

CARACTÉRISATION ANTIGÉNIQUE DU CORONAVIRUS RESPIRATOIRE PORCIN A L'AIDE D'ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGÉS CONTRE LE VIRUS DE LA GASTRO-ENTÉRITE TRANSMISSIBLE

H. LAUDE, Jacqueline GELFI, D. RASSCHAERT, B. DELMAS

Institut National de la Recherche Agronomique, Station de Recherches de Virologie et d'Immunologie, route de Thiverval, 78850 THIVERVAL-GRIGNON

1. INTRODUCTION

L'apparition récente d'un coronavirus respiratoire induisant une réponse sérologique positive vis-à-vis du virus de la Gastro-entérite Transmissible (TGEV) a tant soit peu bouleversé les données épidémiologiques qui jusqu'ici caractérisaient cette virose. En l'espace de 3-4 ans, cet agent a largement diffusé au sein du cheptel européen, ce en l'absence de symptômes entéritiques classiquement associés à la GET.

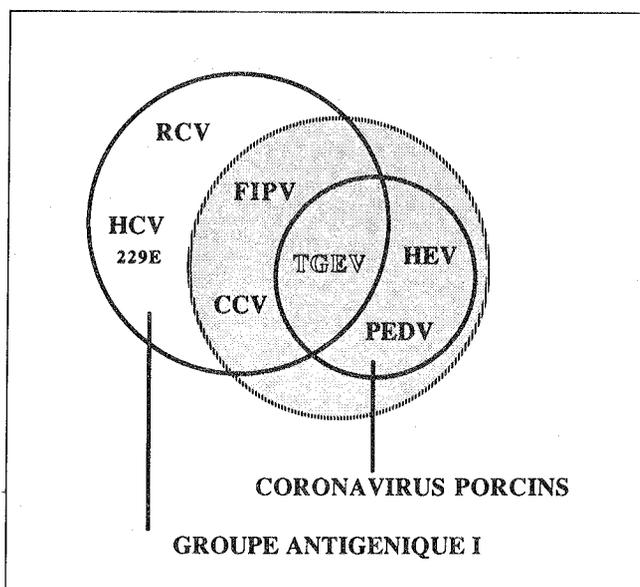
Les premières études ont débuté en 1984, en Belgique, et ont conduit à l'isolement d'un virus cytopathogène, qui présente une parenté antigénique étroite avec le TGEV (PENSAERT *et al.*, 1986). Chez l'animal, le virus manifeste un tropisme marqué pour le tractus respiratoire, ce qui explique vraisemblablement l'extension rapide de l'infection. Ces données ont été pleinement confirmées par des recherches menées simultanément dans plusieurs pays, dont le Danemark, l'Angleterre (deux pays jusqu'alors indemnes, ou largement, de GET) et la France (ESKILDSEN M. & HAVE P., 1986, résultats non publiés ; BROWN & CARTWRIGHT, 1986 ; JESTIN *et al.*, 1987a ; pour une revue, voir JESTIN *et al.*, 1987b).

L'impact économique de cette infection, qui évolue généralement dans les élevages selon un mode subclinique (PENSAERT *et al.*, 1986), est sans doute limité mais reste à préciser. En tout état de cause, c'est une prévalence inaccoutumée de séroconversions anti-TGEV, et non l'occurrence de désordres respiratoires en quête d'étiologie, qui a attiré l'attention des virologistes sur cet agent. Ce dernier engendrerait cependant un syndrome grippal modéré dont l'expression pourrait dépendre de la classe d'âge ou du statut sanitaire de l'élevage (DURET *et al.*, 1987, JESTIN *et al.*, 1987a).

Quant à la nature exacte de ce coronavirus, elle reste purement conjecturale. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées. Il peut s'agir d'une souche de TGEV modifiée ayant perdu son pouvoir entéropathogène, ou même d'un autre coronavirus du groupe antigénique I (Figure 1) ayant franchi la barrière interspécifique. Cet agent pourrait également être issu d'une recombinaison génétique naturelle entre le TGEV et un autre coronavirus porcin, ou apte à se multiplier chez cette espèce (Figure 1). De fait, des travaux récents ont montré qu'une recombinaison de l'ARN génomique pouvait

survenir à une fréquence élevée chez les coronavirus murins, selon un mécanisme d'ailleurs encore non élucidé (MAKINO *et al.*, 1987). Dans l'expectative, nous retiendrons pour désigner cet agent le sigle "CVRP" (Coronavirus Respiratoire Porcin), de préférence aux appellations "TGEV-like" ou "TGEV-R"

FIGURE 1
RELATIONS ENTRE TGEV ET D'AUTRES CORONAVIRUS



Le TGEV, le HEV (virus hémagglutinant responsable du syndrome Vomissement-Dépérissement) et le PEDV (virus de la Diarrhée Epidémique) sont 3 coronavirus spécifiques du porc, dépourvus de parenté antigénique. Le groupe antigénique I comprend, outre le TGEV, le FIPV (virus de la Péritonite Infectieuse Féline), le CCV (coronavirus entéritique canin), le HCV souche 229E (coronavirus respiratoire humain) et le RCV (coronavirus responsable de la Cardiomyopathie du lapin). Le cercle ombré regroupe les différents coronavirus aptes à se multiplier chez le porc (cf. WOODS *et al.*, 1981). Les abréviations utilisées sont celles du Comité International de Taxonomie (cf. SIDDELL *et al.*, 1983).

Une analyse détaillée des caractéristiques antigéniques du CVRP, précisant notamment son degré de parenté avec le TGEV, était susceptible, sinon d'élucider son origine, du moins de restreindre le champ des hypothèses. Nous présentons ici les premiers résultats d'une étude en cours sur la réactivité comparée de 3 isolats de CVRP, de différentes souches de TGEV et d'une souche de FIPV (virus de la Péritonite Infectieuse Féline), vis-à-vis d'une collection d'anticorps monoclonaux (Ac.Mo.) dirigés contre les protéines structurales du TGEV.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. VIRUS ET CELLULES.

L'origine des 3 isolats de CVRP figure dans le tableau 1. L'isolat belge correspond à la souche désignée TLM83 dans le laboratoire d'origine. Ces virus ont été isolés sur des cellules primaires de rein ou de thyroïde de porc, puis propagés sur la lignée ST (épithélium testiculaire de porc) soit avant

soit après leur arrivée dans notre laboratoire. Le milieu de maintien est du MEM de Eagle additionné de 10 p. cent de sérum de veau nouveau-né. Des suspensions récoltées dans les heures suivant l'apparition de l'effet cytopathogène, puis clarifiées, constituent la source de virus dans ces expériences. Les titres infectieux étaient compris entre 1×10^6 et 5×10^6 UFP/ml. Le virus FIPV (souche 79.1146) et la lignée de cellules FCWF (felix catus whole fetus) sur laquelle il a été propagé, proviennent du laboratoire de Marian HORZINEK, (Université d'Utrecht). L'origine et le mode de propagation des souches de TGEV ont été décrits par ailleurs (LAUDE *et al.*, 1981).

2.2. ANTICORPS MONOCLONAUX

Les hybridomes murins anti-TGEV ont été établis au laboratoire en collaboration avec le groupe de Jeanne GROS-CLAUDE, et les caractéristiques des Ac.Mo. produits ont été publiées (LAUDE *et al.*, 1986). Des liquides obtenus par croissances ascitique en souris ont été utilisés comme source d'immunoglobulines.

TABLEAU 1
ISOLATS ACTUELS DE CVRP

PAYS	(ANNÉE)	LABORATOIRE	RÉFÉRENCE
*Belgique	(83)	Vet. Faculty, Ghent	M.Pensaert, P. Callebaut, J. Vergotte, 1986
*Danemark	(86)	State Vet. Inst. Virus Res. Lindholm.	P. Have, P. Eskildsen (1986, résultats non publiés)
*France	(86)	RM-IFFA, Lyon	C. Duret, A. Brun, H. Guillmote, M. Dauvergne, 1987
Angleterre	(86)	Central Vet. Lab., Weybridge	I. Brown, S. Cartwright, 1986

*Isolats analysés dans cette étude.

2.3. TEST D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

Des tapis de cellules ST âgées de 24 h établis en microplaque (Falcon Microtest II), infectés à raison de 10^3 UFP/cupule, ont été utilisés comme source d'antigène ; après 20 h (TGEV) ou 26 h (CVRP) d'incubation à 38°C, les cultures sont rincées, puis fixées avec un mélange acétone/éthanol froid (1:3). Dans le cas du FIPV, des tapis de cellules FCWP de 3 j ont été infectés à raison de 10^3 UFP, puis fixées 16 h post-infection avec un mélange acétone/éthanol (3:1). Lors de la coloration, les plaques sont incubées 60 min en présence de liquides d'ascites à 4 dilutions (1:20, 1:100, 1:500, 1:2500). Après rinçage en PBS + 0.05 p.cent de Tween 20, un conjugué anti-IgG de souris marqué à la fluorescéine (Pasteur Production) est ajouté dilué au 1:100. Deux séries d'expériences au moins, incluant les contrôles, ont été effectuées pour chaque Ac.Mo.

3. RESULTATS

3.1. DETERMINANTS DU TGEV RECONNUS PAR LES AC.MO UTILISES

Les 25 Ac.Mo. retenus pour ces expériences sont dirigés contre l'une des 3 protéines structurales du TGEV, selon la répartition suivante : 17 Ac.Mo. anti-gpE2, la glycoprotéine de surface de 220 kd qui forme les spicules des virions ; 4 Ac.Mo. anti-gpE1, la glycoprotéine transmembranaire de 29 kd ; 4 Ac.Mo. anti-N, la nucléoprotéine de 47 kd (liste donnée dans le tableau 2). Tous ces Ac.Mo. proviennent d'une collection

d'hybridomes établie au laboratoire vis-à-vis de la souche Purdue-115, à l'exception de l'Ac.Mo. 25H2, qui est dirigé contre la souche Miller et provient du laboratoire de Linda SAIF (Ohio Agricultural Research and Development Center, Wooster).

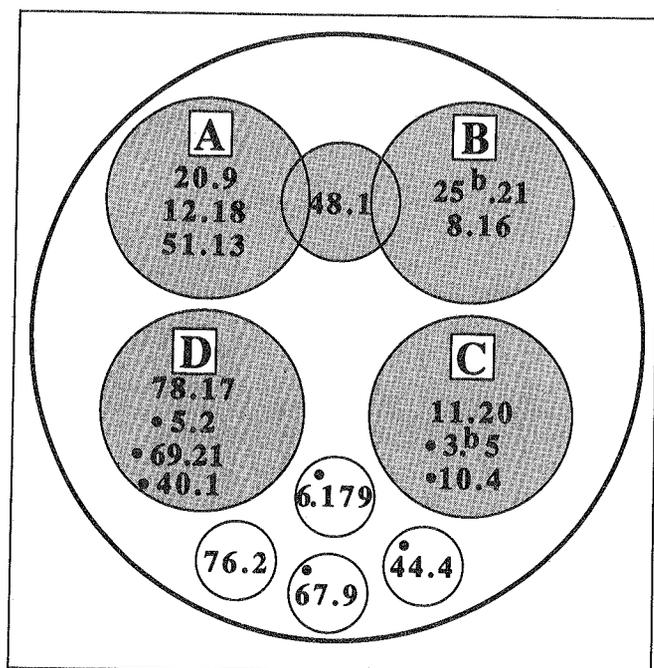
Rappelons que seule la protéine gpE2 est capable d'induire chez l'animal la synthèse d'anticorps capables de neutraliser le pouvoir infectieux du virus. Une carte antigénique détaillée de cette protéine a été établie à l'aide de tests topologiques ou fonctionnels (Figure 2). La plupart des épitopes se regroupent en 4 sites antigéniques majeurs. Le domaine A-B, qui inclut 2 sites reliés par un épitope commun, rassemble des déterminants qui jouent un rôle primordial dans la neutralisation et qui sont immunodominants chez le porc. Les sites A, B et D ont été trouvés strictement conservés sur des souches de TGEV de provenances géographiques très diverses. En revanche une variation naturelle, peu fréquente, peut s'observer, comme c'est le cas pour la souche anglaise FS 772/70, au sein du site C et sur certains épitopes indépendants (LAUDE *et al.*, 1986 ; DELMAS *et al.*, 1986). Le gène codant pour gpE2 (1431 amino acides) a d'autre part été séquencé en totalité (RASSCHAERT et LAUDE, 1987), et des travaux en cours montrent que l'ensemble des sites antigéniques majeurs se localisent vers l'extrémité N-terminale.

La protéine gpE1, de nature hydrophobe, est presque totalement enfouie ou étroitement associée avec la face interne de l'enveloppe lipidique virale. Trois des Ac.Mo. sont dirigés contre le segment N-terminal hydrophile de 30 résidus, supposé faire saillie à l'extérieur de la membrane ("site Ext."). Un Ac.Mo. reconnaît un épitope interne de gpE1, vraisemblablement situé en région C-terminale ("site Int.") (LAUDE

TABLEAU 2
 RÉACTIVITÉ COMPARÉE EN IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE SUR CELLULES INFECTÉES D'UNE COLLECTION D'AC.MO. ANTI-TGEV (SOUCHE PURDUE 115), VIS-A-VIS DE 3 ISOLATS DE CVRP, D'UNE SOUCHE DE TGEV VARIANTE (SOUCHE ANGLAISE 772/70), ET D'UNE SOUCHE DE FIPV.

SPÉCIFICITÉ		AC.MO.	CVRP			TGEV	FIPV
PROTÉINE	SITE		Fran.	Belg.	Dan.	Angl.	79.1146
gpE2 (Spicule)	A	20.9	+	+	+	+	+
		12.18	+	+	+	+	+
		51.13	+	+	+	+	+
		48.1	+	+	+	+	+
		8.8	+	+	+	+	+
	C	3b.5	-	-	-	-	-
		10.4	-	-	-	-	-
		11.20	+	+	+	+	+
	D	40.1	-	-	-	+	-
		5.2	-	-	-	+	-
		69.21	-	-	-	+	-
		78.17	+	+	+	+	-
	Ind.	76.2	+	+	+	+	-
		6.179	-	-	-	+	+
		44.4	-	-	-	+	-
67.9		-	-	-	-	-	
gpE1 (Membr.)	Ext.	49.22	-	-	-	-	-
		25.22	-	-	-	-	-
		9.34	-	-	-	-	-
	Int.	3.60	+	+	+	+	-
NP (Nucléopr.)	5.1	+	+	+	+	-
		22.6	+	+	+	+	-
		19.1	+	+	+	+	-
		25H7°	+	+	+	+	+

FIGURE 2
 CARTE ÉPITOPIQUE DE LA GLYCOPROTÉINE gpE2 DU TGEV



Les cercles rassemblent des anticorps monoclonaux (chacun désigné par un numéro, ex : 20.9) qui reconnaissent des épitopes topologiquement proches. Les Ac.Mo. dépourvus de réactivité vis-à-vis du CVRP sont indiqués par un point noir.

et al., 1987). A l'exception d'une souche (FS 772/70), ces deux types de déterminants sont hautement conservés. L'épitope "Int." est présent sur l'ensemble des souches de TGEV testées (résultats non publiés). La carte épitopique de la protéine N n'a pas été effectuée.

3.2 RÉACTIVITÉ DU CVRP VIS-A-VIS DES AC.MO. ANTI-TGEV

Les données résultant d'un test d'immunofluorescence indirecte (IIF), effectué en parallèle sur 3 isolats de CVRP, une souche variante de TGEV (cf. supra) et la souche 79.1146 de FIPV sont résumées dans le tableau 2. Les conclusions suivantes en découlent :

– La réactivité identique des 3 isolats de CVRP indique que c'est bien la même entité virale qui a été isolée en Belgique, au Danemark et en France.

– La parenté antigénique marquée observée entre les virus CVRP et TGEV est bien confirmée par l'emploi de réactifs monoclonaux.

– Aucun des 4 Ac.Mo. anti-N ne permet de différencier le CVRP du TGEV, tandis que 3 d'entre eux ne reconnaissent pas la nucléoprotéine du FIPV.

– Les Ac.Mo. dirigés contre des épitopes externes de la protéine gpE1 permettent de différencier le CVRP des souches de TGEV, sauf la souche anglaise qui présente une variation

analogue. Cependant, l'épitope interne de gpE1 est conservé sur le CVRP comme sur l'ensemble des souches de VGET, ce qui distingue ces 2 virus du FIPV.

— Sur la glycoprotéine spiculaire gpE2, le domaine de neutralisation majeur, constitué par les 2 sites A et B, est conservé non seulement sur les virus CVRP et TGEV, mais également sur le FIPV. Ceci explique les forts taux de séroneutralisation croisée constatés entre virus TGEV et CVRP d'une part, TGEV et FIPV d'autre part. Le site antigénique C ainsi que plusieurs épitopes non reliés sont altérés sur le CVRP. Toutefois, certains de ces épitopes sont également sujets à variation sur le TGEV (souche anglaise). L'altération du site D apparaît en revanche être une caractéristique propre au CVRP. Il est à noter aussi qu'aucun des Ac.Mo. définissant le site D ne reconnaît le FIPV. Les variations recensées sur la protéine E2 du CVRP sont indiquées par des points sur la carte antigénique présentée à la figure 2.

4. DISCUSSION

Plusieurs informations importantes se dégagent de ces résultats. Tout d'abord les isolats de CVRP font montre d'une complète homogénéité antigénique vis-à-vis de la gamme d'Ac.Mo. utilisée. Ce point renforce donc les données épidémiologiques selon lesquelles un même agent aurait diffusé de façon explosive au sein du territoire européen. En second lieu, il apparaît qu'en dépit d'une indéniable parenté, le spectre antigénique du CVRP se distingue assez nettement de celui des souches de TGEV dans leur ensemble. Le nombre des épitopes communs aux souches de TGEV et de CVRP s'élève à 14 sur les 25 Ac.Mo. pris en compte. Les différences recensées siègent sur les 2 glycoprotéines d'enveloppe gpE1 et gpE2. Il faut cependant souligner que certains des sites distincts - à savoir le site C et certains épitopes indépendants sur gpE2, ainsi que le site externe sur gpE1 - peuvent aussi varier au sein même des souches de TGEV : c'est au moins le cas pour la souche anglaise 772/70. De ce fait l'altération du site D apparaît comme l'élément majeur de discrimination entre CVRP et TGEV. Toutefois le CVRP se singularise aussi par l'absence de 2 épitopes indépendants (44.4 et 6.179) qui s'avèrent conservés sur l'ensemble des souches de TGEV étudiées.

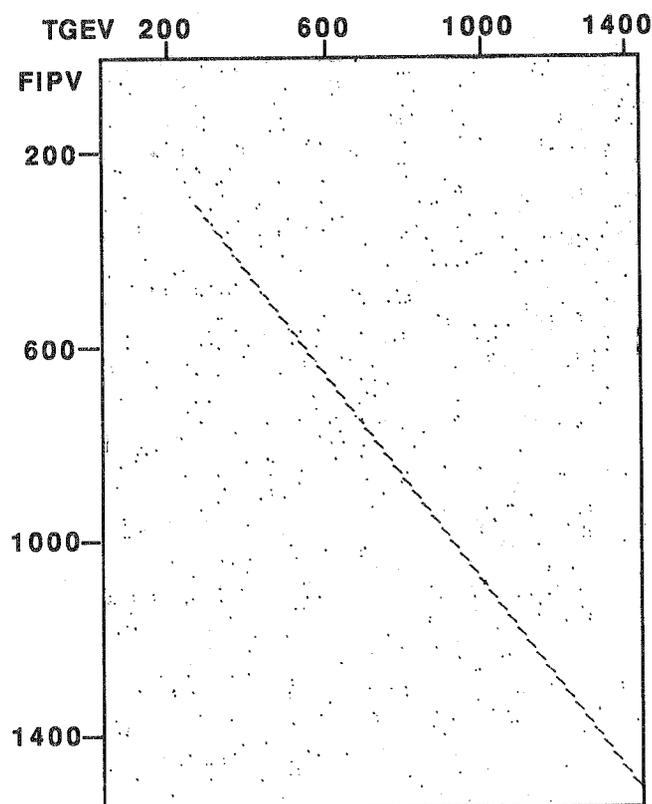
Seule une approche élargie, incluant l'emploi d'Ac.Mo. dirigés contre le CVRP lui-même voire contre d'autres virus du groupe I, ou fondée sur une comparaison partielle des séquences nucléotidiques du génome des divers agents concernés, permettrait de privilégier l'une des hypothèses émises plus haut quant à la nature précise du CVRP. Celui-ci pourrait dériver d'une souche de TGEV cumulant une mutation sur gpE2 et une mutation sur gpE1, ce qui est possible si l'on admet que plusieurs épitopes d'une protéine, même topologiquement distincts, peuvent être affectés par une mutation unique dans le gène codant. On peut d'autre part remarquer qu'un virus issu d'une recombinaison entre une souche de TGEV ayant des caractéristiques proches de celles de la souche anglaise, et une souche de FIPV par exemple, celle-ci apportant tout ou partie du gène E2, posséderait un spectre antigénique quasi identique à celui que présente le CVRP vis-à-vis des réactifs utilisés dans cette étude. Seule l'hypothèse d'une adaptation du coronavirus félin FIPV à l'espèce porcine paraît à présent moins plausible, dans la mesure où certains déterminants présents sur les protéines E1 et N du CVRP semblent plus proches du TGEV que du FIPV. Au demeurant, il peut fort bien s'agir d'un coronavirus du groupe I autre que ceux actuellement répertoriés, hébergé par une espèce sauvage par exemple.

A défaut de fournir des indications plus précises sur l'origine du CVRP, les données que nous présentons sont susceptibles d'une part d'orienter avantageusement les travaux futurs, d'autre part de proposer des outils facilitant un diagnostic différentiel, deux aspects que nous examinerons successivement en guise de conclusion.

L'absence sur la protéine gpE2 du CVRP de plusieurs épitopes appartenant au site D revêt un intérêt particulier. Les déterminants portés par les spicules jouent fréquemment un rôle essentiel dans l'expression du tropisme d'un virus. Il serait donc important de vérifier s'il existe ou non une relation causale entre altération du site D et perte du pouvoir entéropathogène. A cet égard, des travaux en cours au laboratoire ont permis de localiser le site D dans les 200 derniers résidus N-terminaux de gpE2, les autres sites impliquant des résidus situés plus en aval sur la structure primaire. Or la comparaison des protéines gpE2 des 2 virus TGEV et FIPV montre que c'est précisément la région dans laquelle les 2 séquences, par ailleurs fortement homologues, cessent d'être colinéaires (Figure 3). L'avenir dira si les séquences de l'extrémité N-terminale codent pour des déterminants biologiques essentiels impliqués dans la reconnaissance des cellules cibles ou s'il s'agit à l'inverse d'une région sans rôle fonctionnel défini, qui peut dès lors évoluer hors de toute contrainte sélective. Quoi qu'il en soit, il est clair que l'extrémité 5' du gène E2 sera l'une des régions à séquencer en priorité sur le CVRP pour tenter d'élucider son origine.

Ces premières observations ouvrent par ailleurs des perspectives s'agissant du diagnostic différentiel des 2 types

FIGURE 3
HOMOLOGIES EXISTANT DANS LA SÉQUENCE
POLYPEPTIDIQUE DE LA PROTÉINE gpE2, DES CORONAVIRUS
TGEV (RASSCHAERT & LAUDE, 1987) et FIPV
(DE GROOT ET AL., 1987)



Analyse matricielle sur une fenêtre de 4 résidus, avec un taux d'homologie de 75 %.

d'infection. On conçoit en effet que cet avatar épidémiologique ne facilite guère la surveillance et le contrôle de la GET dans les élevages. Il est dorénavant possible, à l'aide de quelques Ac.Mo. appropriés, de distinguer un isolat de CVRP d'un isolat de TGEV par un simple test d'IF indirecte. De surcroît, la mise au point d'un test sérologique - par exemple un test ELISA de compétition mené en parallèle vis-à-vis d'un Ac.Mo. discriminant (40.1, 5.2, 69.21, 6.179 ou 44.4) et d'un Ac.Mo. non discriminant (site A ou B) - ne devrait pas soulever de difficultés majeures.

REMERCIEMENTS

Ils s'adressent tout particulièrement aux Docteurs André BRUN, Per HAVE et Maurice PENSAERT qui ont chacun accepté de nous transmettre la souche de CVRP isolée dans leur laboratoire.

BIBLIOGRAPHIE

- BROWN I., and CARTWRIGHT S., 1986. The Veterinary Record. **119**, 282-283.
- DE GROOT R.J., MADURO J., LENSTRA J.A., HORZINEK M.C., VAN DER ZEIJST B.A.M., SPAAN W.J.M., 1987. J. Gen. Virol. **68**, 2639-2646.
- DELMAS B., GELFI J., LAUDE H., 1986. J. Gen. Virol. **67**, 1405-1418.
- DURET C., BRUN A., GUILLMOTO H., DAUVERGNE M., 1987. Isolement, identification et pouvoir pathogène chez le porc d'un coronavirus apparenté au virus de la gastro-entérite transmissible. Rec. Med. Vet. (sous presse).
- JESTIN A., LEFORBAN Y., VANNIER P., 1987. Journées Rech. Porcine en France, **19**, 167-172.
- JESTIN A., LEFORBAN Y., VANNIER P., 1987. Apparition d'un nouveau coronavirus porcin. II - Origine, propriétés et conséquences. Rec. Med. Vet. (sous presse).
- LAUDE H., GELFI J., AYNAUD J.M., 1981. Am. J. Vet. Res., **42**, 447-449.
- LAUDE H., CHAPSAL J.M., GELFI J., LABIAU S., GROSCLAUDE J., 1986. J. Gen. Virol., **67**, 119-130.
- MAKINO S., KECK J.G., STOHLMAN S.A., LAI M.M.C., 1986. J. Virol., **57**, 729-737.
- PENSAERT M., CALLEBAUT P., VERGOTE J., 1986. The Veterinary Quarterly, **8** (3), 257-261.
- RASSCHAERT D., LAUDE H., 1987. J. Gen. Virol. **68**, 1883-1890.
- SIDDELL S., ANDERSON R., CAVANAGH D., FUJIWARA K., KLENK H.D., MACNAUGHTON M.R., PENSAERT M., STOHLMAN S.A., STURMAN L., VAN DER ZEIJST B.A.M., 1983. Coronaviridae. Intervirology, **20**, 181-189.
- WOODS R.D., CHEVILLE N.F., GALLACHER J.F., 1981. Am. J. Vet. Res., **42**, 1163-1169.