonnement [35, 39].

Caractérisation moléculaire du PRCV : un virus multidélétant

La séquence génomique du PRCV européen (isolat RM4) a été déterminée sur une longueur d'environ 8,5 kb à partir de l'extrémité 3', soit la région qui comprend l'ensemble des gènes exprimés par l'intermédiaire d'ARNsg [40]. La comparaison avec les séquences homologues de TGEV a apporté plusieurs informations dignes d'intérêt. Comme attendu, les deux virus sont phylogénétiquement très proches : le degré de divergence globale des séquences, tant nucléotidique que polypeptidique, n'excède pas 3 %, et ne diffère pas significativement de ce qui s'observe entre deux souches de TGEV. De plus, les acides aminés divergents sont répartis dans les différents gènes. La seule différence marquante entre les deux virus est l'existence de plusieurs délétions dans le génome du PRCV. Cette perte partielle d'information génétique concerne deux gènes : S et 3a.

L'examen de la séquence révèle l'existence d'une délétion en phase de 672 nt dans la région 5' du gène S, dont la conséquence prédite est une protéine longue de

1 209 acides aminés, au lieu de 1 431 ou 1 433 pour le TGEV, selon les souches (*figure 3*). Le PRCV spécifie donc une protéine tronquée en région N-terminale de S1, peu après le peptide de translocation. De fait, la masse relative de la protéine S synthétisée dans les cellules infectées par le PRCV, à savoir 190 K au lieu de 220 K, est réduite dans la proportion attendue (\approx 15 %), la taille des protéines M et N restant, elle, inchangée [40]. Il apparaît donc que la protéine S, en dépit des fonctions biologiques essentielles qu'elle exerce (attachement, fusion), peut s'accommoder d'une perte de substance notable. Ce fait plutôt inattendu a également été observé dans le cas du coronavirus murin MHV-JHM, qui code pour une S délétée de 152 résidus, dans une région différente de S1 [27]. L'antigénicité de la S de PRCV n'est que modérément affectée, avec toutefois une perte totale de réactivité vis-à-vis d'anticorps monoclonaux définissant l'un des quatre sites antigéniques majeurs recensés sur la protéine S du TGEV, le site D [41-43]. Ce site regroupe des épitopes effectivement associés à un segment polypeptidique inclus dans la région délétée du PRCV. De tels anticorps discriminants ont permis la mise au point d'un test sérologique permettant de différencier les deux types d'infection sur le terrain [44].

Le génome du PRCV européen comporte en outre trois courtes délétions de 12, 22 et 36 nt, qui ont pour effet de convertir le gène 3a en pseudogène (*figure 4*) : en sus de la perte du codon initiateur, on constate une altération du motif TIS, dont une conséquence attendue est la disparition d'un ARNsg équivalent à l'ARNm 3 du TGEV, effectivement constatée dans les cellules infectées. L'expression de l'ORF immédiatement en aval, homologue à l'ORF3b du TGEV, est toutefois maintenue [40]. Une séquence TIS fonctionnelle en amont de PRCV 3b permet la transcription d'un ARNsg équivalent à l'ARNm 3-1 surnuméraire déjà observé dans le cas de la souche de TGEV Miller.

Le mécanisme responsable de tels remaniements reste conjectural. L'examen de la séquence du TGEV ne révèle pas la présence, aux abords des régions incriminées, de courtes

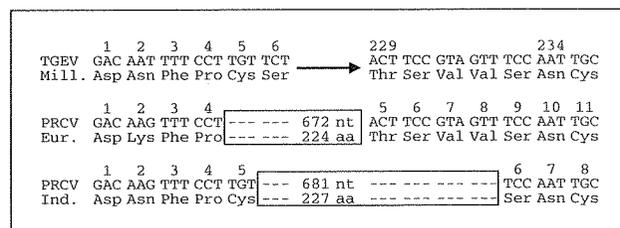


Figure 3. Alignement des séquences nucléotidiques et polypeptidiques (peptide signal omis) du gène codant pour la protéine spiculaire S du TGEV (Miller) et des isolats de PRCV européen et américain (Indiana). Le nombre de nucléotides (nt) et d'acides aminés (aa) délétés dans le génome du PRCV est indiqué.

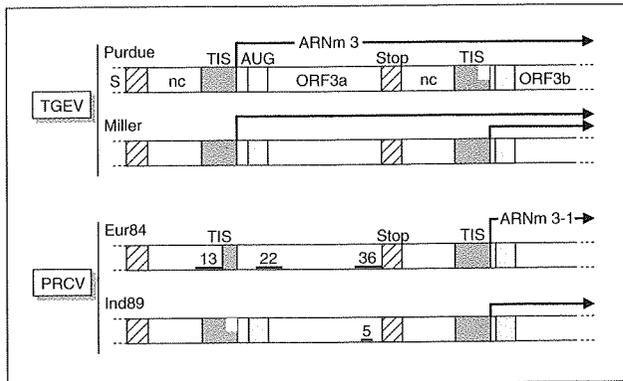


Figure 4. Structure comparée des gènes 3 des TGEV et PRCV. La taille (nt) et la position approximative des délétions présentes dans le génome du PRCV sont indiquées. La séquence TIS (*transcription intergenic sequence*), située en amont de l'ORF3a du PRCV, est non fonctionnelle par suite soit d'une délétion partielle (Eur), soit d'une mutation (Ind).

régions d'homologie qui auraient pu favoriser une recombinaison « légitime », résultant d'un décrochement de la polymérase suivi d'un réamorçage en aval. Il est donc probable que ces délétions sont survenues, de façon séquentielle, selon un mécanisme de recombinaison illégitime, analogue à celui qui donne naissance aux génomes défectifs observables dans les cellules infectées par les coronavirus [27].

Un ou plusieurs virus PRCV ?

Les délétions observées au niveau des gènes S et 3a se sont révélées strictement identiques pour 6 isolats de PRCV provenant de quatre pays différents [45, 46]. L'analyse de la séquence partielle du gène S (moitié N-terminale) renforce encore l'idée que c'est bien le même virus qui a diffusé dans l'ensemble de l'Europe. Il n'existe malheureusement aucune information sur la séquence de souches de TGEV isolées du terrain à un moment proche de l'émergence du PRCV. Le terme de comparaison le moins éloigné est une souche anglaise isolée en 1970. Cela étant, si l'on se réfère au taux de substitution moyen d'environ 7×10^{-4} nucléotides/site/an estimé sur 2 kb en 5' du gène S de 5 souches de TGEV isolées entre 1940 et 1970 [46], la divergence des virus PRCV et TGEV correspondrait effectivement à un événement récent. Incidemment, ce point ne plaide guère en faveur de la diffusion d'une souche atténuée par passage itératif en culture, évoquée comme origine possible du PRCV, car les souches de laboratoire recensées dérivent de virus isolés bien avant les événements.

Dans les années qui ont suivi l'émergence du PRCV européen, plusieurs variants pneumotropes ont été isolés aux États-Unis, dont l'étude a apporté des informations à la fois précieuses et étonnantes. La première séquence partielle établie, celle de l'isolat Ind/89, a en effet révélé que, si les remaniements observés ciblaient les mêmes régions du génome, leur nature précise était différente [47]. À l'instar du virus européen, l'isolat Ind/89 code pour une protéine S tronquée en région N-terminale, mais la longueur et la position de la délétion diffèrent (*figure 3*). Quant à l'ORF3a, elle ne comporte qu'une seule délétion, et la séquence TIS est présente mais mutée, d'où l'absence du transcrite correspondant, tout comme dans le cas du PRCV européen (*figure 4*). La surprise ne s'arrêtait cependant pas là, car le séquençage partiel d'autres isolats américains a permis de constater l'existence de plusieurs génotypes associant un gène S tronqué et un gène 3 altéré, apparemment issus d'événements indépendants, au moins en partie [48] (*figure 5*).

Ces données suggèrent que l'émergence de souches de PRCV serait en fait un phénomène permanent, passé jusqu'à présent inaperçu, et mis en lumière suite à l'alerte suscitée par l'explosion du PRCV en Europe. De tels variants pourraient apparaître à la faveur d'infections persistantes, parfois observées chez des animaux adultes [49]. Comment alors expliquer le contraste saisissant entre une telle situation et celle, en apparence hégémonique, créée par le virus européen ? On peut invoquer, avec prudence, des différences relatives à la structure des élevages, voire à l'utilisation, semble-t-il assez répandue aux États-Unis (environ un quart des exploitations), d'un vaccin commercial induisant une réponse humorale à défaut d'une solide protection [26]. Enfin, il faut aussi retenir l'hypothèse d'un isolat européen doté d'un pouvoir de diffusion exceptionnel.

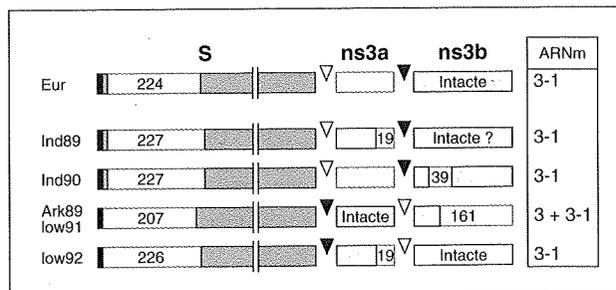


Figure 5. Structure comparée des gènes S et 3 des différents génotypes connus de PRCV. Les régions traduites apparaissent en grisé. La longueur et la position des délétions prédites dans les protéines S, ns3a et ns3b sont indiquées. Les séquences TIS non fonctionnelles sont désignées par un triangle blanc. Les espèces d'ARNm transcrites à partir du gène 3 détectées dans les cellules infectées par chacun des génotypes sont indiquées à droite.

Le virus PRCV : une clé pour l'élucidation des déterminants impliqués dans le pouvoir entéropathogène du TGEV

Il paraît important, tant dans une perspective fondamentale qu'appliquée, de chercher à comprendre le déterminisme moléculaire du tropisme du coronavirus hautement entéropathogène qu'est le TGEV. À cet égard, il est indéniable que l'étude comparée des génotypes TGEV et PRCV a ouvert des pistes dont l'exploration ne fait que commencer, mais qui devraient déboucher sur une meilleure appréhension des mécanismes en cause. Rappelons brièvement les faits : 1) une série de variants pneumotropes apathogènes du TGEV sont isolés sur le terrain ; 2) ces variants sont tous des multidélétants, issus d'événements partiellement ou totalement indépendants ; 3) deux gènes, qui codent pour les protéines S et ns3a, se révèlent être les cibles privilégiées de ces délétions. Quels pourraient être, à la lumière des connaissances disponibles, les effets biologiques induits par des altérations touchant ces deux gènes ?

ns3a : une protéine superflue pour le virus respiratoire ?

L'ORF3a code pour un polypeptide de 71 ou 72 acides aminés, effectivement détectable dans le cytosol des cellules infectées par le TGEV. L'on ignore tout du rôle de cette protéine virtuellement non structurale et, actuellement, aucun élément ne plaide pour ou contre une éventuelle implication de ns3a dans le pouvoir entéropathogène du TGEV. L'altération de 3a est une caractéristique quasi constante du génotype PRCV (*figure 5*). Dans trois des cinq génotypes de PRCV connus, ce gène est converti en pseudogène et un quatrième génotype coderait pour un produit tronqué d'une vingtaine de résidus en C-terminal. Le cinquième génotype comporte un gène 3a prédit comme fonctionnel, et pourrait correspondre à un intermédiaire de transition de TGEV vers PRCV. La caractérisation de cet isolat, notamment en termes de virulence résiduelle, est malheureusement trop sommaire pour que l'on puisse en tirer une conclusion valide quant à l'influence de ns3a sur le pathotype.

Quoi qu'il en soit, l'inactivation complète du gène 3a prédite chez plusieurs isolats confirme que son produit n'est pas indispensable à la réplication virale en culture comme chez l'animal. La présence d'une délétion dans l'ORF3a avait déjà été constatée chez deux souches TGEV de laboratoire, SP et SG188, qui, bien que codant pour une protéine S de taille apparemment normale, ont un pathotype approchant celui du PRCV, à savoir un aspect petite plaque en culture et un pouvoir entéropathogène fortement

amoindri [50, 51]. Dans les deux cas cependant, la délétion au sein du gène 3 affecte également l'ORF3b, de sorte que l'interrogation quant au rôle potentiel de ns3a subsiste. Il est à noter au passage qu'une protéine 3b tronquée est prédite dans deux des génotypes de PRCV établis (*figure 5*). Un scénario possible est que les délétions siégeant au niveau du gène 3 correspondraient à des événements secondaires, susceptibles de n'intervenir que postérieurement à l'altération du gène S, laquelle, dans cette hypothèse, serait essentiellement responsable du changement de tropisme. Autrement dit, l'expression du gène 3a (et éventuellement 3b), ne serait indispensable au virus que lorsque celui-ci se réplique dans l'intestin.

Protéine S : un déterminant clé associé au domaine N-terminal

Les cinq génotypes de PRCV recensés codent pour une protéine S largement tronquée en région N-terminale (*figure 5*). La délétion laisse intacts de 0 à 6 acides aminés en aval du peptide de translocation et s'étend sur 207 à 227 acides aminés selon les isolats, avec une délétion consensus allant des positions 7 à 208. Elle touche donc la région prédite comme étant globulaire du spicule (S1), en n'y induisant que des changements conformationnels somme toute discrets, puisque la plupart des épitopes associés aux régions de la protéine S communes à PRCV et TGEV sont préservés. Cela renforce l'idée que le domaine unique au TGEV est assez autonome au plan conformationnel, ainsi que l'avait suggéré un travail antérieur [41]. Cette région N-terminale de S est celle qui se montre la plus divergente parmi les membres du sous-groupe génétique apparenté au TGEV (à titre d'exemple, 70 % de divergence, dans le segment N-terminal contre 30 % pour le reste de la molécule entre TGEV et le coronavirus félin FIPV, qui sont deux virus antigéniquement très proches [52]).

Par ailleurs l'alignement de l'ensemble des séquences de la protéine S de ce sous-groupe a conduit à une constatation frappante (*figure 6*) : le virus respiratoire HCV 229E, l'un des agents du rhume commun chez l'homme, code aussi pour une protéine S tronquée dans cette même région, ce à la différence des virus entérotropes, notamment le virus entérique porcin PEDV qui, pourtant, est génétiquement plus proche du virus humain HCV 229E que du TGEV [53]. C'était là le premier indice en faveur d'un rôle du domaine N-terminal dans le tropisme tissulaire de ce groupe de coronavirus.

Diverses évidences expérimentales sont venues par la suite étayer cette thèse. Ainsi, l'analyse du pouvoir pathogène chez le porcelet nouveau-né de mutants du TGEV, sélectionnés vis-à-vis d'anticorps monoclonaux dirigés contre une série d'épitopes associés à la région S1, a permis d'identifier six mutants indépendants très fortement

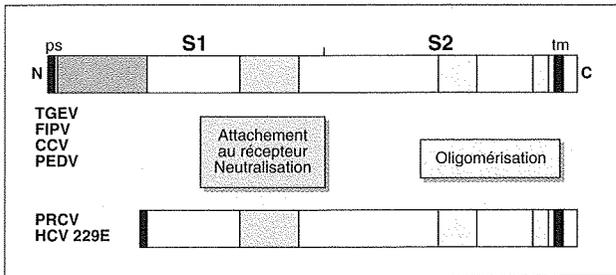


Figure 6. Organisation schématique de la protéine S des coronavirus appartenant au même sous-groupe génétique que TGEV. Les régions S1 et S2 correspondent à la région globulaire et à la tige du spicule, respectivement. Différents domaines fonctionnels sont indiqués, dont le domaine en grisé foncé auquel serait associé un déterminant crucial pour le tropisme intestinal. Les virus TGEV, FIPV/FECV (*feline infectious peritonitis/feline enteritis coronavirus*), CCPV (*canine enteritis coronavirus*) et PEDV (*porcine epidemic diarrhoea*) sont entérotropes, PRCV et HCV 229E sont pneumotropes. ps : peptide signal ; tm : segment transmembranaire.

atténués relativement aux autres mutants dont le pouvoir pathogène était comparable à celui du virus parental [54]. Tous ces mutants, sans exception, codaient pour une protéine S ayant une substitution ou une brève délétion touchant les positions 145 à 155 (protéine mature), donc au cœur de la région manquant à la S du PRCV (figure 7). En culture, leur phénotype était indistinguable de celui du virus parental. Ces résultats incitaient à conclure qu'un déterminant crucial pour l'expression du pouvoir entéropathogène est bien associé à la région N-terminale de S. Plus récemment, un groupe espagnol a rapporté des données allant dans le même sens. Une série de virus recombinants intergénomiques ont été sélectionnés à partir de cultures co-infectées avec une souche haut-passage de TGEV, dotée d'un double tropisme entérique et respiratoire, et une souche variante ayant perdu son tropisme entérique (PTV-ts). Les séquences de leur protéine S diffèrent à deux positions, 56 et 203. Tous les recombinants issus d'un *crossing over* dans le gène S et ayant une séquence 3' PTV incluant ces deux substitutions avaient perdu leur tropisme intestinal mais non leur tropisme respiratoire [55].

Hypothèses sur le rôle potentiel du domaine N-terminal de S dans le pouvoir entéropathogène

Une question de récepteur ?

Des travaux menés en parallèle dans notre équipe avaient conduit à l'identification d'une ectopeptidase associée à la bordure en brosse de l'entérocyte, l'aminopeptidase neutre (APN), comme étant le récepteur majeur du coronavirus TGEV [56]. Il est bien établi que l'interaction spécifique avec un récepteur membranaire de la cellule hôte est, chez

les virus animaux, un déterminant fréquent du tropisme tissulaire. À cet égard, il existe, au niveau de l'intestin, une concordance remarquable entre le site de répllication du TGEV et la distribution de l'APN, à savoir la région apicale des villosités de l'intestin grêle [56]. Il était donc tentant de supposer que la région N-terminale de TGEV S était précisément impliquée dans une telle interaction, expliquant ainsi l'incapacité du PRCV à infecter les entérocytes. En fait, une série d'arguments sont rapidement venus invalider une telle supposition. Tout d'abord, une équipe américaine, s'appuyant sur les travaux effectués sur le TGEV, a établi que le virus respiratoire HCV 229E utilisait l'APN humaine comme récepteur [57]. Des résultats récents montrent d'ailleurs que la reconnaissance de cette molécule est une propriété commune à l'ensemble des virus de ce sous-groupe génétique et que cette interaction est un déterminant majeur de leur spécificité d'espèce [58].

L'APN est fortement exprimée au niveau de la bordure en brosse des entérocytes, mais l'on retrouve cet ectoenzyme associé au pôle apical de nombreuses cellules épithéliales. Cela conduit à postuler que le PRCV, tout comme le virus humain, utilise cette molécule comme voie d'accès aux cellules cibles du tractus respiratoire. Des expériences *in vitro* ont confirmé de manière directe que des cellules naturellement réfractaires au PRCV devenaient infectables dès lors que l'on y transfectait un ADNc codant pour l'APN porciné. De surcroît, nous avons pu montrer que la surexpression de cette molécule n'était pas requise pour conférer la permissivité au virus. Enfin, un travail visant à identifier la structure virale impliquée dans l'interaction avec l'APN a permis d'établir qu'il s'agissait d'un domaine très conservé de la protéine S, bel et bien présent chez les virus codant pour une protéine tronquée [59] (figure 6). Il s'avérerait donc en fin de compte que si la reconnaissance du récepteur APN détermine à la fois l'épithéliotropisme et la spécificité d'espèce de ce groupe

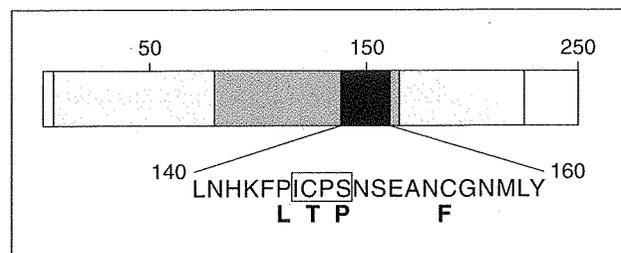


Figure 7. Modifications ponctuelles de la protéine S associées à une perte d'entérovirulence du TGEV. Les substitutions (caractère gras) ou une brève délétion (encadrée) prédites à partir du séquençage partiel de mutants atténués sont regroupées dans le domaine N-terminal. Gris clair : région de la protéine absente dans le PRCV. Gris foncé : fragment protéolytique de TGEV S reconnu par des anticorps discriminant les deux virus.

de coronavirus, leur tropisme d'organe met probablement en jeu d'autres facteurs.

La protéine S tronquée a-t-elle la même affinité pour l'APN que la protéine intégrale ? Ce point serait à éclaircir, d'autant que de récents travaux ont révélé qu'un virus à S courte n'interagissait pas avec l'APN exactement de la même façon qu'un virus à S longue. Tirant parti de l'étroite spécificité de reconnaissance du TGEV pour l'APN porcine (APNp), nous avons montré qu'une molécule d'APN chimérique obtenue en substituant un segment d'APN humaine (APNh) par la région homologue de l'APNp (aa 717-813) avait une activité récepteur pour TGEV [61]. Or, en suivant une approche identique, un groupe allemand a montré qu'une chimère de pAPN comportant le segment aa 132-195 d'APNh était reconnue comme récepteur à la fois par HCV et TGEV [61]. Il existerait donc une différence tangible dans l'interaction de ces deux virus avec leur récepteur respectif, et il n'est pas impossible que cela soit en partie imputable au domaine N-terminal de S. Quoi qu'il en soit, on peut concevoir qu'une modification de la stabilité de l'interaction entre APNp et PRCV, du fait de la perte de ce domaine dans la protéine S, ait des répercussions sur son niveau de répliation dans le tractus digestif.

Il a également été proposé que le domaine N-terminal reconnaît un corécepteur spécifiquement associé aux entérocytes, ce qui implique que ce dernier soit nécessaire à l'infection par le TGEV. Une telle hypothèse aurait le mérite d'expliquer simplement pourquoi le TGEV se réplique avec une efficacité limitée dans l'épithélium respiratoire, où l'APN doit être présente. En revanche, elle paraît difficilement conciliable avec le fait que nous n'avons pas jusqu'à présent trouvé de lignée cellulaire naturellement réfractaire au TGEV qui ne devienne infectable dès lors qu'on lui fait exprimer de l'APNp recombinante [56, 62].

Contribution au maintien de l'intégrité fonctionnelle de S dans la sphère digestive ?

Avant d'atteindre les cellules cibles, le TGEV doit franchir la barrière stomacale et donc survivre à un environnement extrêmement acide. Un travail ancien avait révélé que l'infectiosité du virus ne commençait à être altérée qu'à un pH inférieur à 3 [63], et il est donc plausible qu'une proportion suffisante de virions arrive sans dommage à l'intestin grêle, notamment chez le nouveau-né dont le pH gastrique est plus élevé que celui de l'animal adulte. Cependant, des études récentes sur le mode d'internalisation du TGEV nous ont conduits à proposer que la libération de la ribonucléoprotéine devait intervenir après fusion de l'enveloppe virale avec la membrane des endosomes tardifs (acides) de la cellule [64]. Le démasquage du peptide fusogène de la protéine S serait donc, selon un mécanisme

commun à plusieurs autres virus, tributaire d'un changement conformationnel induit par une protonation. Une conséquence prévisible est l'exposition prématurée du peptide fusogène lors du passage trans-stomacal, laquelle pourrait être sans effet sur le pouvoir infectant du virus à condition que S puisse reprendre sa forme native avant de s'attacher aux entérocytes. La recherche d'éventuelles différences entre les protéines S du PRCV et du TGEV en termes d'activité fusogène, notamment à l'issue d'un traitement à bas pH, mériterait donc attention.

De manière plus générale, on peut imaginer que la perte du domaine N-terminal se traduise par une résistance amoindrie du virus dans le milieu physico-chimique complexe du tractus alimentaire. Une piste, dont l'exploration commence à peine, débouche sur la notion que la protéine S du TGEV pourrait fixer des composants d'origine cellulaire. Comme l'on récemment montré des collègues allemands, la protéine S du TGEV possède une activité hémagglutinante vis-à-vis de l'acide N-glycolylneuraminique dont est dénuée celle du PRCV [65]. Ce premier résultat a incité à examiner l'activité hémagglutinante d'un panel de TGEV mutés dans la protéine S. La plupart de ces mutants ont présenté une activité comparable à celle du virus parental, à l'exception de ceux ayant une substitution dans le domaine N-terminal [66]. Cette propriété, sans incidence sur la multiplication en culture, semble en revanche étroitement corrélée à l'entérovirulence puisque tous les mutants non hémagglutinants correspondent aux mutants fortement atténués décrits plus haut. Un scénario suggéré par ces données est que l'attachement sur ce domaine de sialoglycoconjugués dérivés de la cellule hôte serait un moyen grâce auquel ce virus enveloppé résisterait, *via* une stabilité accrue, à l'environnement particulièrement hostile du tractus digestif.

En conclusion, si l'implication du domaine N-terminal de la protéine spiculaire dans l'entérovirulence du TGEV paraît presque certaine, l'énumération des hypothèses concernant son rôle fonctionnel fait ressortir à quel point sa compréhension nous échappe, et par conséquent celle des effets découlant de sa perte. Ajoutons à cela qu'aucun des scénarios évoqués plus haut ne prend véritablement en compte l'apparente exacerbation du tropisme respiratoire constatée dans le cas du PRCV. Enfin, il ne faut pas perdre de vue que la troncation du gène S n'est pas la seule différence connue entre les génomes du TGEV et du PRCV (l'absence de modification dans le locus *pol* restant d'ailleurs à établir formellement).

Ces interrogations nous font mesurer le parti que l'on pourrait tirer d'une approche de génétique inverse si les outils appropriés étaient disponibles dans le cas des coronavirus comme ils le sont maintenant pour plusieurs familles de virus à ARN. En se remémorant la taille de leur génome, le lecteur averti ne s'étonnera pas que le

développement d'un tel outil se fasse quelque peu attendre. Un jour viendra sans doute où il sera possible de générer à volonté des génotypes intermédiaires entre TGEV et PRCV en vue d'étudier leur virulence et leur tropisme chez le porcelet.

Conclusions

Le fait que le virus respiratoire porcin PRCV dérive du virus TGEV, l'agent causal de la gastro-entérite transmissible, ne laisse plus guère prise au doute. Rien n'indique qu'un contexte particulier, pas plus aux États-Unis qu'en Europe, ait favorisé son émergence. En fait, si l'on considère la situation telle qu'elle est décrite aux États-Unis, où plusieurs isolats distincts circulent sans manifester le caractère d'extrême diffusibilité de l'isolat européen, il n'est pas impossible que l'on ait affaire à une infection demeurée insoupçonnée du fait même de sa discrétion clinique. L'infection à PRCV ne soulève là-bas guère d'autre problème que celui du diagnostic différentiel vis-à-vis de l'infection à TGEV, qui reste, elle, une préoccupation majeure [26]. Cela étant, la prévalence du PRCV y reste mal connue, et il est possible que certains génotypes ne soient pas dénués de pouvoir pathogène.

En Europe, la situation est radicalement différente car, parallèlement à l'invasion du PRCV, la gastro-entérite transmissible a vu son incidence décroître progressivement, jusqu'à ne plus se manifester qu'en de rares occasions [9]. Faut-il y voir une relation de cause à effet ? En d'autres termes, la nature aurait-elle trouvé là le vaccin efficace qu'ont en vain cherché maints laboratoires ? Cette question renvoie évidemment à celle de la protection croisée offerte par le virus respiratoire face à son homologue entérique. Or l'existence d'une compartimentalisation fonctionnelle, assortie d'une réciprocité limitée entre les différents composants du système immunitaire muqueux, est aujourd'hui bien admise [26]. De fait, tous les essais réalisés en condition expérimentale ont conclu au caractère partiel, dans certains cas nul, de la protection, passive ou active, conférée par une immunisation à base de PRCV face à une épreuve virulente par le TGEV [68-70]. Il n'est toutefois pas exclu que le statut immun induit dans l'ensemble de la population, éventuellement associé à l'amélioration du niveau d'hygiène au sein des élevages, ait joué un rôle favorable sur le terrain [9, 71]. Si tel est bien le cas, on peut alors considérer l'incidence de ce virus émergent comme ayant été globalement bénéfique pour la filière porcine... Quoi qu'il en soit, une inconnue demeure, à savoir la manière dont la situation évoluera dans l'avenir.

Le PRCV est, semble-t-il, le premier exemple de variant délété à avoir eu un tel impact épizootologique. Jusqu'à

plus ample informé (c'est-à-dire séquençage intégral du génome), c'est d'une perte partielle d'information génétique que ce virus tient ses nouvelles propriétés, notamment son pneumotropisme exclusif. Cela étant, il est possible que d'autres événements, plus discrets, aient précédé ces délétions, créant une souche ayant un tropisme à la fois intestinal et respiratoire marqué. En tout cas, les remaniements occasionnés par une délétion représentent, outre la recombinaison, un moteur potentiel de l'évolution des coronavirus. Par ailleurs, l'émergence du PRCV confirme que, d'une manière générale, les virus à génomes délétés ne doivent pas échapper à la vigilance que requiert tout virus recombinant évalué à des fins prophylactiques par exemple. En effet, on ne peut *a priori* exclure que l'atténuation recherchée ne s'accompagne de l'acquisition de propriétés tout à fait indésirables, telles qu'un tropisme atypique ou une contagiosité rehaussée, comme l'illustre l'exemple du PRCV européen.

Enfin, ce nouvel agent a apporté une contribution aussi précieuse qu'inopinée aux recherches qui visent à élucider, au niveau moléculaire, la pathogénie de l'infection par le TGEV. Son étude a indéniablement ouvert des pistes susceptibles de déboucher sur l'identification d'un ou plusieurs déterminants de l'entérovirulence. Et peut-être même au-delà, car le tandem TGEV-PRCV pourrait bien nous éclairer sur la curieuse alternative entre sphère respiratoire et digestive à laquelle semble se plier le tropisme de ce groupe de coronavirus. La démarche ne semble pas vaine, ne fût-ce qu'au titre de la pathologie comparée, dans la mesure où des virus très proches sévissent chez l'homme : se pourrait-il ainsi qu'un virus à tropisme intestinal, dont l'intervention a été soupçonnée à diverses reprises [72-74], soit à l'origine de souches pneumotropes du type HCV 229E ?

Remerciements. Les auteurs remercient tout particulièrement deux des personnes associées à ce travail : Jacqueline Gelfi, dont les précieuses compétences techniques ont contribué à l'avancement de ce programme, et Mariela Duarte, dont le travail de thèse a apporté d'utiles connaissances concernant le PEDV.

Références

1. Savey M, Laude H. Les diarrhées néo-natales d'origine virale chez le porc (1). *Le Point Vétérinaire* 1979 ; 9 : 47-54.
2. Laude H, Savey M. Les diarrhées néo-natales d'origine virale chez le porc (2). *Le Point Vétérinaire* 1980 ; 10 : 83-9.
3. Pensaert M, Cox E, Van Deun K, Callebaut P. A seroepizootiological study of the porcine respiratory coronavirus in the Belgian swine population. *Vet Quart* 1993 ; 15 : 16-20.
4. Jestin A, Leforban Y, Vannier P, Madec F, Gourreau J. Un nouveau coronavirus porcin. Études séro-épidémiologiques rétrospectives dans les élevages de Bretagne. *Recl Med Vet* 1987 ; 163 : 567-71.
5. Brown I, Cartwright S. New porcine coronavirus ? *Vet Res* 1986 ; 119 : 282-3.

6. Pensaert M, Callebaut P, Vergote J. Isolation of a porcine respiratory, non-enteric coronavirus related to transmissible gastroenteritis. *Vet Quart* 1986 ; 8 : 257-61.
7. Henningsen AD, Mousing J, Aalund O. Porcine coronavirus (PCV) in Denmark : an epidemiological study based on questionnaire data from screening districts. *Dansk Vet Tidsskrift* 1988 ; 71 : 1168-77.
8. Wesley RD, Woods RD, Hill HT, Biwer JD. Evidence for a porcine respiratory coronavirus, antigenically similar to transmissible gastroenteritis virus, in the United States. *J Vet Diagn Invest* 1990 ; 2 : 312-7.
9. Laude H, Van Reeth K, Pensaert M. Porcine respiratory coronavirus : molecular features and virus-host interactions. *Vet Res* 1993 ; 24 : 125-50.
10. Wege H, Siddell ST, Ter Meulen V. The biology and pathogenesis of coronaviruses. *Curr Top Microbiol* 1982 ; 99 : 165-200.
11. Shepherd RW, Butler DG, Cutz E, Gall DG, Hamilton JR. The mucosal lesion in viral enteritis : extent and dynamics of the epithelial response to virus invasion in transmissible gastroenteritis of piglets. *Gastroenterology* 1979 ; 76 : 770-7.
12. Cox E, Hooyberghs J, Pensaert MB. Sites of replication of a porcine respiratory coronavirus related to transmissible gastroenteritis virus. *Res Vet Sci* 1990 ; 48 : 165-9.
13. O'Toole D, Brown I, Bridges A, Cartwright SF. Pathogenicity of experimental infection with pneumotropic porcine coronavirus. *Res Vet* 1989 ; 47 : 23-9.
14. Cox E, Pensaert M, Callebaut P, Van Deun K. Intestinal replication of a porcine respiratory coronavirus antigenically closely related to transmissible gastroenteritis virus. *Vet Microbiol* 1990 ; 23 : 237-43.
15. Duret C, Brun A, Guillemot H, Dauvergne M. Isolement, identification et pouvoir pathogène chez le porc d'un coronavirus apparenté au virus de la gastro-entérite transmissible. *Recl Med Vet* 1988 ; 164 : 221-6.
16. Onno M, Jestin A, Cariolet R, Vannier P. Rapid diagnosis of TGEV-like coronavirus in fattened pigs by indirect fluorescence labelling in nasal cells. *J Vet Med* 1989 ; B 36 : 629-34.
17. Vannier P. Disorders induced by the experimental infection of pigs with the porcine respiratory coronavirus. *J Vet Med* 1990 ; B 37 : 117-80.
18. Laval A, Le Foll P, Gestin G, Reynaud G. Gripes et coronavirus respiratoire porcin : étude sérologique dans dix élevages bretons. *Recl Med Vét* 1991 ; 167 : 521-8.
19. Van Nieuwstadt AP, Pol JMA. Isolation of a TGEV-related coronavirus causing fatal pneumonia in pigs. *Vet Rec* 1989 ; 124 : 43-4.
20. Van Reeth K, Pensaert MB. Porcine respiratory coronavirus-mediated interference against influenza virus replication in the respiratory tract of feeder pigs. *Am J Vet Res* 1994 ; 55 : 1275-81.
21. Furuuchi S, Shimizu Y, Kumagai T. Multiplication of low and high cell culture passage strains of transmissible gastroenteritis virus in organs of newborn pigs. *Vet Microbiol* 1979 ; 3 : 169-78.
22. Kemény LJ, Woods RD. Upper respiratory infection of lactating sows with transmissible gastroenteritis virus following contact exposure to infected piglets. *Cornell Vet* 1975 ; 65 : 352-62.
23. Laude H, Charley B, Gelfi J. Replication of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) in swine alveolar macrophages. *J Gen Virol* 1984 ; 65 : 327-32.
24. Pensaert MB. Résultats non publiés.
25. Underdahl NR, Mebus CA, Stair EL, Rhodes MB, McGill LD, Twiehaus MJ. Isolation of transmissible gastroenteritis virus from lungs of marked-weight swine. *Am J Vet Res* 1974 ; 35 : 1209-16.
26. Saif LJ. Mucosal immunity : an overview and studies of enteric and respiratory coronavirus infections in a swine model of enteric disease. *Vet Immunol & Immunopathol* 1996 ; 54 : 163-9.
27. Lai MMC, Cavanagh D. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res* 1997 ; 48 : 1-100.
28. Eleouët JF, Rasschaert D, Lambert P, Levy L, Vende P, Laude H. Complete sequence of the polyprotein-encoding gene 1 of transmissible virus. *Virology* 1995 ; 206 : 817-22.
29. Laude H, Rasschaert D, Huet JC. Sequence and N-terminal processing of the transmembrane protein E1 of the coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *J Gen Virol* 1987 ; 68 : 1687-93.
30. Rasschaert D, Laude H. The predicted primary structure of the peplomer protein E2 of the porcine coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *J Gen Virol* 1987 ; 68 : 1883-90.
31. Rasschaert D, Gelfi J, Laude H. Enteric coronavirus TGEV : partial sequence of the genomic RNA, its organization and expression. *Biochimie* 1987 ; 69 : 591-600.
32. Hiscox JA, Mawditt KL, Cavanagh, Britton P. Investigation of the control of coronavirus subgenomic mRNA transcription by using T7-generated negative-sense RNA transcripts. *J Virol* 1995 ; 69 : 6219-77.
33. Wesley RD, Cheung AK, Michael DD, Woods RD. Nucleotide sequence of coronavirus TGEV genomic RNA : evidence for 3 mRNA species between the peplomer and matrix protein genes. *Virus Res* 1989 ; 13 : 87-100.
34. Laude H, Chapsal JM, Gelfi J, Labiau S, Grosclaude J. Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus. I. Properties of monoclonal antibodies directed against virions proteins. *J Gen Virol* 1986 ; 67 : 119-30.
35. Godet M, L'Haridon R, Vautherot JF, Laude H. TGEV coronavirus OF4 encodes a membrane protein that is incorporated into virions. *Virology* 1992 ; 188 : 666-75.
36. Laude H, Masters PS. The nucleocapsid protein. In : Siddell SG, ed. *The Coronaviridae*. New York : Plenum Press, 1995 : 141-63.
37. Delmas B, Laude H. Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression. *J Virol* 1990 ; 64 : 5367-75.
38. Delmas B, Laude H. Carbohydrate-induced conformational changes strongly modulate the antigenicity of coronavirus TGEV glycoproteins S and M. *Virus Res* 1991 ; 20 : 107-20.
39. Vennema H, Godeke GJ, Rossen JWA, et al. Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral protein genes. *EMBO J* 1996 ; 15 : 2020-8.
40. Rasschaert D, Duarte M, Laude H. Porcine respiratory coronavirus differs from transmissible gastroenteritis virus by a few genomic deletions. *J Gen Virol* 1990 ; 71 : 2599-607.
41. Delmas B, Rasschaert D, Godet M, Gelfi J, Laude H. Four major antigenic sites of the coronavirus transmissible gastroenteritis virus are located on the amino-terminal half of spike glycoprotein S. *J Gen Virol* 1990 ; 71 : 1313-23.
42. Laude H, Gelfi J, Rasschaert D, Delmas B. Caractérisation antigénique du coronavirus respiratoire porcin à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre le virus de la gastro-entérite transmissible. *J Rech Porcine Fr* 1988 ; 20 : 89-94.
43. Callebaut P, Correa I, Pensaert M, Jimenez G, Enjuanes L. Antigenic differentiation between transmissible gastroenteritis virus of swine and a related porcine respiratory coronavirus. *J Gen Virol* 1988 ; 69 : 1725-30.
44. Callebaut P, Pensaert M, Hooyberghs J. A competitive inhibition Elisa for the differentiation of serum antibodies from pigs infected with transmissible gastroenteritis virus (TGEV) or with the TGEV-related porcine respiratory coronavirus. *Vet Microbiol* 1989 ; 20 : 9-19.
45. Page KW, Mawditt KL, Britton P. Sequence comparison of the 5' end of mRNA 3 from transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus. *J Gen Virol* 1991 ; 72 : 579-87.
46. Sanchez CM, Gebauer F, Suné C, Mendez J, Dopazo J, Enjuanes L. Genetic evolution and tropism of transmissible gastroenteritis coronaviruses. *Virology* 1992 ; 190 : 92-105.
47. Wesley RD, Woods RD, Cheung AK. Genetic analysis of porcine respiratory coronavirus, an attenuated variant of transmissible gastroenteritis virus. *J Virol* 1991 ; 65 : 3369-73.
48. Vaughn EM, Halbur PG, Paul PS. Sequence comparison of porcine respiratory coronavirus isolates reveals heterogeneity in the S, 3, and 3-1 genes. *J Virol* 1995 ; 69 : 3176-84.
49. Underdahl NR, Mebus CA, Torres-Medina A. Recovery of transmissible gastroenteritis virus from chronically infected experimental pigs. *Am J Vet Res* 1975 ; 36 : 1473-6.
50. Wesley RD, Woods RD, Cheung AK. Genetic basis for the pathogenesis of transmissible gastroenteritis virus. *J Virol* 1990 ; 64 : 4761-6.
51. Britton P, Kottier S, Chen CM, Pocock DH, Salmon H, Aynaud JM. The use of PCR genome mapping for the characterization of TGEV

- strains. In : Laude H and Vautherot JF, eds. *Coronaviruses : molecular biology and virus-host interactions*. New York : Plenum Press, 1992 : 29-34.
52. Jacobs L, De Groot R, van der Zeijst BAM, Horzinek MC, Spaan W. The nucleotide sequence of porcine transmissible gastroenteritis virus (TGEV) : comparison with the sequence of the peplomer protein of feline infectious peritonitis virus (FIPV). *Virus Res* 1987 ; 8 : 363-71.
53. Duarte M, Laude H. Sequence of the spike protein of the porcine epidemic diarrhea virus. *J Gen Virol* 1994 ; 75 : 1195-200.
54. Bernard S, Laude H. Site-specific alteration of transmissible gastroenteritis virus spike protein results in markedly reduced pathogenicity. *J Gen Virol* 1995 ; 76 : 2235-41.
55. Ballesteros ML, Sanchez CM, Enjuanes L. Two amino acid changes at the N-terminus of transmissible gastroenteritis coronavirus spike protein result in the loss of enteric tropism. *Virology* 1997 ; 227 : 378-88.
56. Delmas B, Gelfi J, L'Haridon R, Vogel LK, Sjöström H, Noren O, Laude H. Aminopeptidase N is a major receptor for the enteropathogenic coronavirus TGEV. *Nature* 1992 ; 357 : 417-20.
57. Yeager CL, Ashmun RA, Williams RK, et al. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature* 1992 ; 357 : 420-2.
58. Benbacer L, Kut E, Besnardeau L, Laude H, Delmas H. Interspecies aminopeptidase-N chimeras reveal species-specific receptor recognition by canine coronavirus, feline infectious peritonitis virus, and transmissible gastroenteritis virus. *J Virol* 1997 ; 71 : 734-7.
59. Godet M, Grosclaude J, Delmas B, Laude H. Major receptor-binding and neutralization determinants are located within the same domain of the transmissible gastroenteritis virus (coronavirus) spike protein. *J Virol* 1994 ; 68 : 8008-16.
60. Delmas B, Gelfi J, Kut E, Sjöström H, Norén O, Laude H. Determinants essential for the transmissible gastroenteritis virus-receptor interaction reside within a domain of aminopeptidase-N that is distinct from the enzymatic site. *J Virol* 1994 ; 68 : 5216-24.
61. Kolb AF, Maile J, Heister A, Siddell SG. Characterization of functional domains in the human coronavirus HCV 229E receptor. *J Gen Virol* 1996 ; 77 : 2515-21.
62. Delmas B, Gelfi J, Sjöström H, Noren O, Laude H. Further characterization of amino-peptidase N as a receptor for coronaviruses. In : Laude H and Vautherot JF, eds. *Coronaviruses : molecular biology and virus-host interactions*. New York : Plenum Press, 1992 : 293-8.
63. Laude H, Gelfi J, Aynaud JM. *In vitro* properties of low- and high-passaged strains of transmissible gastroenteritis coronavirus of swine. *Am J Vet Res* 1981 ; 42 : 447-9.
64. Hansen GH, Delmas B, Besnardeau L, et al. The coronavirus transmissible gastroenteritis virus causes infection after receptor-mediated endocytosis and acid-dependent fusion with an intracellular compartment. *J Virol* 1998 ; 72 : 527-34.
65. Schultze B, Kreml C, Ballesteros ML, et al. Transmissible gastroenteritis coronavirus, but not the related porcine respiratory coronavirus, has a sialic acid (N-glycolylneuraminic acid) binding activity. *J Virol* 1996 ; 70 : 5634-37.
66. Kreml C, Schultze B, Laude H, Herler G. Point mutations in the S proteins connect the sialic acid binding activity with the enteropathogenicity of transmissible gastroenteritis coronavirus. *J Virol* 1997 ; 71 : 3285-7.
67. Van Nieuwstadt AP, Zetstra T, Boonstra J. Infection with porcine respiratory coronavirus does not fully protect pigs against intestinal transmissible gastroenteritis virus. *Vet Rec* 1989 ; 125 : 58-60.
68. De Diego M, Laviada MD, Enjuanes L, Escribano JM. Epitope specificity of protective lactogenic immunity against swine transmissible gastroenteritis virus. *J Virol* 1992 ; 66 : 6502-8.
69. Cox E, Pensaert MB, Callebaut P. Intestinal protection against challenge with transmissible gastroenteritis virus of pigs immune after infection with the porcine respiratory coronavirus. *Vaccine* 1993 ; 11 : 267-72.
70. Paton DJ, Brown IH. Sows infected in pregnancy with porcine respiratory coronavirus show no evidence of protecting their suckling piglets against transmissible gastroenteritis. *Vet Res Comm*. 1990 ; 14 : 329-37.
71. Bernard S, Botreau E, Aynaud JM, Have P, Szymansky L. Natural infection with the porcine respiratory coronavirus induces protective lactogenic immunity against transmissible gastroenteritis. *Vet Microbiol* 1989 ; 21 : 1-8.
72. Vaucher YE, Ray CG, Minnich LL, Payne CM, Beck D, Lowe P. Pleomorphic, enveloped, virus-like particles associated with gastrointestinal illness in neonates. *J Infect Dis* 1982 ; 145 : 27-30.
73. Chany E, Moscovici O, Lebon P, Rousset S. Association of coronavirus infection with neonatal necrotizing enterocolitis. *Pediatrics* 1982 ; 209-14.
74. Resta S, Luby JP, Rosenfeld CR, Siegel JD. Isolation and propagation of a human enteric coronavirus. *Science* 1985 ; 229 : 978-81.