

MATHILDE YU

PARAMÈTRES GÉNÉTIQUES, MOLÉCULAIRES ET CELLULAIRES  
IMPLIQUÉS DANS LA VACCINATION CONTRE L'INFECTION PAR LE  
CORONAVIRUS MURIN NEUROTROPE.

Thèse  
présentée pour l'obtention du grade de  
*philosophiae doctor* (Ph.D.) en virologie et immunologie

Mars 1999  
INSTITUT ARMAND-FRAPPIER  
Université du Québec

*Il n'est pas besoin d'espérer  
pour entreprendre, ni de réussir  
pour persévérer.*

Guillaume d'Orange  
(1533-1584)

**TABLE DES MATIERES**

ÉPIGRAPHE.....	ii
TABLE DES MATIERES.....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	vi
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES ABREVIATIONS .....	ix
SOMMAIRE.....	xi
INTRODUCTION .....	1
CHAPITRE 1: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE .....	4
1- LES CORONAVIRUS.....	5
1.1- Généralités.....	5
1.2- Protéines structurales .....	5
1.3- Pathogénicité du virus de l'hépatite murine .....	7
1.4- Réponse immunitaire induite par le virus de l'hépatite murine.....	8
2- LES ANTICORPS ANTI-IDIOTYPIQUES .....	9
2.1- Structure et antigénicité des anticorps .....	9
2.2- Réseau idiotypique.....	9
2.3- Mimétisme et cascade idiotypique .....	12
2.4- Identification des épitopes .....	13
2.5- Maladies autoimmunitaires.....	14
2.6- Cancers .....	15
2.7- Vaccination .....	15
2.8- Complexité du réseau idiotypique.....	18

3-	LES BANQUES PHAGIQUES EXPRIMANT DES PEPTIDES A LEUR SURFACE .....	19
3.1-	Généralités.....	19
3.2-	Système.....	20
3.3-	Identification des épitopes .....	20
3.4-	Immunogénicité.....	22
CHAPITRE 2: ETUDE DES MECANISMES DE PROTECTION CONTRE L'INFECTION CORONAVIRALE A L'AIDE D'UN ANTICORPS ANTI-IDIOTYPIQUE NON-IMAGE INTERNE.....		24
Article I: Genetic control of anti-idiotypic vaccination against coronavirus infection.....		26
Article II: Characterization of protection against coronavirus infection by polyclonal non-internal image.....		44
CHAPITRE 3: PRODUCTION ET CARACTERISATION D'ANTICORPS ANTI-IDIOTYPIQUES CONTRE L'INFECTION CORONAVIRALE .....		67
Article III: Production and characterization of monoclonal anti-idiotypic antibodies against a neutralizing and protective monoclonal antibody specific to a neurotropic coronavirus .....		69
Article IV: Induction of a protective immune response to murine coronavirus with non-internal image anti-idiotypic antibodies. ....		90
CHAPITRE 4: ETUDE DE L'INDUCTION D'UNE REPOSE IMMUNITAIRE PROTECTRICE CONTRE LE CORONAVIRUS NEUROTROPE PAR DES PHAGES SELECTIONNES DE BANQUES PEPTIDIQUES.....		114
Article V: Protective vaccination against coronavirus using phage-displayed peptides selected by neutralizing antibodies.....		116
DISCUSSION GENERALE.....		162
1-	MÉCANISMES DE PROTECTION CONTRE L'INFECTION CORONAVIRALE À L'AIDE D'UN ANTICORPS NON-IMAGE INTERNE.....	163
1.1-	Étude des mécanismes de protection contre l'infection coronavirale au niveau génétique.....	163
1.2-	Étude des mécanismes de protection contre l'infection coronavirale au niveau humoral et cellulaire.....	165

2-	PRODUCTION ET CARACTERISATION D'ANTICORPS ANTI-IDIOTYPIQUES.....	167
2.1-	Production et caractérisation d'AcMo anti-7-10A .....	168
2.2-	Induction d'une réponse immunitaire protectrice contre l'infection coronavirale à l'aide d'un Ac2 $\alpha$ .....	169
3-	REPONSE IMMUNITAIRE PROTECTRICE CONTRE L'INFECTION CORONAVIRALE PAR DES PHAGES SELECTIONNES PAR DES ANTICORPS NEUTRALISANTS A PARTIR DE BANQUES PEPTIDIQUES.....	170
	CONCLUSION .....	175
	REMERCIEMENTS.....	178
	REFERENCES .....	180
	ANNEXE I: LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS.....	194
	ANNEXE II: COPIE DES ARTICLES PUBLIES.....	197

## LISTE DES TABLEAUX

**Article I:**

Tableau 1: Induction of specific and neutralizing anti-MHV-A59 Ab3 in protected Ab2-immunized mice.....	38
--	----

**Article III:**

Tableau 1: Inhibition of mAb1 virus neutralization with mAb2.....	83
Tableau 2: MAb2 characteristics. ....	84

**Article IV:**

Tableau 1: Ab2 anti-4-11G.6.....	105
----------------------------------	-----

**Article V:**

Tableau 1: Yields for each round of panning for all peptide libraries. ....	148
Tableau 2: Amino acid sequences of phage-displayed peptides selected with three mAbs.....	149
Tableau 3: Amino acid sequences of the H1 and H2 CDRs of mAbs 5B19 and 5B170.....	150
Tableau 4: Induction of specific antiviral antibodies in mice immunized with phage-displayed peptides. ....	151

## LISTE DES FIGURES

### Revue bibliographique:

- Figure 1: Schémas du réseau idiotypique et de la classification des anticorps anti-idiotypiques.....11

### Article I:

- Figure 1: Effect of vaccination with Ab2 on survival of mice of different inbred strains to infection with MHV-A59.....40
- Figure 2: Influence of H-2 or H-2-linked genes on survival of MHV-A59 infected Ab2-immunized mice.....42

### Article II

- Figure 1: Protection assay illustrating the involvement of plasma components in Ab2 $\gamma$ -mediated vaccination of mice. ....64
- Figure 2: Proliferation of lymph nodes cells from mice immunized with polyclonal Ab2 $\gamma$  or MHV-A59. ....66

### Article III:

- Figure 1: ELISA for determining mAb2 specificity.....86
- Figure 2: Inhibition of binding of mAb1 to the virus by mAb2.....88

**Article IV:**

Figure 1:	Inhibition of attachment assay for discrimination of $\alpha$ -type from $\beta$ and $\gamma$ -type anti-Id.....	107
Figure 2:	Survival curves of mice immunized with polyclonal Ab2 anti-5B170.11.....	109
Figure 3:	Brain viral titers observed after anti-Id and NRlg treatments.....	111
Figure 4:	Detection of idiotype by Ab2. ....	113

**Article V:**

Figure 1:	ELISA for determining cross-reactive phage recognition by mAbs 5B19 and 5B170. ....	153
Figure 2:	Alignment of viral protein sequences and peptides selected with mAbs 7-10A, 5B170 and 5B19. ....	155
Figure 3:	ELISA of mAb binding to immobilized phage and to immobilized MHV-A59 in reducing and non-reducing conditions. ....	157
Figure 4:	Survival of BALB/c and C57BL/6 mice immunized with phage-displayed mAb-selected peptides.....	159
Figure 5:	Western blot analysis of virus-specific antibody in the plasma of mice immunized with selected phage-displayed peptides.....	161



**LISTE DES ABREVIATIONS**

<b>Ab1 ou Ac1:</b>	anticorps idiotypique
<b>Ab2 ou Ac2:</b>	anticorps anti-idiotypique ou anti-Id
<b>Ab3 ou Ac3:</b>	anticorps anti-anti-idiotypique
<b>Ac:</b>	anticorps
<b>AcMo ou mAb:</b>	anticorps monoclonal
<b>ADCC:</b>	lyse cellulaire dépendante des anticorps ("Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity")
<b>ADCMC:</b>	lyse cellulaire dépendante des anticorps et médiée par le complément ("Antibody-Dependent Complement-Mediated Cytotoxicity")
<b>Ag:</b>	antigène
<b>ARN:</b>	acide ribonucléique
<b>CFA:</b>	adjuvant complet de Freund ("Complete Freund's adjuvant")
<b>E:</b>	petite protéine de la membrane
<b>ELISA:</b>	test immuno-enzymatique ("Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay")
<b>h:</b>	heure(s)
<b>HE:</b>	hémagglutinine estérase
<b>i.c.:</b>	intracérébrale (injection)
<b>IFA:</b>	adjuvant incomplet de Freund ("Incomplete Freund's adjuvant")
<b>i.p.:</b>	intrapéritonéale (injection)
<b>kDa:</b>	kilodalton
<b>KLH:</b>	hémocyanine de patelle ("Keyhole Limpet Hemocyanin")
<b>LD<sub>50</sub> ou DL<sub>50</sub>:</b>	dose létale 50%
<b>M:</b>	protéine de la membrane

<b>MHV:</b>	virus de l'hépatite murine
<b>min:</b>	minute(s)
<b>N:</b>	nucléoprotéine
<b>NK:</b>	"natural killer"
<b>NRlg:</b>	immunoglobulines normales de lapin
<b>S:</b>	protéine de surface
<b>SNC:</b>	système nerveux central
<b>scFv:</b>	anticorps à chaîne unique
<b>TGEV:</b>	virus de la gastro-entérite transmissible du porc
<b>VIH:</b>	virus de l'immunodéficience humaine

## SOMMAIRE

Dans le but de caractériser les mécanismes impliqués dans les réponses immunitaires protectrices induites par des anticorps anti-idiotypiques non-image interne, nous avons analysé au niveau humoral, cellulaire et moléculaire, la réponse immunitaire induite par un Ac2 $\gamma$  polyclonal. Connaissant sa capacité de générer une protection contre l'infection aiguë chez des souris BALB/c, nous avons déterminé l'influence du complexe majeur d'histocompatibilité dans le contrôle de la réponse des souris consanguines et congéniques d'haplotypes H-2 différents immunisées avec cet anticorps. Parmi les huit lignées de souris d'haplotypes H-2<sup>d</sup>, H-2<sup>q</sup>, H-2<sup>k</sup> et H-2<sup>b</sup> testées, seulement celles de trois souches consanguines d'haplotypes H-2<sup>d</sup> et H-2<sup>q</sup> ont été protégées contre l'infection coronavirale en plus des souris BALB/c. La vérification du rôle du complexe H-2 dans la protection, effectuée à l'aide de souris congéniques, nous a révélé que le ou les gènes impliqués dans la protection contre l'infection létale semblent être localisés à l'extérieur du complexe majeur d'histocompatibilité, mais que les haplotypes d et q, lorsque présents dans un fond génétique de souris approprié, peuvent potentialiser l'induction de la réponse immunitaire protectrice.

Suite à la vaccination, les souris protégées ont développé des Ac3 neutralisant l'infectivité virale *in vitro*. Après le transfert passif du plasma de souris immunisées avec l'Ac2 $\gamma$  à des souris non sensibilisées, un retard dans la mortalité a été observé. La combinaison de ces deux résultats montre l'implication des anticorps neutralisants comme un des mécanismes participant à la protection contre l'infection aiguë. Les mécanismes tels que l'ADCC et l'ADCMC ne semblent pas être impliqués dans la protection contre le coronavirus, malgré le fait que leur importance dans d'autres infections virales ait été décrite. Aucune protection n'a été observée chez les souris qui ont reçu les splénocytes de souris préalablement immunisées avec l'Ac2 $\gamma$ . Ces splénocytes ne joueraient donc pas un rôle direct dans la protection. Cependant, la prolifération des lymphocytes T *in vitro* en présence du virus et de l'Ac2 $\gamma$ , permet de croire à une fonction auxiliaire dans l'induction de la réponse immunitaire protectrice.

Afin de mieux identifier les éléments responsables de la réponse immunitaire protectrice, nous avons aussi produit des AcMo anti-idiotypiques contre l'AcMo 7-10A qui a généré l'Ac2 $\gamma$  protecteur. Plusieurs AcMo2 $\gamma$  ont été obtenus. Malheureusement, aucun ne possédait la propriété biologique de protection équivalente à l'Ac2 $\gamma$ . En parallèle, d'autres anticorps anti-idiotypiques polyclonaux et monoclonaux ont été produits contre trois autres AcMo possédant des propriétés biologiques importantes telles que la neutralisation virale *in vitro* et la protection passive. Ainsi, un deuxième anticorps anti-idiotypique polyclonal non-image interne capable de protéger partiellement des souris BALB/c a été généré. Cependant, cet Ac2 de type  $\alpha$  a généré un niveau de protection plus faible que l'Ac2 $\gamma$  de sorte que son mécanisme d'action était plus difficile à analyser. Malgré cet inconvénient, la production d'un autre Ac2 non-image interne a permis de confirmer leur capacité à induire une réponse immunitaire protectrice.

Finalement, l'utilisation de banques de phages exprimant des peptides aléatoires à leur surface, a permis de localiser et de caractériser certains épitopes protecteurs reconnus par les AcMo ayant généré les anticorps anti-idiotypiques protégeant les souris contre l'infection coronavirale létale. Des séquences consensus ont été obtenues, autant avec les AcMo reconnaissant des épitopes continus que discontinus. Certaines séquences consensus identifiées correspondaient à des séquences protéiques de la glycoprotéine de surface S. Une séquence peptidique sélectionnée par un AcMo anti-coronavirus, suggère que cet AcMo reconnaît un épitope discontinu localisé dans la région N-terminale de la sous-unité S1. De plus, un peptide porté par un phage sélectionné par un AcMo reconnaissant un épitope linéaire a été capable d'induire une réponse protectrice contre l'infection coronavirale, en utilisant directement le phage comme molécule porteuse. La présence d'anticorps reconnaissant la même région antigénique que l'AcMo chez les souris vaccinées est en corrélation avec la protection observée. Des anticorps non-neutralisants semblent jouer un rôle prépondérant dans cette réponse protectrice.

## INTRODUCTION

Les coronavirus sont responsables de diverses maladies affectant surtout les systèmes respiratoire, gastro-intestinal et neurologique autant chez l'homme que chez les animaux. Le coronavirus humain est responsable d'environ le tiers des rhumes et a été associé à la sclérose en plaques, une maladie démyélinisante du système nerveux central. D'ailleurs, l'étiologie de la sclérose en plaques n'a pas encore été déterminée, mais l'implication des virus dans la maladie est suspectée et le coronavirus fait partie de la liste des candidats potentiels. Le virus de l'hépatite murine (MHV) est probablement le coronavirus le plus étudié. Il peut causer des maladies des systèmes entérique, hépatique et nerveux. Les souches neurotropes JHM et A59 induisent l'encéphalite, une maladie aiguë souvent fatale. Cependant, les souris qui survivent à la maladie aiguë développent par la suite une maladie chronique du système nerveux central ressemblant aux pathologies observées dans la sclérose en plaques. Pour ces raisons, l'infection de souris par les souches neurotropes JHM et A59 est donc souvent utilisée dans diverses études comme modèle animal de maladie démyélinisante du système nerveux central d'étiologie virale. La maladie aiguë permet également d'utiliser le MHV comme modèle animal simple pour étudier l'induction de réponses immunitaires protectrices.

Quelques données sont connues sur les mécanismes responsables de la protection contre l'infection coronavirale. Plusieurs études ont démontré le rôle important joué par les anticorps et les lymphocytes T antiviraux. Des anticorps anti-idiotypiques ont été utilisés comme outil pour induire une réponse immunitaire protectrice. La majorité des travaux rapporte l'induction d'une réponse immunitaire par l'intermédiaire des anticorps anti-idiotypiques possédant la propriété de mimétisme antigénique. Cependant, quelques rares cas de protection par des anticorps anti-idiotypiques sans mimétisme particulier ont aussi été décrits. Dans notre cas, une étude précédente effectuée dans le laboratoire a démontré la production d'un anticorps anti-idiotypique non-image interne capable de protéger des souris BALB/c contre l'infection coronavirale létale. Cependant, les mécanismes précis par lesquels ces anticorps anti-idiotypiques induisent la protection coronavirale restent encore mal définis. Les objectifs de la recherche présentée dans cette thèse sont donc d'étudier les mécanismes d'induction de la protection par des anticorps anti-idiotypiques non-image interne, d'identifier les épitopes qui ont généré la synthèse de ces

anticorps anti-idiotypiques à l'aide de différentes banques peptidiques et d'en évaluer le potentiel vaccinal.

Pour répondre à nos objectifs, la maladie aiguë provoquée par le coronavirus neurotrope, généralement létale chez la souris susceptible, a été exploitée afin d'évaluer directement le potentiel vaccinal des anticorps anti-idiotypiques et des phages exprimant à leur surface des peptides. Dans un premier temps, l'immunisation de souris consanguines et congéniques avec l'anticorps anti-idiotypique a permis de déterminer le rôle de la composante génétique impliquée dans la protection. Par la suite, l'identification des éléments de la réponse immunitaire protectrice a été effectuée par transfert passif du plasma et par transfert adoptif de splénocytes ainsi que par des tests de neutralisation virale et de prolifération lymphocytaire. Dans un deuxième temps, afin de pouvoir approfondir l'étude des mécanismes d'induction de la protection par des anticorps anti-idiotypiques non-image interne, des anticorps monoclonaux (AcMo) ont été générés, ainsi que d'autres anticorps anti-idiotypiques polyclonaux. Finalement, pour atteindre le dernier but fixé, l'approche expérimentale considérée a été l'utilisation des banques peptidiques.

Les résultats obtenus sont présentés dans cette thèse sous forme d'articles scientifiques dont deux articles ont déjà été publiés, deux autres sont soumis et un dernier doit être soumis prochainement. Ces articles remplacent les sections matériels et méthodes ainsi que les résultats d'une thèse conventionnelle. Cette thèse a été divisée en quatre chapitres. Le premier chapitre présente une revue bibliographique succincte de la littérature se rapportant au coronavirus, aux anticorps anti-idiotypiques ainsi qu'aux banques peptidiques abordés dans ce projet. Le deuxième chapitre traite de l'étude des mécanismes d'induction de la protection contre l'infection coronavirale à l'aide d'anticorps anti-idiotypiques, le troisième chapitre de la production et de la caractérisation d'anticorps anti-idiotypiques monoclonaux et polyclonaux, et finalement, le quatrième chapitre décrit les résultats obtenus avec l'utilisation des banques peptidiques. Ces derniers chapitres sont représentés par les articles scientifiques formatés selon les exigences du journal où l'article a été publié ou soumis. Enfin, la thèse se termine par une discussion analysant l'ensemble des résultats obtenus et une conclusion générale.

**CHAPITRE 1:**  
**REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**



## 1- LES CORONAVIRUS

### 1.1- Généralités

Les coronavirus font partie de la famille des *Coronaviridae*. Cette famille est divisée en deux genres, le genre coronavirus dont font partie les coronavirus et le genre torovirus (Cavanagh *et al.*, 1995). Les coronavirus sont des virus enveloppés contenant un acide ribonucléique (ARN) monocaténaire non-segmenté et infectieux d'environ 31 kilobases constituant le plus long ARN viral connu. Ces virus possèdent des projections de surface qui, au microscope électronique, leur donnent l'aspect caractéristique d'une couronne d'où provient leur nom. Les virions sont pléomorphes et ont une taille variant de 80 à 150 nm de diamètre. Ils infectent différentes espèces animales causant des maladies variées des systèmes respiratoire, gastro-intestinal, cardiovasculaire et neurologique, de même que des hépatites.

Le coronavirus murin a été reconnu pour la première fois par Cheever *et al.* en 1949 dans le cerveau de deux souris paralysées. Ce virus ayant la capacité d'induire une maladie paralysante ainsi que des encéphalites mortelles, a été nommé virus JHM d'après le chercheur J. Howard Mueller (Houtman et Fleming, 1996). Différentes souches de virus apparentées ont ensuite été isolées et regroupées parmi les virus de l'hépatite murine (MHV). Les MHV causent une variété de maladies telles que des hépatites, des entérites et des encéphalomyélites chez les souris et les rats dépendamment de la souche, de la voie d'inoculation et de l'hôte (Bailey *et al.*, 1949; Wege *et al.*, 1982). Les souches neurotropes JHM et A59 sont souvent utilisées dans diverses études comme modèle animal de maladies démyélinisantes telle la sclérose en plaques.

### 1.2- Protéines structurales

La particule virale possède trois à cinq protéines structurales. La nucléoprotéine N, d'une masse moléculaire variant de 50 à 60 kilodaltons (kDa), est une phosphoprotéine associée au génome viral pour former la

nucléocapside hélicoïdale. La protéine transmembranaire M, dont la plus grande partie réside dans l'enveloppe virale, possède une masse moléculaire variant de 23 à 26 kDa. La glycoprotéine de surface S, d'une masse moléculaire variant de 180 à 200 kDa, constitue les projections de surface sur l'enveloppe du virion. Ces protéines structurales sont retrouvées sur tous les coronavirus. Cependant, une glycoprotéine additionnelle nommée hémagglutinine estérase (HE) est retrouvée chez certains coronavirus tels que le coronavirus de porc (HEV), le coronavirus humain (HCV-OC43), le coronavirus bovin (BCV) et certaines souches de coronavirus murins (MHV), formant ainsi une deuxième rangée de projection de surface (Siddell, 1995). De plus, une deuxième petite protéine membranaire, E, a été identifiée chez certains virus tels que les coronavirus de dinde (IBV), le virus de l'encéphalomyélite hémagglutinante du porc (TGEV) et le virus de l'hépatite murine (MHV). La masse moléculaire de cette protéine hydrophobe varie entre 10 et 12,4 kDa et sa fonction est inconnue (Liu et Inglis, 1991; Godet *et al.*, 1992; Yu *et al.*, 1994).

Les quelques 200 projections de surface formées par les glycoprotéines S sont responsables de la liaison aux récepteurs cellulaires (Williams *et al.*, 1990) et de l'induction, par le virus, de fusions membranaires (Collins *et al.*, 1982; Sturman *et al.*, 1985; Williams *et al.*, 1991). Cette glycoprotéine dimérique ou trimérique (Cavanagh, 1983; Delmas *et al.*, 1990) possède un site de clivage protéolytique qui divise la glycoprotéine en deux sous-unités, la sous-unité N-terminale S1 et la sous-unité C-terminale S2. La sous-unité S1 formerait la partie protubérante tandis que S2 formerait la tige du péplomère (De Groot *et al.*, 1987). Il a aussi été démontré que la région N-terminale de la sous-unité S1 est impliquée dans la liaison au récepteur cellulaire (Kubo *et al.*, 1994; Saeki *et al.*, 1997) et non la sous-unité S2 (Taguchi, 1995) tel qu'attendu par la topologie de ces sous-unités. Plusieurs glycoprotéines faisant partie des antigènes carcino-embryonnaires de la superfamille des immunoglobulines présentes à la surface des épithéliums intestinaux, des hépatocytes et des macrophages sont des récepteurs du coronavirus murin (Dveksler *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1991; Dveksler *et al.*, 1993, Chen *et al.*, 1995). L'expression de ces récepteurs étant faible dans le cerveau, il a été montré pour le MHV-A59, que le récepteur utilisé serait une protéine spécifique de la grossesse qui est surtout exprimée dans le cerveau (Chen *et al.*, 1995).

### 1.3- Pathogénicité du virus de l'hépatite murine

Les coronavirus sont des virus possédant des tropismes très diversifiés. Ils produisent des pathologies variées chez différentes espèces animales et chez l'homme. Ils causent des infections qui atteignent les systèmes respiratoires, gastro-intestinaux et nerveux. Leur transmission se fait généralement par aérosols ou par voie fécale-orale. Chez l'homme, le coronavirus cause des infections respiratoires des voies supérieures ayant les mêmes caractéristiques que le rhume. D'ailleurs, les souches humaines 229E et OC43 sont responsables du tiers des rhumes (Myint, 1994). Des études variées ont aussi impliqué le coronavirus humain dans différentes pathologies telles que la pneumonie, les myocardites et les méningites (Riski et Hovi, 1980).

Le coronavirus murin, aussi appelé virus de l'hépatite murine (MHV), induit différentes maladies respiratoires, gastro-intestinales et neurologiques chez les souris et les rats. La souche neurotrophe JHM induit une infection du système nerveux central appelée encéphalite aiguë et létale (Cheever *et al.*, 1949; Kubo *et al.*, 1994). La souche MHV-A59 est plutôt hépatotrope. Cependant, ce virus MHV-A59 devient également neurotrophe lorsqu'il est injecté par voie intracérébrale. Après une inoculation intranasale, le MHV provoque une infection des voies respiratoires chez la souris. L'infection se propage ensuite jusqu'au système nerveux, suivant le nerf olfactif (Dales et Anderson, 1995). Durant l'infection du système nerveux, il y a infection de plusieurs types cellulaires: les neurones et les cellules gliales, c'est-à-dire les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules microgliales. La plupart des souris succombent à l'encéphalite aiguë. Chez les souris qui survivent à l'infection aiguë, une infection chronique se développe par la suite se manifestant par des phases de démyélinisation et de remyélinisation, ainsi que par de la paralysie (Wege *et al.*, 1982; Kyuwa et Stohlman, 1990). Durant l'infection chronique, des foyers de démyélinisation et de remyélinisation sont trouvés au niveau du système nerveux central (SNC) et de la moelle épinière. Les mécanismes exacts responsables de cette pathologie sont encore inconnus. Plusieurs études ont montré que le virus était capable d'infecter et de se répliquer dans des cellules nerveuses (Lampert *et al.*, 1973; Weiner *et al.*, 1973; Fleury *et al.*, 1980)

suggérant l'effet cytopathique du virus responsable de la lyse des cellules infectées. Cependant, d'autres études ont suggéré que la pathologie serait le résultat de la réponse immunitaire contre l'infection par le coronavirus. L'étude effectuée par Wang *et al.* (1990) a montré qu'une immunosuppression des souris prévenait le développement de la démyélinisation induite par le virus. De plus, l'expression des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II sur les cellules gliales infectées par le MHV suggère aussi l'implication du système immunitaire dans la pathologie. De plus, la pathologie a pu être induite chez des rats non immuns par le transfert adoptif de lymphocytes de rats infectés par le MHV-JHM (Watanabe *et al.* 1983).

#### **1.4- Réponse immunitaire induite par le virus de l'hépatite murine**

Différents mécanismes de défense contre l'infection par le coronavirus sont observés. Les trois protéines structurales N, M et HE sont immunogéniques (Nakanaga *et al.*, 1986; Lecomte *et al.*, 1987; Fleming *et al.*, 1989; Yokomori *et al.* 1992), mais la principale cible de l'immunité humorale est la glycoprotéine de surface S. Elle porte la majorité des épitopes impliqués dans l'induction d'anticorps neutralisants (Collins *et al.*, 1982; Talbot *et al.*, 1984; Wege *et al.*, 1984; Gilmore *et al.*, 1987; Talbot *et al.*, 1988; Daniel *et al.*, 1990 et 1993) et la protection peut être conférée par transfert passif d'anticorps monoclonaux (AcMo) (Buchmeier *et al.*, 1984; Nakanaga *et al.*, 1986; Daniel *et al.*, 1990). Par ailleurs, une région immunodominante a été identifiée dans la partie C-terminale de la glycoprotéine S (Daniel *et al.*, 1993). De plus, l'importance immunologique de la glycoprotéine S a été démontrée suite à la vaccination contre l'infection coronavirale par la glycoprotéine S purifiée par chromatographie d'affinité (Daniel *et al.*, 1990). Les anticorps anti-S sont donc importants puisqu'ils sont impliqués dans la protection contre l'infection létale.

Pour ce qui est de la réponse immunitaire cellulaire, une étude a suggéré que l'élimination du virus du système nerveux central demandait la participation combinée des cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (Williamson et Stohlman, 1990). Toutefois, une étude plus récente a cependant montré que l'élimination du virus peut être obtenue avec la participation des lymphocytes CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>, et

confirme l'importance des anticorps dans l'élimination virale (Hein *et al.*, 1995).

La réponse naturelle à médiation cellulaire semble aussi jouer un rôle important dans l'infection coronavirale. La présence du MHV stimule l'activité cytotoxique des cellules NK (natural killer) des souris infectées. D'ailleurs, une augmentation de la pathogénicité a été observée chez les souris dépourvues de cellules NK (Bukowski *et al.*, 1983). Un deuxième type d'activité cytotoxique a aussi été démontrée. Le MHV stimulerait une cellule possédant le phénotype de lymphocyte B mais détenant une activité cytotoxique spécifique à la glycoprotéine S (Holmes *et al.*, 1986; Welsh *et al.*, 1986). Cependant, le phénotype cellulaire permettant d'éliminer complètement le virus du SNC reste indéterminé.

## **2- LES ANTICORPS ANTI-IDIOTYPIQUES**

### **2.1- Structure et antigénicité des anticorps**

Les travaux initiaux de Oudin *et al.* (1963) et de Kunkel *et al.* (1963) ont démontré que les anticorps (Ac) possèdent des déterminants antigéniques localisés dans leurs domaines variables. Ces déterminants antigéniques ont été nommés des idiotopes et l'ensemble de ces idiotopes constitue l'idiotype de l'anticorps. Ces idiotopes peuvent susciter la production spécifique d'une autre série d'anticorps appelés anticorps anti-idiotypiques.

### **2.2- Réseau idiotypique**

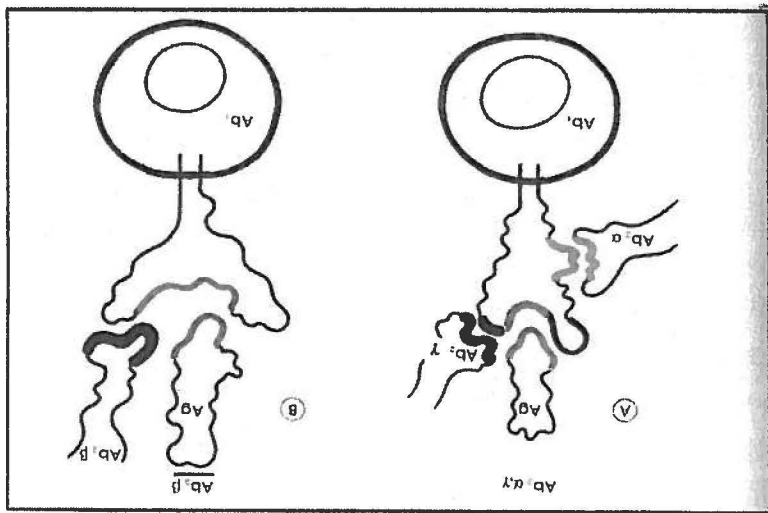
Le concept du réseau immunitaire proposé par Jerne en 1974, décrit le système immunitaire par une série d'interactions d'anticorps idiotypes (Ac1), anti-idiotypes (Ac2) et anti-anti-idiotypes (Ac3) qui assurent la régulation de l'activité immunitaire. Il a aussi postulé que le répertoire des épitopes étrangers est représenté entièrement dans l'organisme par les répertoires d'idiotopes localisés sur les anticorps et les récepteurs pour l'antigène des cellules T. Les interactions idiotypes-anti-idiotypes maintiendraient l'équilibre des anticorps d'une réponse immunitaire. Le réseau idiotypique étant formé d'un vaste

Figure 1: Schémas A) du réseau idiotypique et B) de la classification des anticorps anti-idiotypiques.

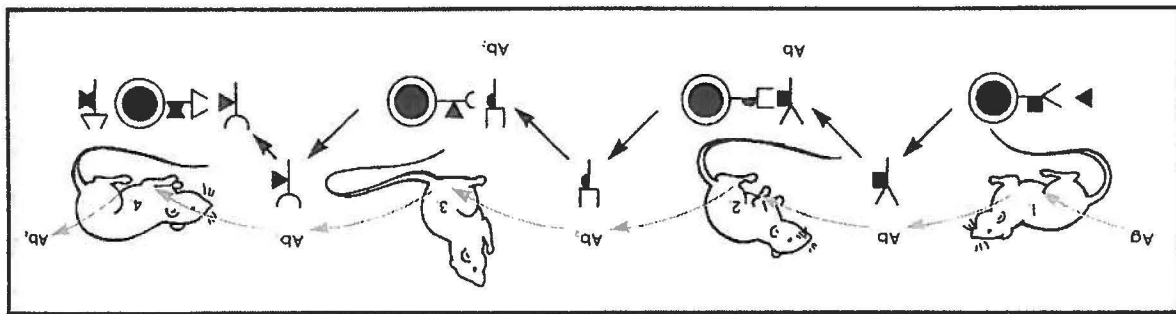
A) Dans un premier temps un antigène est injecté dans un animal qui induit la sécrétion d'Ac1 spécifique à l'antigène. L'Ac1 porte des déterminants antigéniques qui ont la capacité d'induire la production d'Ac2 spécifique à l'Ac1. De la même manière les Ac2 vont induire la production d'Ac3 etc...

B) Les Ac2 $\alpha$  reconnaissent des idiotopes éloignés du paratope de l'Ac1. Les Ac2 $\gamma$  reconnaissent des idiotopes à proximité du paratope. Les Ac2 $\beta$  reconnaissent des idiotopes à l'intérieur du paratope et miment l'antigène. Les Ac2 $\beta$  et  $\gamma$  peuvent inhiber l'attachement de l'Ac1 à l'antigène par mimétisme pour l'Ac2 $\beta$  et par encombrement stérique pour l'Ac2 $\gamma$ .

(d'après Bona, 1987)



B)



A)

réseau d'anticorps qui interagissent entre eux, lorsqu'un épitope est présenté au système immunitaire, cet épitope est alors reconnu par le site de reconnaissance de l'anticorps à l'antigène ou paratope d'un Ac1, brisant l'équilibre Ac1-Ac2 existant, altérant ainsi la fonction suppressive de l'Ac2 sur l'Ac1 et favorisant la prolifération et la différenciation des plasmocytes de l'Ac1. Quant à lui, l'Ac2 portant aussi des idiotopes associés au paratope induit le développement d'Ac3 et crée ainsi la cascade anti-idiotypique. La cascade s'arrête éventuellement par la diminution de la concentration des idiotopes en deçà du seuil d'immunogénicité.

Les anticorps anti-idiotypiques peuvent être classés en trois catégories majeures. Les Ac2 $\alpha$  sont spécifiques à des déterminants antigéniques associés à la charpente de l'anticorps, c'est-à-dire à des idiotopes éloignés du paratope de l'Ac1. Les Ac2 $\gamma$  reconnaissent des idiotopes à proximité du paratope et les Ac2 $\beta$  représentent la catégorie des anticorps anti-idiotypiques portant l'image miroir de l'antigène, c'est-à-dire qui reconnaissent le paratope de l'Ac1. Plus spécifiquement, le paratope de l'Ac1 reconnaissant l'antigène peut servir de moule pour la synthèse d'un Ac2 $\beta$ . Cet Ac2 $\beta$  sera donc semblable à l'antigène et pourra éventuellement le remplacer. Ces deux derniers types d'anticorps anti-idiotypiques ( $\gamma$  et  $\beta$ ) peuvent entrer en compétition avec l'antigène pour le paratope, soit par encombrement stérique (Ac2 $\gamma$ ), soit par un paratope (Ac1) déjà occupé par l'Ac2 $\beta$ . Un changement conformationnel de la structure du paratope peut aussi être responsable d'empêcher l'Ac1 de lier l'antigène.

### **2.3- Mimétisme et cascade idiotypique**

Plusieurs travaux ont démontré les propriétés de mimétisme antigénique des anticorps anti-idiotypiques au niveau fonctionnel, structural et par l'intermédiaire de la cascade idiotypique.

La première démonstration de l'existence d'un Ac2 $\beta$  provient d'une étude de Sege et Peterson (1978). Des anticorps anti-idiotypiques produits à partir d'anticorps anti-insuline avaient la capacité d'interagir avec les récepteurs de l'insuline et de stimuler l'action physiologique de celle-ci. Depuis, plusieurs



équipes ont réussi à produire des anticorps anti-idiotypiques capables de lier les récepteurs du ligand correspondant (Schreiber *et al.*, 1980; Marasco et Becker, 1982; Wassermann *et al.*, 1982; Czop *et al.*, 1990; Hassemann *et al.*, 1991; Lassoued *et al.*, 1991).

Une autre étude effectuée par Garcia *et al.* (1992), a montré en utilisant le modèle de l'angiotensine II, que les anticorps de la cascade idiotypique sont structurellement superposables. Les séquences des régions variables des chaînes lourdes et légères de l'Ac1 et de l'Ac3 se sont avérées pratiquement identiques. Les Ac1 et Ac3 possèdent non seulement les mêmes propriétés de reconnaissance de l'angiotensine II, mais les résidus importants de l'Ac1 qui font contact avec l'antigène sont conservés dans l'Ac3, suggérant fortement que l'Ac2 $\beta$  est similaire à l'antigène.

De plus, des études cristallographiques ont démontré de façon convaincante les bases moléculaires du mimétisme antigénique et des interactions idiotypes-anti-idiotypes. Par exemple, une étude récente utilisant le lysozyme comme antigène a montré par l'analyse des structures cristallines du complexe idiotype-anti-idiotype et du complexe idiotype-antigène, que les mêmes acides aminés du paratope de l'idiotype étaient en contact avec l'anti-idiotype et l'antigène (Fields *et al.*, 1995). Ceci démontre que l'anti-idiotype mime le lysozyme dans son interaction avec l'idiotype. En plus, la capacité de l'anti-idiotype d'induire une réponse anti-lysozyme confirme son mimétisme structural au lysozyme.

#### **2.4- Identification des épitopes**

Cette propriété de mimétisme structural des Ac2 $\beta$  a été exploitée comme outil pour identifier des épitopes ou des récepteurs de différents ligands.

Plusieurs équipes ont caractérisé des épitopes par l'intermédiaire des anticorps anti-idiotypiques. Le réovirus a fait l'objet de plusieurs travaux. Le groupe de Mark I. Greene a produit un AcMo2 $\beta$  à partir d'un AcMo spécifique à l'hémagglutinine du réovirus de type 3. Cet AcMo2 $\beta$  a permis d'identifier le récepteur cellulaire impliqué dans l'infection virale (Noseworthy *et al.*, 1983).

De plus, l'AcMo<sub>2</sub> $\beta$  a la propriété d'inhiber la liaison du virus aux cellules (Kauffman *et al.*, 1983). Cette équipe a aussi démontré que le mimétisme antigénique par l'anticorps peut être atteint par le partage de la structure primaire entre la région variable de l'anticorps et l'épitope (Bruck *et al.*, 1986). Une homologie significative entre les séquences protéiques de l'hémagglutinine virale et de la chaîne légère de l'AcMo<sub>2</sub> $\beta$  a été observée. L'identification du récepteur cellulaire du virus Sindbis (Wang *et al.*, 1991) est un autre exemple de l'utilisation des anticorps anti-idiotypiques comme sonde pour caractériser des déterminants moléculaires impliqués dans la pathogénèse.

## 2.5- Maladies autoimmunitaires

Les anticorps anti-idiotypiques jouent un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire par le réseau idiotypique. Par exemple, le réseau idiotypique a été impliqué dans les mécanismes de maintien de la tolérance du soi en périphérie. Une régulation insuffisante de clones potentiellement autoréactifs pourrait être responsable de l'induction d'une maladie autoimmunitaire. Lors d'une infection normale par un virus, une bactérie ou un parasite, des anticorps anti-microorganismes sont produits. Certains de ces anticorps idiotypiques (Ac1) portent des idiotopes pathogènes normalement présents dans le répertoire. Chez les personnes en santé, ces anticorps idiotypiques induisent la cascade idiotypique menant à l'éradication du microorganisme qui est suivie d'une diminution de son titre à un niveau pratiquement indétectable (Cohen, 1992). Cependant, chez une personne prédisposé aux maladies autoimmunitaires, la cascade idiotypique va continuer jusqu'à la génération d'autoanticorps (Ac3). La présence d'anticorps anti-idiotypiques reconnaissant spécifiquement les déterminants pathogènes exprimés sur les anticorps idiotypiques, ont été détectés dans plusieurs maladies autoimmunes humaines telles que le lupus érythémateux systémique (Bronshtein *et al.*, 1992), la thyroïdie d'Hashimoto et la maladie de Grave (Sikorka, 1986). La présence de ces autoanticorps anti-idiotypiques durant la période de rémission des patients atteints de lupus érythémateux a suggéré qu'ils étaient nécessaires dans la régulation des lymphocytes B qui génèrent les anticorps portant l'idiotope pathogène. Les anticorps anti-idiotypiques

peuvent prévenir cette production soit directement en bloquant la synthèse en se liant aux récepteurs des lymphocytes B, ou soit indirectement en formant des complexes avec l'anticorps exprimant l'idiotope, accélérant leurs éliminations par le système réticuloendothélial.

## 2.6- Cancers

À l'inverse des maladies autoimmunitaires, la tolérance est un problème chez les patients atteints de tumeurs. L'une des approches utilisées pour contrer cette tolérance est la vaccination à l'aide de cellules tumorales autologues et allogéniques inactivées, ou l'isolement d'antigènes tumoraux. Cependant la faible spécificité, le manque de sécurité et d'immunogénicité, ainsi que la faible quantité de ces antigènes font partie des nombreux désavantages. Ces préparations contiennent des déterminants partagés avec les tissus sains pouvant induire une réponse autoimmunitaire. Les vaccins produits à partir des cellules tumorales peuvent être contaminés par des virus. L'une des alternatives attrayantes à ces problèmes est l'utilisation des anticorps anti-idiotypiques. Des anticorps anti-idiotypiques spécifiques à la cellule tumorale peuvent être produits en grande quantité, et ils ont l'avantage de ne mimer qu'un seul épitope de l'antigène tumorale.

Les anticorps anti-idiotypiques ont la capacité d'induire une réponse cellulaire et humorale (Raychaudhury *et al.* 1986, 1987a, 1987b). Cependant, les mécanismes anti-tumoraux impliqués dans la vaccination anti-idiotypique ne semblent pas être identifiés.

## 2.7- Vaccination

Les anticorps anti-idiotypiques ont aussi été étudiés comme traitement éventuel contre des infections virales, bactériennes et parasitaires, surtout dans le cas où les antigènes sont peu ou pas disponibles, d'antigènes peu immunogènes tels que les polysaccharides, dans le cas de risque pathologique ou d'antigènes toxiques tels que les toxines bactériennes (Nisonoff, 1991). Le concept de cascade anti-idiotypique a conduit à différentes possibilités de vaccin idiotypique.

La première manipulation du réseau idiotypique pour altérer le cours d'une maladie infectieuse a été décrite par Sacks *et al.* (1982) avec l'agent infectieux *Trypanosoma brucei rhodesiense*, l'agent causal de la maladie du sommeil. Des anticorps anti-idiotypiques polyclonaux murins ont été générés à partir d'un AcMo protecteur spécifique à la glycoprotéine de surface majeure du parasite. Ces anticorps anti-idiotypiques ont conféré une immunité protectrice chez les souris immunisées. Un peu plus tard, le même groupe (Sacks *et al.*, 1985) a produit un Ac2 $\beta$  mimant un déterminant polysaccharidique de la glycoprotéine de surface. Cet Ac2 $\beta$  a été capable de générer des Ac3 antiparasites, sans toutefois permettre de réponse immunitaire protectrice.

Tel que mentionné précédemment, afin de palier à certains inconvénients des vaccins conventionnels, des Ac2 $\beta$  ont été développés contre plusieurs agents pathogènes et plusieurs travaux ont évalué la capacité de ces Ac2 $\beta$  à induire une réponse immunitaire antimicrobienne. Les principes de vaccination anti-idiotypique ont été appliqués avec succès dans plusieurs systèmes viraux. Des Ac2 $\beta$  produits chez le lapin à partir d'un Ac1 spécifique à l'antigène de surface du virus de l'hépatite B ont induit une réponse protectrice chez des chimpanzés (Kennedy *et al.*, 1986). Dans l'exemple du virus de la rage, des Ac2 $\beta$  mimant la glycoprotéine du virus ont induit la production d'Ac neutralisants le virus (Reagan *et al.*, 1983). Une autre étude a décrit la génération d'Ac neutralisant le poliovirus de type 2 (Fons *et al.*, 1985).

Pride *et al.* (1992) ont identifié un épitope responsable du mimétisme antigénique d'un anticorps anti-idiotypique. Le peptide synthétique, dérivé d'un Ac2 $\beta$  mimant un déterminant du virus de l'hépatite B, a induit non seulement des anticorps anti-antigène de surface du virus mais aussi une réponse cellulaire T.

Dans le système coronaviral, le potentiel immunogénique des anticorps anti-idiotypiques a également été étudié chez le virus de la gastro-entérite transmissible du porc (TGEV) (Hariharan *et al.*, 1989; Suñe *et al.*, 1991) et chez le MHV-A59 (Lamarre *et al.*, 1991). Chez le TGEV, six AcMo2 ont été générés contre un AcMo neutralisant et spécifique à un épitope de la glycoprotéine de surface du TGEV. Quatre des AcMo2 se sont avérés être de type  $\gamma$  et deux de type  $\beta$ . Toutes les souris immunisées avec les AcMo2 $\beta$  ont généré des Ac3 anti-

TGEV, tandis que seulement 25% à 50% des souris immunisées avec les AcMo<sub>2</sub> $\gamma$  ont produit des Ac<sub>3</sub> anti-TGEV. Chez le MHV, un Ac<sub>2</sub> polyclonal a été produit chez le lapin contre un AcMo neutralisant et protecteur anti-MHV-A59. Cet Ac<sub>2</sub> a été classé de type  $\gamma$  puisque la préparation ne contenait pas d'activité d'image interne détectable. Contrairement au TGEV, la vaccination de souris BALB/c, à l'aide d'un Ac<sub>2</sub> $\gamma$  produit chez le lapin, a protégé la grande majorité des souris contre l'infection coronavirale létale. De plus, cette protection a été accompagnée d'une production d'Ac<sub>3</sub> neutralisant le virus (Lamarre *et al.*, 1991). Ainsi, malgré que la majorité des réponses protectrices induites par les anticorps anti-idiotypiques aient été obtenues à l'aide d'Ac<sub>2</sub> $\beta$ , les Ac<sub>2</sub> $\gamma$  qui ne portent pas l'image interne de l'antigène peuvent aussi dans certains cas induire une réponse immunitaire protectrice.

## 2.8- Complexité du réseau idiotypique

On peut facilement deviner que le réseau idiotypique est complexe. L'exemple précédent décrivant la capacité d'un  $Ac2\gamma$  ne mimant pas l'antigène d'induire une réponse immunitaire protectrice, est une belle illustration de cette complexité.

En plus d'interagir avec les autres anticorps du réseau, il semblerait que les anticorps anti-idiotypiques interagiraient aussi avec les lymphocytes T. Ainsi, en plus d'avoir la capacité d'induire une réponse immunitaire humorale contre l'antigène par sa propriété de mimétisme moléculaire, les  $Ac2\beta$  peuvent aussi provoquer une réponse immunitaire cellulaire. Par exemple, un  $Ac2\beta$  mimant un épitope mycobactérien a pu activer spécifiquement des lymphocytes T (Rees *et al.*, 1987). Pour certains pathogènes infectieux comme *M. tuberculosis*, la protection est obtenue par les lymphocytes T et non par les anticorps (Mackaness, 1969). Ainsi, les anticorps anti-idiotypiques peuvent s'avérer une bonne stratégie dans le développement de vaccins contre ces maladies.

Il a aussi été observé qu'un  $AcMo2\beta$  possédant l'image miroir du déterminant "a" de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B, a été capable d'outrepasser la restriction génétique imposé par l'antigène (Pride *et al.*, 1993). Dans ce système, la souris d'haplotype H-2<sup>f</sup> ne permet pas la réponse contre la protéine S de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B, tout comme plusieurs haplotypes chez l'humain. Dans cette étude, l'immunisation avec l' $AcMo2\beta$  a permis d'induire une réponse humorale et cellulaire chez des souris sauvages et également chez les souris d'haplotype H-2<sup>f</sup>, contrairement à l'antigène. La réponse spécifique cellulaire et humorale contre l'antigène de surface du virus de l'hépatite B chez la souris sauvage est biologiquement intéressante étant donné l'hétérogénéité génétique chez l'homme.

Cependant, une étude a décrit une augmentation plutôt qu'une amélioration de la pathologie provoquée par le virus herpès simplex suite à l'immunisation de souris BALB/c avec des anticorps anti-idiotypiques (Kennedy *et al.*, 1984). Ainsi, une meilleure compréhension des interactions entre les

différents éléments du réseau idiotypique est nécessaire afin d'éviter leur effets néfastes possibles.

Malgré l'aspect prometteur des  $Ac2\beta$  dans le développement de vaccins, les autres types d'anticorps anti-idiotypiques pourraient aussi être intéressants compte tenu que les  $Ac2\beta$  ne représentent généralement qu'une fraction mineure d'une réponse anti-idiotypique. Quelques équipes ont décrit l'induction d'une réponse immunitaire spécifique à l'antigène par l'administration d'anticorps anti-idiotypiques ne possédant pas les propriétés des images miroirs, c'est-à-dire les  $Ac2\alpha$  et  $Ac2\gamma$ . Zhou *et al.* (1990) ont rapporté l'induction d'anticorps neutralisants contre la gp41 du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) après avoir administré un  $Ac2\alpha$ . Dans une autre étude, un  $Ac2\alpha$  polyclonal a induit des  $Ac3$  reconnaissant spécifiquement l'antigène de surface du virus de l'hépatite B (Shick *et al.*, 1987). Dans notre laboratoire, une réponse immunitaire protectrice contre le coronavirus murin a été obtenue avec des anticorps  $Ac2\gamma$  (Lamarre *et al.*, 1991). Le réseau idiotypique est encore mal connu et un grand nombre de questions restent encore sans réponse, d'où l'importance de la recherche sur le réseau idiotypique et les mécanismes impliqués dans la protection en absence de l'antigène.

### **3- LES BANQUES PHAGIQUES EXPRIMANT DES PEPTIDES A LEUR SURFACE**

#### **3.1- Généralités**

La première étude démontrant la présentation de peptides à la surface de phages filamenteux a été effectuée par G. Smith en 1985 (Smith, 1985). Cependant, les applications de cet important outil de sélection ne sont apparus que quelques années plus tard (Parmley et Smith, 1988; Scott et Smith, 1990). Les banques phagiques sont issues de bactériophages filamenteux tels que les bactériophages fd, f1 et M13, exprimant des peptides étrangers fusionnés à une des protéines de surface (Smith, 1985; Parmley et Smith, 1988). Généralement, les phages expriment des séquences peptidiques aléatoires codées par des oligonucléotides dégénérés. Les banques peuvent avoir une diversité allant

jusqu'à plus de  $10^{10}$  séquences peptidiques différentes (Bonnycastle *et al.*, 1996). Les phages des banques peptidiques peuvent exprimer des peptides linéaires de longueur variable, permettant de mimer les épitopes continus. Ces phages peuvent également exprimer des peptides pouvant former une ou plusieurs boucles afin de favoriser l'obtention d'une structure secondaire grâce à la formation de ponts disulfures dans le peptide ou entre le peptide et le phage, permettant d'imiter la complexité structurale d'un épitope discontinu.

Cette technologie des banques peptidiques permet de cartographier des épitopes reconnus par des anticorps et d'identifier des ligands de récepteurs ou autres molécules.

### **3.2- Système**

Les phages filamenteux sont utilisés pour présenter à leur surface, fusionnés avec le domaine amino-terminal des protéines pIII ou pVIII, des peptides aléatoires (Scott et Smith, 1990) ou des fragments d'anticorps (Fab, Fv ou scFv) (Winter *et al.*, 1994). Pour les besoins de cette thèse, nous ne discuterons que des banques de peptides. La protéine pIII présente de 3 à 5 copies par phage, se situe à l'une des extrémités de la particule et est responsable de l'attachement du phage au pilus F bactérien pour permettre l'infection. La protéine pVIII est présente à environ 2700 copies par phage et forme la capsid. Les peptides étrangers exprimés par les phages et présents à la surface de la particule virale sont disponibles pour la liaison avec des ligands. Les phages recombinants sont donc sélectionnés pour leur capacité de liaison à une cible. Après plusieurs lavages, les phages fixés sont élués et amplifiés par infection de bactéries. Après plusieurs rondes de sélection et d'amplification, le génome des phages sélectionnés est alors séquencé afin d'identifier les peptides portés par ces phages.

### **3.3- Identification des épitopes**

Les premières publications qui décrivaient la construction et l'utilisation des banques peptidiques phagiques (Cwirla *et al.*, 1990; Devlin *et al.*, 1990;



Scott et Smith, 1990) ont suggéré une technique d'une grande puissance pour cartographier des épitopes de façon précise et efficace, puisqu'il est possible de sélectionner un phage dont la fréquence était de  $10^{-8}$  dans la banque originale.

Plusieurs études ont démontré que des peptides sont capables d'interagir avec des épitopes linéaires discontinus et même non-protéiques (Oldenburg *et al.*, 1992; Scott *et al.*, 1992; Zhong *et al.*, 1994; Bonnycastle *et al.*, 1996; Harris *et al.*, 1997). Les banques de peptides aléatoires ont aussi permis d'identifier des séquences peptidiques qui interagissent avec des cibles qui ne sont pas des anticorps, tel que la streptavidine (Devlin *et al.*, 1990) et la concanavaline A (Oldenburg *et al.*, 1992; Scott *et al.*, 1992).

Dans le cas d'épitopes continus reconnus par des AcMo, des séquences peptidiques très homologues aux séquences primaires de l'antigène original ont été sélectionnées révélant l'épitope reconnu (Cwirla *et al.*, 1990; Scott et Smith, 1990; Felici *et al.*, 1991; Stephen et Lane, 1992; Keller *et al.*, 1993). Par contre, dans le cas des épitopes discontinus, seulement une identité limitée est habituellement observée entre la séquence du peptide sélectionné et l'épitope correspondant sur la protéine antigénique (Laemmli, 1970; Felici *et al.*, 1993; Luzzago *et al.*, 1993). Cependant, des expériences de compétition permettent de valider l'interaction. Ces peptides ne correspondant pas nécessairement à l'épitope original, pourraient mimer sa structure secondaire et ses propriétés de liaison. Dans l'exemple décrit par Balass *et al.* (1994), une séquence consensus des peptides sélectionnés par un AcMo spécifique au site de liaison du récepteur de l'acétylcholine ne révéla pas d'homologie avec la séquence du récepteur. Cependant, un test fonctionnel a montré que les peptides dérivés des phages sélectionnés inhibent l'interaction entre l'AcMo et le récepteur. De plus, l'injection des peptides à des poulets prévient les symptômes de blocage neuromusculaire induits par l'injection passive de l'AcMo.

Les banques peptidiques ont aussi permis de caractériser des épitopes reconnus par des anticorps polyclonaux (Dybwad *et al.*, 1995). De plus, la sélection de peptides avec des sérums de patients permet d'identifier des épitopes spécifiques de maladies infectieuses sans connaître préalablement l'antigène pathogène. Les peptides sélectionnés réagissent avec les anticorps

du sérum mais pas avec les anticorps des sérums témoins (Cortese *et al.*, 1996).

### 3.4- Immunogénicité

Ainsi, des ligands spécifiques ont pu être identifiés sans une connaissance préalable de l'antigène (Fogori *et al.*, 1994). L'immunisation de souris avec les phages sélectionnés a généré une réponse humorale spécifique contre l'antigène de surface du virus de l'hépatite B. Cette étude est un exemple qui illustre le potentiel de développement de vaccins sans nécessiter l'identification de l'agent pathogène.

Afin de confirmer l'hypothèse de mimétisme moléculaire retrouvé dans les motifs partageant peu d'homologie avec l'antigène d'origine, plusieurs études ont évalué l'induction d'une réponse immunitaire spécifique à l'antigène original en immunisant des animaux à l'aide de peptides synthétiques représentant les peptides sélectionnés à la surface des phages. Par exemple, un peptide synthétique identique au peptide sélectionné et couplé à l'ovalbumine, a été considéré comme mimant la structure tridimensionnelle de l'épitope natif car il ne possédait que 50% d'homologie de séquence en acide aminé avec l'épitope. Afin de vérifier cette hypothèse de mimétisme, une réponse humorale contre les sporozoïtes de *Plasmodium falciparum* a été générée par immunisation avec le peptide sélectionné par un AcMo (Stoute *et al.*, 1995). Certaines études ont aussi évalué l'induction d'une réponse spécifique en immunisant directement avec les phages. Cette stratégie a été utilisée dans une étude de réponse anti-VIH (Lundin *et al.*, 1996). Dans cet exemple, l'injection des phages a induit une réponse anti-gp120 chez le lapin.

L'étude faite par Greenwood *et al.* (1991) montre que les peptides exprimés sur la protéine majeure de la capsid (pVIII) sont plus immunogéniques que ceux exprimés sur la protéine mineure pIII; ceci est présumément dû à un nombre supérieur de copies du peptides sur la surface du phage (2700 copies comparativement à 3-5 copies). De plus, il a aussi été démontré que les peptides exprimés à la surface des phages ont induit une plus forte réponse immunitaire que les peptides couplés à une autre molécule

porteuse (Lenstra *et al.*, 1992; Meola *et al.*, 1995; de la Cruz *et al.*, 1988). Cependant, d'autres études ont montré que les peptides exprimés à la surface des phages sélectionnés par des AcMo ne sont pas nécessairement immunogéniques. Felici *et al.* (1993) ont rapporté l'incapacité des clones de phages sélectionnés par leur habilité à lier l'AcMo contre la toxine de *Bordetella pertussis*, d'induire une réponse immunitaire spécifique contre la toxine; alors qu'une étude effectuée par le même groupe sur l'antigène de surface du virus de l'hépatite B démontra la production d'anticorps avec des réactions croisées (Meola *et al.*, 1995).

Les banques peptidiques offrent donc une approche intéressante pour l'identification d'épitopes continus et discontinus reconnus par des anticorps monoclonaux antiviraux. Ils permettent aussi d'étudier les propriétés immunogéniques des séquences portées par les phages sélectionnés.

**CHAPITRE 2:**

**ETUDE DES MECANISMES DE PROTECTION CONTRE  
L'INFECTION CORONAVIRALE A L'AIDE D'UN ANTICORPS  
ANTI-IDIOTYPIQUE NON-IMAGE INTERNE.**

## Introduction à l'article I

Une étude précédente avait démontré qu'un Ac $2_{\gamma}$  polyclonal, non-image interne, produit chez le lapin contre un AcMo possédant des propriétés biologiques de neutralisation et de protection contre l'infection coronavirale, était capable d'induire une réponse immunitaire protectrice efficace contre l'infection aiguë chez la souris BALB/c (Lamarre *et al.*, 1991). Cet anticorps anti-idiotypique a été identifié de type gamma par son incapacité à être reconnu spécifiquement par des sérums anti-MHV-A59 produits chez des espèces animales différentes, tels que le rat et le lapin (Lamarre *et al.*, 1991). Un mimétisme fonctionnel plutôt que moléculaire a donc été suggéré pour expliquer son mode d'action. Un anticorps anti-idiotypique mimant l'antigène tridimensionnellement, mime nécessairement les propriétés biologiques de ce dernier tandis que l'inverse n'est pas obligatoirement vrai. Afin de caractériser les mécanismes d'induction de la protection par cet Ac $2_{\gamma}$  non-image interne, nous avons évalué son potentiel de vaccination chez des souches de souris d'haplotypes H-2 différents, sachant que l'une des propriétés fonctionnelles des images internes est d'outrepasser la restriction génétique de la réponse immunitaire. Les résultats obtenus par cette étude ont été publiés dans "European Journal of Immunology" (avec la collaboration de Suzanne Lemieux pour son expertise dans la sélection des souris congéniques utilisées).

L'immunisation de différentes souris avec des Ac $2_{\gamma}$  non-image interne a induit une immunité protectrice chez quatre des huit souches de souris génétiquement différentes et susceptibles à l'infection par le coronavirus murin. De plus, la présence d'Ac3 neutralisant le virus *in vitro* a été détectée chez les souris vaccinées qui ont survécu à l'infection fatale. Ceci suggère donc que la protection n'est pas restreinte à l'haplotype H-2<sup>d</sup> de la souris BALB/c mais s'observe aussi chez deux souches de souris d'haplotype H-2<sup>a</sup>. Cependant, après l'analyse de l'implication génétique du complexe H-2 dans la protection, les profils de protection obtenus avec des souris congéniques, suggèrent que l'élément génétique principal responsable de la réponse antivirale semble localisé à l'extérieur du complexe majeur d'histocompatibilité. Ces résultats sont en accord avec la capacité des Ac2 d'induire des Ac antiviraux protecteurs par mimétisme biologique chez des animaux génétiquement différents.

**ARTICLE I**

**GENETIC CONTROL OF ANTI-IDIOTYPIC VACCINATION AGAINST  
CORONAVIRUS INFECTION.**

Mathilde W.N. Yu, Suzanne Lemieux\* et Pierre J. Talbot

Laboratoire de neuroimmunovirologie,  
Institut Armand-Frappier, Université du Québec  
Laval, Québec, Canada H7V 1B7  
et \*Centre de recherche en immunologie,  
Institut Armand-Frappier, Université du Québec  
Laval, Québec, Canada H7V 1B7

Article publié dans: "European Journal of Immunology" (1996) 26: 3230-3233.

## Sommaire traduit

Le réseau idiotypique peut être délibérément altéré afin de générer une réponse immunitaire protectrice contre des pathogènes. Il a été démontré qu'autant les anticorps anti-idiotypiques représentant l'image interne de l'antigène que les anticorps ne représentant pas l'image interne de l'antigène, peuvent stimuler une réponse immunitaire spécifique contre l'antigène. Les mécanismes permettant une telle vaccination anti-idiotypique semblent dépasser le niveau de mimétisme structural de l'antigène et restent encore à être déterminés. Utilisant le modèle animal du coronavirus murin, nous avons précédemment démontré qu'un anticorps anti-idiotypique polyclonal ne représentant pas l'image interne de l'antigène pouvait vacciner efficacement des souris BALB/c contre l'infection létale par le coronavirus. Afin de caractériser son mode d'action, nous nous sommes penchés sur la capacité immunomodulatoire de cet Ac2 chez des souches de souris d'haplotypes H-2 différents. Bien que seuls les Ac2 $\beta$  images internes soient capables de traverser les barrières génétiques pour l'élaboration d'une réponse immunitaire protectrice, notre Ac2 $\gamma$  ne possédant pas d'image interne, a été capable d'induire une immunité protectrice chez quatre des huit souches de souris génétiquement différentes et susceptibles à l'infection par le coronavirus murin. Les souris vaccinées qui ont survécu à l'infection létale sont les souris BALB/c (H-2<sup>d</sup>), DBA/2 (H-2<sup>d</sup>), DBA/1 (H-2<sup>q</sup>) et SWR (H-2<sup>q</sup>). Une corrélation entre la protection et l'induction d'Ac3 neutralisants spécifiques au virus a été observée. Afin d'évaluer la contribution génétique du complexe H-2, des souris congéniques ont aussi été soumises au test de protection. Le profil de vaccination de ces souris suggère que la coopération entre des gènes du fond génétique de la souris BALB/c et les complexes H-2<sup>d</sup> et H-2<sup>q</sup> est nécessaire pour obtenir une réponse immunitaire optimale. Cependant, l'élément génétique principal qui régule la réponse antivirale due à l'inoculation de l'Ac2 semble être localisé à l'extérieur du complexe majeur d'histocompatibilité. Ces résultats sont conséquents avec la capacité des Ac2 d'induire, par mimétisme biologique, des Ac antiviraux protecteurs chez des animaux génétiquement différents.

## Summary

The idiotypic network can be experimentally altered to induce protective immune responses against microbial pathogens. Both internal image and noninternal image anti-I<sub>d</sub> antibodies have been shown to trigger Ag-specific immune responses. Therefore, mechanisms of anti-I<sub>d</sub> vaccination appear to go beyond structural mimicry of Ag but remain undefined. Using the neurotropic murine coronavirus animal model, we have previously shown that a polyclonal noninternal image anti-I<sub>d</sub> (Ab2) could vaccinate BALB/c mice. To characterize its mode of action, we have examined the *in vivo* immune modulating capability of this Ab2 in strains of mice with different H-2 haplotypes. Even though only internal image anti-I<sub>d</sub> are expected to induce non-genetically restricted immunity, this noninternal image Ab2 induced protective immunity in four of eight genetically different strains of mice susceptible to coronavirus infection. These were BALB/c (H-2<sup>d</sup>), DBA/2 (H-2<sup>d</sup>), DBA/1 (H-2<sup>q</sup>) and SWR (H-2<sup>q</sup>) mice. Protection was generally correlated with the induction of specific antiviral Ab (Ab3) that showed biological properties, such as *in vitro* virus neutralization, similar to the initial Ab1. To evaluate the genetic implication of the H-2 haplotypes in protection, congenic mice were also tested. Vaccination profiles suggest that cooperation between background gene(s) of the BALB/c mouse with H-2<sup>d</sup> and H-2<sup>q</sup> loci is necessary for an optimal protective immune response, although the main genetic element(s) regulating the antiviral response to Ab2 inoculation appeared to be located outside the MHC complex. These results are consistent with the ability of Ab2 to induce protective antiviral antibodies in genetically different animals by biological mimicry.



## 1 Introduction

The use of anti-idiotypic antibodies (anti-Id) as potential vaccines against infectious agents has been of interest because of the capacity of these antibodies to act as surrogate antigens. Anti-Id are classified into three major categories: Ab2 $\alpha$ , Ab2 $\beta$  and Ab2 $\gamma$ . The Ab2 $\gamma$  and Ab2 $\alpha$  recognize framework idiotopes either near or distant from the paratope of the Ab1, respectively, whereas Ab2 $\beta$ , also called internal image anti-Id, recognize paratope-associated idiotopes. By their potential to molecularly mimic the antigen (Ag), Ab2 $\beta$  have been shown to induce neutralizing and/or protective antibodies against various infectious agents [1-3] and to activate T lymphocytes [4]. A true internal image would not be genetically restricted in its ability to induce an immune response, and would be efficient across species barriers [5,6].

Theoretically, only internal image anti-Id were expected to act as surrogate Ag. It was therefore surprising that noninternal image anti-Id induced immune responses such as neutralizing and/or protective activities against a pathogen [7-9]. However, in contrast to immunization with internal image Ab2 $\beta$ , non internal image anti-Id may be genetically restricted by their inability to induce an immune response in different species [10]. Recent studies have also shown that a T cell response could be elicited by noninternal image anti-Id [11,12]. These observations emphasize the complexity of the idiotypic network and the need to characterize the mechanisms of action of Ab2.

Neurotropic murine coronaviruses, such as MHV-A59, induce multiple sclerosis-like diseases in rodents and provide an excellent animal model for studies of the idiotypic network in the context of a virus infection. The viral surface S glycoprotein is the target of humoral [13] and cellular immune responses [14,15], bears the majority of virus neutralization epitopes [16,17] and is an important determinant of virulence in animals [18,19].

We have previously reported the induction of a protective anti-coronavirus immune response in BALB/c mice by polyclonal Ab2 produced in rabbits immunized with a neutralizing and protective mAb1 designated 7-10A [20]. Because the Ab2 preparation did not contain detectable internal image activity and inhibited the interaction between Ab1 and virus, this Ab2 preparation was

identified as Ab2 $\gamma$  [20].

To further characterize the protective effect of these Ab2, we asked whether their vaccinating potential could be reproduced in coronavirus-susceptible mice belonging to different inbred strains. Our results indicate that the Ab2-induced production of specific anti-coronavirus neutralizing Ab3 is successful only in certain strains of mice. Data obtained with MHC-congenic mice support the conclusion that both H-2 and non-H-2 dependent genes are determining factors in success or failure of anti-coronavirus vaccination with Ab2.

## **2 Materials and methods**

### **2.1 Animals**

New Zealand white female rabbits of 2.5 to 3 kg were purchased from the *Ferme de sélection Cunipur*, Stukely Sud, Québec, Canada. Four- to 5-week-old MHV-seronegative mice were purchased from Charles River, St-Constant, Québec, Canada (BALB/c, DBA/2, C3H, C57BL/6 [B6]), The Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA (DBA/1, CBA, BALB.K, C57BL/10 [B10]), or Harlan UK Ltd., Shaw's Farm, Blackthorn, Bicester, Oxon, England (B10.D2, SWR, B10.G and BALB.B).

### **2.2 Virus and cells**

Strain A59 of mouse hepatitis virus (MHV-A59) was originally obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA), plaque-purified twice, and passaged four times at a multiplicity of infection of 0.01 on DBT cells as described previously [21].

### **2.3 Anti-Id antibodies and Ab2-induced protective immune response**

The immunization protocol for generating anti-Id anti-7-10A, their purification and characterization, as well as the Ab2 immunization protocol, the protection assays, the ELISA and virus neutralization assays for detection of Ab3 against MHV-A59 were performed as described previously [20].

### **2.4 Statistics**

Results of *in vivo* protection assays were analyzed with the Kaplan-Meier survival curve procedure [22]. Cox's proportional hazards model was used to analyze the reduction in mortality associated with the administration of the anti-Id compared to NR1g [22]. Antiviral Ab3 antibody responses were evaluated and analyzed with the Mann-Whitney test [22]. In these tests, a *p* value of <0.05 was accepted as statistically significant.

### 3 Results and Discussion

#### 3.1 Immunization of mice of different strains with Ab2

We have previously shown that rabbit polyclonal anti-Id anti-7-10A (Ab2) were able to induce a protective immune response in BALB/c mice against MHV-A59 [20]. To examine whether the vaccinating property of these Ab2 was genetically controlled, mice of eight different inbred strains were immunized with Ab2 or control normal rabbit immunoglobulins (NRlg) and challenged intracerebrally with 10 LD<sub>50</sub> of MHV-A59. The LD<sub>50</sub> values ranged between 1.75 and  $8 \times 10^4$  PFU, except for B6 and SWR strains, where it was around  $6 \times 10^3$  and B10.D2 and B10.G mice where it was  $1-1.3 \times 10^5$  (data not shown). In agreement with our previous observations [20], about 75% of Ab2-immunized BALB/c (H-2<sup>d</sup>) mice survived over 60 days after virus challenge (Fig. 1). However, marked variations in the survival rates were detected from one mouse strain to another. An almost complete protection was obtained in SWR and DBA/1 (H-2<sup>q</sup>) mice whereas only 25 to 30% of immunized DBA/2 (H-2<sup>d</sup>) and CBA (H-2<sup>k</sup>) mice survived virus challenge. However, the protection observed in CBA mice was not statistically significant. Moreover, Ab2 had no vaccinating capacity in B6 and B10 (H-2<sup>b</sup>) mice and an apparent reduced survival was even seen in C3H (H-2<sup>k</sup>) mice in comparison with control NRlg-treated mice. Thus, Ab2-mediated protection was seen in H-2<sup>q</sup> and H-2<sup>d</sup> mice but not in H-2<sup>k</sup> and H-2<sup>b</sup> mice. These results indicate that the efficacy of Ab2 treatment is genetically controlled and they suggest that it may be H-2-dependent.

To further investigate the putative involvement of H-2 or H-2-linked genes in regulating Ab2-mediated protection, MHC-congenic mice on the BALB/c and B10 backgrounds were used. According to survival rates shown in Fig. 1, reduced survival would be expected in BALB.B (H-2<sup>b</sup>) and BALB.K (H-2<sup>k</sup>) mice, should H-2 or H-2-linked genes be involved. Conversely, introduction of the H-2<sup>d</sup> or H-2<sup>q</sup> haplotypes in mice of the B10 background may reverse their resistance to Ab2-induced protection against MHV-A59 infection. Results of these experiments are reported in Fig. 2. As expected, reduction in survival was observed in Ab2-immunized BALB/c congenic mice expressing the H-2<sup>b</sup> or H-2<sup>k</sup> haplotype. However, the introduction of H-2<sup>q</sup> or H-2<sup>d</sup> haplotype in mice of B10

background was not sufficient to override the failure of Ab2 treatment to protect B10 mice from virus challenge (Fig. 2). These results suggest that the capacity of Ab2 to protect mice against MHV-A59 infection is mainly dependent of genetic elements located outside the MHC complex. However, given an appropriate genetic background, the amplitude of the Ab2-induced antiviral response would likely be regulated by H-2 or H-2-linked gene(s). This conclusion is supported by the observed variations in survival in MHC-congenic mice on the BALB/c background. It remains to be elucidated whether a unique background gene shared by BALB/c, DBA/1, DBA/2 and SWR mice is responsible for the capacity of these mice to respond to Ab2 anti-7-10A. This is however unlikely since mice of these four strains were not protected to the same level following Ab2 vaccination. Further experiments are needed before the genes involved are identified. Testing the Ab2-mediated anti-coronavirus protection in CXB recombinant inbred mice may help to characterize the BALB/c-associated gene.

### **3.3 Induction of antiviral antibodies in Ab2-immunized mice**

To evaluate whether variations in Ab2-mediated protection of mice belonging to different strains correlated with the presence of antiviral antibodies (Ab3), the sera of immunized mice were tested by ELISA and virus neutralization assays for the presence of MHV-A59-specific Ab3. The results presented in Table 1 indicate that mice of any strain in which protection was observed after Ab2 treatment developed significant levels of MHV-A59-reactive and neutralizing Ab3. This suggests an overall link between Ab2-induced antiviral Ab3 and the observed protection of mice from viral challenge. This was confirmed by the Cox's proportional hazards statistical model, where the high serological ELISA response of each mouse was defined as a response higher than the median serological scores specific for responding mice of a given strain. For Ab2-protected mouse strains, the reduction in mortality correlated with a high serological response. Indeed, we observed a 78% reduction in mortality at a *p* value of less than 0.001 for responder strains whereas no significant reduction of mortality was seen in non-responder strains (data not shown).

The ability of Ab3 to neutralize virus infectivity suggests that protection against MHV-A59 observed in Ab2-immunized mice may be mostly due to this property of Ab3. However, careful examination of the data allowed us to identify some differences in titers of neutralizing antibodies in the sera of BALB.B and BALB.K mice that showed the same level of Ab2-induced protection (data not shown). These differences could indicate the possible involvement of other components of the immune response in protection. Such studies are in progress.

#### 4 Concluding remarks

Due to their capacity to induce immune response across species barrier, Ab2 $\beta$  remains undoubtedly the anti-Id of main interest for vaccination against microbial pathogens. However, the present demonstration that rabbit polyclonal Ab2 $\gamma$  anti-Id can induce a protective immunity against coronavirus infection in mice of unrelated inbred strains supports the idea that noninternal image anti-Id may also be considered as good candidates for vaccination against pathogens.

We have reported elsewhere that unlike the Ab2 $\gamma$  used in the present study, another rabbit Ab2 $\gamma$  was inefficient in vaccinating BALB/c mice against lethal MHV-A59 infection [23]. The reasons why a noninternal image Ab2 $\gamma$  induces a protective immunity, whereas another one of the same type raised against a mAb1 with related properties does not, are intriguing. The relative contribution of the different components of the immune network in Ab2-induced vaccination is not yet fully elucidated. It should also be kept in mind that, under certain circumstances, immunization with anti-Id may even be deleterious. Indeed, a significant increase in mortality rather than protection was observed in one of the mouse strains (C3H) used in this study. Similarly, Kennedy *et al.* [24] reported an increase in the pathogenicity of herpes simplex virus following immunization of BALB/c mice with a polyclonal Ab2. Therefore, a better understanding of the interactions between the components of the idiotypic network is certainly needed before anti-Id can be exploited as successful, reproducible and safe alternative vaccines against microbial pathogens.

## **Acknowledgments**

We are grateful to Eduardo Franco and Marie Désy for expert assistance with statistical analyses, to Alain Lamarre for helpful discussions, and to Francine Lambert for excellent technical assistance.

## 5 References

1. Su, S., McNamara Ward, M., Apicella, M. A. and Ward, R. E., *J. Immunol.* 1992. 148: 234.
2. Billetta, R., Hollingdale, M. R. and Zanetti, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991. 88: 4713.
3. Fung, M. S. C., Sun, C. R. Y., Liou, R. S., Gordon, W., Chang, N. T., Chang, T.-W. and Sun, N.-C., *J. Immunol.* 1990. 145: 2199.
4. Fagerberg, J., Steinitz, M., Wigzell, H., Askelöf, P. and Mellstedt, H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995. 92: 4773.
5. Kennedy, R. C., Eichberg, J. W. and Dreesman, G. R., *Virology* 1986. 148: 369.
6. Pohl, C., Renner, C., Schwonzen, M., Sieber, M., Lorenz, P., Pfreundschuh, M. and Diehl, V., *Int. J. Cancer.* 1992. 50: 958.
7. Schick, M. R., Dreesman, G. R. and Kennedy, R. C., *J. Immunol.* 1987. 138: 3419.
8. Kang, C.-Y., Nara, P., Chamat, S., Caralli, V., Chen, A., Nguyen, M.-L., Yoshiyama, H., Morrow, W. J. W., Ho, D. D. and Köhler, H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992. 89: 2546.
9. Kraaijeveld, C. A., Oosterlaken, T. A. M., Snijders, A., Benaissa-Trouw, B. J., Ekstijn, G. L. and Snippe, H., *Antiviral Res.* 1992. 19: 275.
10. Zhou, E.-M., Lohman, K. L. and Kennedy, R. C., *Virology* 1990. 174: 9.
11. Zhou, S.-R. and Whitaker, J. N., *J. Immunol.* 1993. 150: 1629.



12. Yang, Y.-F. and Thanavala, Y., *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1995. 75: 154.
13. Collins, A. R., Knobler, R. L., Powell, H. and Buchmeier, M. J., *Virology* 1982. 119: 358.
14. Körner, H., Schliephake, A., Winter, J., Zimprich, F., Lassmann, H., Sedgwick, J., Siddell, S. and Wege, H., *J. Immunol.* 1991. 147: 2317.
15. Flory, E., Pfeleiderer, M., Stüher, A. and Wege, H., *Eur. J. Immunol.* 1993. 23: 1757.
16. Kubo, H., Yamada, Y. K. and Taguchi, F., *J. Virol.* 1994. 68: 5403.
17. Daniel, C., Anderson, R., Buchmeier, M. J., Fleming, J. O., Spaan, W. J. M., Wege, H. and Talbot, P. J., *J. Virol.* 1993. 67: 1185.
18. Dalziel, R. G., Lampert, P. W., Talbot, P. J. and Buchmeier, M. J., *J. Virol.* 1986. 59: 463.
19. Taguchi, F., Kubo, H., Takahashi, H. and Suzuki, H., *Virology* 1995. 208: 67.
20. Lamarre, A., Lecomte, J. and Talbot, P. J., *J. Immunol.* 1991. 147: 4256.
21. Daniel, C. and Talbot, P. J., *Arch. Virol.* 1987. 96: 241.
22. Armitage, P. and Berry, G., *Statistical methods in medical research.* 2nd Edn., Blackwell Scientific Publications, Oxford 1987.
23. Yu, M. and Talbot, P. J., *Adv. Exp. Med. Biol.* 1995. 380: 165.
24. Kennedy, R. C., Adler-Strothz, K., Burns, J. W., Sr., Henkel, R. D. and Dreesman, G. R., *J. Virol.* 1984.50: 951.

**Table 1:**  
**Induction of specific and neutralizing anti-MHV-A59 Ab3**  
**in protected Ab2-immunized mice**

Mouse strain	H-2 haplotype	No. of mice per treatment <sup>a)</sup>	Corrected ELISA absorbance at 1/500 serum dilution <sup>b)</sup>	Significance of ELISA absorbance value <sup>c)</sup>	Neutralization titer <sup>b)</sup>
BALB/c	d	20	.96 ± .25	<.0001	100 - 675
DBA/2	d	10	.17 ± .20	NS <sup>d)</sup>	< 50 - 125
B10.D2	d	10	.20 ± .15	NS <sup>e)</sup>	< 50
SWR	q	10	.93 ± .53	.0075	< 50 - 725
DBA/1	q	6	.75 ± .10	.0039	500 - 3000
B10.G	q	9	.25 ± .15	NS	< 50
C3H	k	10	.00 ± .01	NS	< 50
CBA	k	6	.02 ± .02	NS	< 50
BALB.K	k	10	.33 ± .19	.0011	< 50 - 50
B6	b	6	.02 ± .04	NS	< 50
B10	b	11	.10 ± .11	NS	< 50
BALB.B	b	10	.70 ± .41	.0019	< 50 - 400

<sup>a)</sup> Groups of identical sizes were immunized with either Ab2 or NR1g

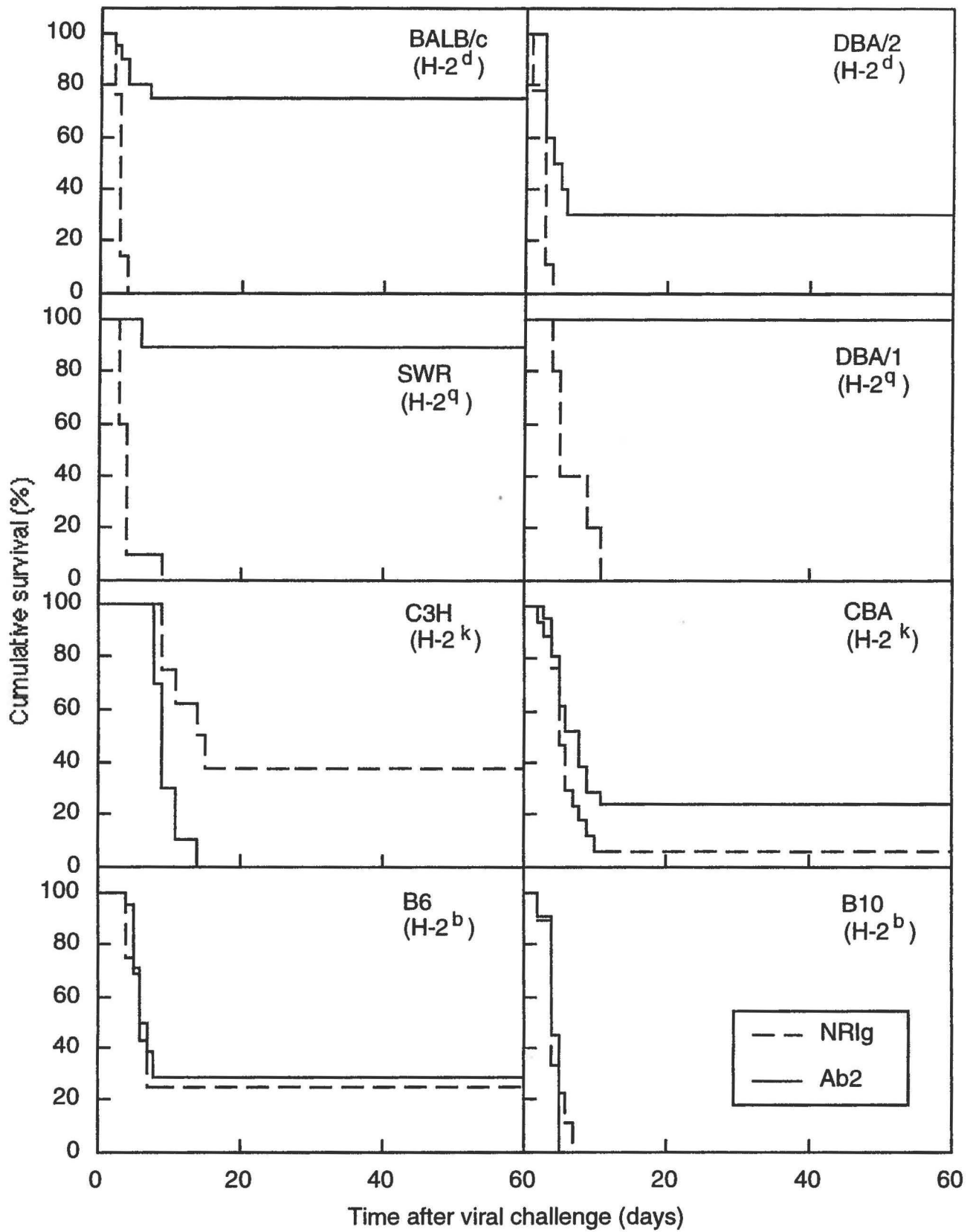
<sup>b)</sup> Sera were assayed by ELISA for binding to virus (absorbance given for Ab2-treated mice; NR1g treatment yielded values that ranged between 0.02 and 0.43) and plaque reduction assays (neutralization titer is the reciprocal of the highest dilution of serum neutralizing 50% of input virus; NR1g treatment yielded titers that were all < 50)

<sup>c)</sup> *p* values from Mann-Whitney test comparing absorbance means at 1/500 dilution of sera between Ab2- and NR1g-treated mice

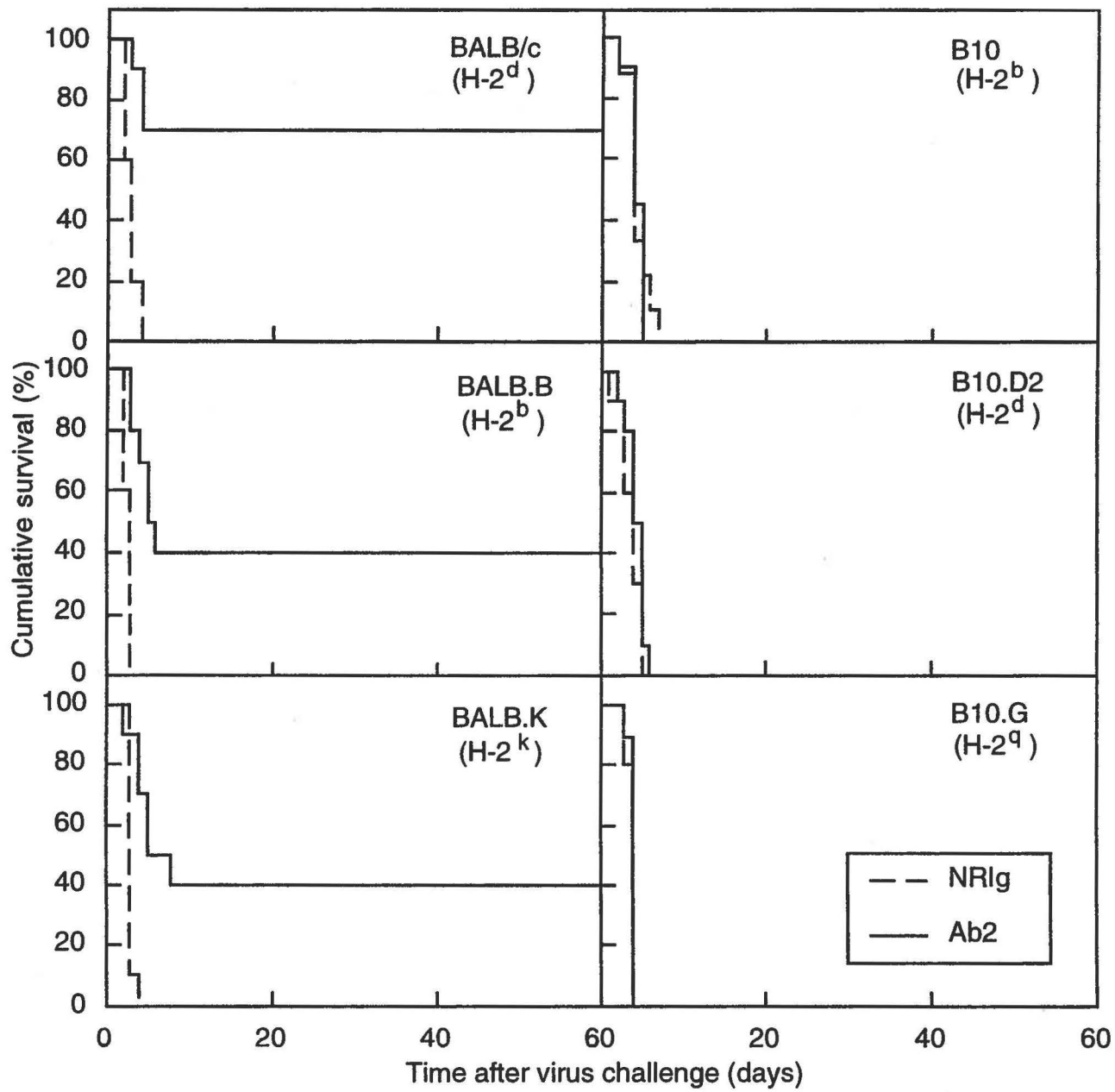
<sup>d)</sup> Even though Ab2-protected DBA/2 mice did not show significant ELISA signals, they did produce Ab3 as shown by neutralization titers

<sup>e)</sup> Not significant

**Figure 1:** Effect of vaccination with Ab2 on survival of mice of different inbred strains to infection with MHV-A59. Groups of 10 mice of different inbred strains were immunized with polyclonal Ab2 or NRIg as described in Materials and Methods, and they were challenged with 10 LD<sub>50</sub> of MHV-A59. Their survival was analyzed by the Kaplan-Meier survival curve procedure, as described in the Materials and Methods section. Comparison of Ab2 and NRIg treatment by Cox's proportional hazards model showed that the reduction in mortality for BALB/c and DBA/1 mice was significant at  $p < 0.001$ , DBA/2 at  $p < 0.05$  and SWR at  $p < 0.01$ . The observed increased mortality for C3H mice was significant at  $p < 0.05$ .



**Figure 2:** Influence of H-2 or H-2-linked genes on survival of MHV-A59 infected Ab2-immunized mice. Groups of 10 MHC-congenic mice on BALB/c and B10 backgrounds were immunized, challenged and evaluated as described in the legend to Figure 1. Comparison of Ab2 and NR1g treatment by Cox's proportional hazards model showed that the reduction in mortality for BALB/c mice was significant at  $p < 0.001$  and for BALB.B and BALB.K mice at  $p < 0.01$ .



## Introduction à l'article II

Alors que la première partie de ce chapitre se proposait de caractériser la réponse immunitaire protectrice générée par l'Ac2 $\gamma$  au niveau génétique, l'objectif poursuivi par cette partie du projet a été de caractériser cette même réponse immunitaire protectrice aux niveaux humoral et cellulaire. Les résultats de ces travaux ont été soumis pour publication.

Afin de déterminer la participation des différents éléments du système immunitaire dans la réponse immunitaire protectrice générée par l'Ac2 $\gamma$ , des transferts passifs de plasmas et des transferts adoptifs de splénocytes de souris immunisées avec l'Ac2 $\gamma$  à des souris non sensibilisées ont été effectués. Un délai dans la mortalité a été observé chez les souris ayant reçu passivement le plasma, alors qu'aucun changement dans le profil d'infection virale n'a été observé chez les souris ayant reçu les splénocytes. Les résultats obtenus ont suggéré que les Ac3 antiviraux possédant une activité de neutralisation virale *in vitro*, seraient directement impliqués dans la réponse immunitaire protectrice observée, tandis que les lymphocytes T joueraient plutôt un rôle d'aide auxiliaire dans l'induction de la protection.

**ARTICLE II**

**CHARACTERIZATION OF PROTECTION AGAINST CORONAVIRUS  
INFECTION BY POLYCLONAL NON-INTERNAL IMAGE  
ANTI-IDIOTYPIC ANTIBODY.**

Mathilde W.N. Yu et Pierre J. Talbot

Laboratoire de neuroimmunovirologie,  
Institut Armand-Frappier, Université du Québec  
Laval, Québec, Canada H7V 1B7

Article soumis pour publication



## Sommaire traduit

Dans une étude précédente, nous avons rapporté que différentes souches de souris avaient été protégées efficacement contre l'infection coronavirale après vaccination avec un Ac2 $\gamma$  non-image interne, reconnaissant spécifiquement un premier AcMo neutralisant et protecteur dirigé contre la glycoprotéine de surface S du virus. Afin d'approfondir la caractérisation des mécanismes impliqués dans l'induction de cette réponse immunitaire protectrice, du plasma et des splénocytes de souris BALB/c immunisées avec l'Ac2 $\gamma$ , ont été transférés passivement à d'autres souris BALB/c non sensibilisées. Suite à l'épreuve virale, un retard dans la mortalité a été observé chez les souris non sensibilisées auxquelles le plasma avait été transféré passivement. Ce résultat, combiné à la présence d'Ac3 possédant la capacité de neutraliser le virus *in vitro*, permet d'identifier la réponse immunitaire humorale comme étant l'élément majeur responsable de la protection. De plus, la prolifération *in vitro* des lymphocytes T de souris immunisées en réponse au virus et à l'anti-Id, ainsi que l'absence de protection observée après transfert adoptif des splénocytes de souris immunisées, suggèrent la participation d'une activité T auxiliaire dans l'induction d'Ac3 neutralisants et protecteurs.

## SUMMARY

We have previously reported protective vaccination of mice against a coronavirus infection using rabbit polyclonal non-internal image Ab2 $\gamma$  anti-idiotypic antibody specific for a virus-neutralizing and protective mAb against the viral surface glycoprotein. To further characterize the mechanisms involved in the induction of protective immunity by this non-internal image anti-Id, plasma and splenocytes from Ab2 $\gamma$ -immunized BALB/c mice were passively transferred to naive BALB/c mice, followed by viral challenge. A reproducible significant delay in mortality observed in mice to which plasma was passively transferred, together with the presence of specific *in vitro* neutralizing antiviral Ab3 identify the humoral immune response as the major element responsible for protection. The activation of specific T lymphocytes by both virus and anti-Id in immunized mice and the absence of adoptive transfer of protection by splenocytes suggests the participation of T helper activity in the induction of protective virus-neutralizing Ab3.

## INTRODUCTION

Murine hepatitis virus (MHV) is an enveloped RNA virus of the *Coronaviridae* family (1). Strain A59 of MHV (MHV-A59) is neurotropic and causes an acute lethal encephalitis that is followed by chronic multiple sclerosis-like demyelination in mice surviving acute disease (2, 3). Among the major viral structural proteins, the surface (S) glycoprotein, which constitutes the spike projections, is responsible for several biological properties of the virus. It mediates attachment to the cellular receptor, cellular membrane fusion (4, 5) and is a major target of the immune response. Virus-neutralizing antibodies have been demonstrated to passively protect against acute infection (6-9), although cell-mediated immunity was also reported to be involved in protection (10-12).

We have been using the coronavirus animal model to characterize the immune modulation properties of the idiotypic network in the context of a viral infection. This network hypothesis of interactions between variable regions of immunoglobulins (13) has led to the concept that internal image anti-idiotypic antibody (anti-Id), which mimics the antigen (Ag), could be used as surrogate Ag to induce a specific immune response, with some success (14-16), including the activation of T lymphocytes (17). We and others have reported that non-internal image anti-Id could also induce protective immunity (18, 19).

In a recent study, we showed that a rabbit polyclonal non-internal image anti-Id, identified as Ab2 $\gamma$  since the Ab2 preparation did not contain detectable internal image activity, induced a protective anti-MHV immune response in genetically different strains of mice (20). This anti-Id, produced by immunization with a virus-neutralizing and protective mAb specific for the viral S glycoprotein, induced specific antiviral antibodies in protected mice, although the importance of these antibodies in protection was not directly evaluated.

We now report studies designed to evaluate the mechanisms involved in protection induced by this non-internal image Ab2 $\gamma$  anti-Id. Our results indicate that the neutralizing antiviral activity in serum of protected animals was an

important element for protection. No complementary biological activities, such as *in vitro* ADCC and ADCMC, were detected in the serum of Ab2 $\gamma$ -immunized mice. Even though a cellular immune response was not directly involved in protection, Ab2 $\gamma$  primed mice to elicit an *in vitro* T cell proliferative response following stimulation with virus and Ab2 $\gamma$ .

## MATERIALS AND METHODS

### *Animals*

Four to 5-week-old MHV-seronegative female BALB/c mice were purchased from Charles River, St-Constant, Québec, Canada.

### *Antibodies*

The production and characterization of a mouse hybridoma secreting neutralizing mAb 7-10A, which is specific for a discontinuous epitope on the S glycoprotein of MHV-A59, was previously described (9). This antibody was purified by standard Protein-A-Sepharose chromatography (21). The preparation and characterization of a polyclonal rabbit anti-Id against mAb 7-10A was described previously (18).

### *Virus, cells and viral production*

The A59 strain of MHV was initially obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD), plaque-purified twice, and passaged four times at a multiplicity of infection of 0.01 on DBT cells as described previously (22). DBT astrocytoma cells induced as described previously (23), were a kind gift of Dr. Michael J. Buchmeier (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA). N-11 mouse microglial cells, immortalized as described previously (24), were a kind gift of Drs. Yves Lombard and Jacques Borg (Université Louis Pasteur de Strasbourg, Illkirch, France).

Persistently infected N-11 cells were obtained by infecting the cells with MHV-A59 at a multiplicity of infection of 0.9. After a 60-min incubation period at 37°C with 5% (v/v) CO<sub>2</sub>, the cells were washed twice with 10 ml of phosphate-buffered saline (PBS), and 10 ml of RPMI medium supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS) were then added. The infected cells were incubated at 37°C with 5% (v/v) CO<sub>2</sub> for 2 days before being passaged. Cells were tested at each passage for production of infectious virus by plaque assay, as described

previously (22). Virus production levels varied between  $3 \times 10^4$  and  $2 \times 10^7$  PFU/ml.

#### *Protection assay*

Two groups of 6 BALB/c mice were injected intraperitoneally, six hours before viral challenge, with plasma in quantity equivalent to plasma from 1.2 mice previously immunized with either Ab2 $\gamma$  or normal rabbit immunoglobulins (NRIg). Two other groups of 6 mice were injected intravenously, one hour before viral challenge, with  $10^8$  splenocytes, prepared as described below, from mice previously immunized with Ab2 $\gamma$  or NRIg (18). Finally, two other groups of 3 mice were injected with both plasma and splenocytes before viral challenge.

Viral challenge consisted in an intracerebral injection of  $5 \times 10^5$  PFU (10 LD<sub>50</sub>) of MHV-A59. This viral dose reproducibly yielded 100% mortality by 5 days after infection. Survival was evaluated and its significance was calculated using the log rank test (25).

Splenocytes used for adoptive transfer were prepared as follows. Spleens were collected from Ab2 $\gamma$  or NRIg-immunized BALB/c mice, ten days after the last boost, and teased apart with tweezers. After filtration through a nylon net, splenocytes were centrifuged at  $200 \times g$  for 10 min and red blood cells were lysed with 6 ml of 0.16 M ammonium chloride (Anachemia Canada Inc., Montréal, Québec, Canada) and 10 mM HEPES (Canadian Life Technologies, Inc., Burlington, Canada). After 10 min incubation on ice, splenocytes were washed twice in RPMI medium supplemented with 2% (v/v) FCS and counted.

### *Antibody-Dependent Complement-Mediated Cytotoxicity*

Approximately  $1.5 \times 10^7$  N11 cells persistently infected with MHV-A59 were labeled with 600  $\mu\text{Ci}$  of sodium chromate ( $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ , ICN Pharmaceuticals Canada Ltd., Montréal, Québec, Canada) for 18 h at  $37^\circ\text{C}$  with 5% (v/v)  $\text{CO}_2$ . Labeled target cells were then washed four times with Hank's balanced sodium salts (HBSS) (Canadian Life Technologies) and detached from the culture flask by adding 0.4 mM ethylene diamine tetracetic acid, tetrasodium salt (EDTA) (Anachemia Canada Inc.) and incubating for 5 min.

Target cells ( $10^4$ /well) were seeded in flat-bottomed 96-well plates and allowed to bind to the plastic for 2 h at  $37^\circ\text{C}$ . The medium was then aspirated and serial three fold dilutions of mouse plasma were added in triplicate to the target cells. After incubation for 1 h at  $37^\circ\text{C}$ , the antibodies were aspirated and 100  $\mu\text{l}$ /well of rabbit complement (Pel-Freez, Rogers, Arkansas, USA) were added and allowed to react for 45 min at  $37^\circ\text{C}$ . For determination of spontaneous and maximum release, medium or 5% (v/v) Triton X-100 was added to the wells, respectively. After the incubation, 100  $\mu\text{l}$ /well of RPMI without FCS were added. The cells were then centrifuged at  $200 \times g$  for 8 min and 150  $\mu\text{l}$  of supernatant was collected and counted for radioactivity in a Beckman Gamma 7000 counter (Beckman Instruments Canada Inc., Mississauga, Ontario, Canada). A mAb against ICAM-1 was used as a positive control mAb (YN1/1.7.4, CRL 1818; ATCC). It was a kind gift of Dr. Yves St-Pierre (Institut Armand-Frappier). Results are expressed as percent specific release:

$$100 \times \frac{(\text{cpm experimental} - \text{cpm spontaneous})}{(\text{cpm maximum} - \text{cpm spontaneous})}$$

### *Antibody Dependent cell-Mediated Cytotoxicity*

Serial three fold dilutions of mouse de complemented plasma were diluted in quadruplicate in flat-bottomed 96-well plates for a final volume of 50  $\mu\text{l}$  per well. Ten thousand target cells/well (50  $\mu\text{l}$ ), prepared as described above, were added to the diluted sera and the mixture was incubated for 1 h at  $37^\circ\text{C}$ . One hundred microliter containing  $10^6$  splenocytes from BALB/c mouse were then added to each well containing the mixture of target cells and sera. Plates were

centrifuged at 200 x g for 5 min. For determination of spontaneous and maximum release, medium or 5% (v/v) Triton X-100 were added to the wells, respectively. Plates were incubated for 6 h at 37°C with 5% (v/v) CO<sub>2</sub>. At the end of the incubation period, plates were centrifuged at 200 x g for 5 min and 150 µl of supernatant were collected and counted for radioactivity and the results expressed as described above.

*Ab2-induced cellular proliferation.*

Lymphocytes from immunized mice were obtained from inguinoaxillary and axillary lymph nodes (draining the site of immunization), 10 days after two subcutaneous immunizations with either 100 µg of Ab2 or MHV-A59-infected cell lysates performed at 10-day intervals. Lymph nodes were dissociated, washed twice and placed in 96-well flat bottom microtiter plates by adding 5 x 10<sup>5</sup> cells per well, along with various antigens. The specific and control antigens were 0.1 µg ConA, 10 µg infected and non-infected cell lysate, 100 µl supernatant of infected cells and 10 µg of Ab2 or NR1g per well. Cultures were maintained at 37°C supplemented with 5% (v/v) CO<sub>2</sub> for 4 days. Eighteen hours before harvesting, 1 µCi [<sup>3</sup>H]thymidine (ICN Pharmaceuticals, Inc., Irvine, CA) was added to each well. Cells were harvested onto glass microfiber filter paper (Skatron Instruments Inc., Sterling, VA) on a 96-well Skatron model 11050 Micro cell harvester and counted in 5 ml of Ecolite (+) scintillation fluid (ICN), using a Canberra Packard Tri-Carb 2200A scintillation counter. Tests were run in triplicate. A stimulation index was calculated for each triplicate assay by dividing the mean radioactivity of stimulated cells by that of unstimulated cells. A value of at least 3.0 is considered significant.

Viral antigens used in these assays were prepared from DBT cells infected with MHV-A59 at an MOI of 1 at 37°C for 11 h. Control antigens were prepared from parallel cultures of uninfected DBT cells. Infected and non-infected adherent cells were washed twice with 10 ml of PBS pH 7.4 and frozen at -90°C overnight in 3 ml of PBS pH 7.4. The cells were thawed at 37°C and detached from the plastic. The pooled cells were sonicated (BraunSonic 2000) 2 x 1 min with 0.5 min delay between the sonications, centrifuged at 500 x g for 10 min and stored in aliquots at -90°C. Before use, infectious virus in the viral preparation was inactivated by exposure to ultraviolet light (Ultraviolet



illuminator, Model 3-3000, Fotodyne, New Berlin, WI, USA) for 10 min.

#### *Virus neutralization assay*

Serial three fold dilutions of mouse plasma were incubated in tubes with approximately 80 plaque-forming units (PFU) of MHV-A59 for 60 min at 37°C. The mixtures were transferred in duplicate onto 12-well plates (ICN) containing confluent monolayers of DBT cells. After a 60-min incubation at 37°C with 5% (v/v) CO<sub>2</sub>, the virus-antibody mixtures were removed and the cells were overlaid with 1.5% (w/v) Bacto-Agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) in Earle's minimal essential media/Hanks' M199 (1:1 (v/v)) (Canadian Life Technologies Inc.) supplemented with 5% (v/v) FCS and 50 µg/ml gentamicin (Canadian Life Technologies, Inc.). The plates were incubated for 48 h at 37°C with 5% (v/v) CO<sub>2</sub>. The cells were then fixed with 25% (v/v) formalin and stained with 0.1% (w/v) crystal violet. Plaques were counted visually and viral neutralization titers expressed as the reciprocal of the plasma dilution that neutralized 50% of viral input. A known virus-neutralizing mAb was used as positive control.

## RESULTS

We have previously reported that a polyclonal non-internal image anti-Id antibody induced antiviral antibodies that correlated with protection of mice from a normally lethal viral challenge (20). Data obtained with MHC-congenic mice supported the conclusion that both H-2- and non-H-2-dependent gene factors were involved in anti-coronavirus vaccination with Ab2 $\gamma$ . To further characterize protective immune responses induced by this non-internal image anti-Id, we wanted to identify the major elements involved in antiviral protection and to determine whether mechanisms other than direct antibody-mediated virus neutralization were involved.

To characterize the possible involvement of humoral and/or cellular components in the protective immune response, plasma and/or splenocytes of immunized BALB/c mice were transferred into naive BALB/c mice before a normally lethal intracerebral challenge with 10 LD<sub>50</sub> of MHV-A59. Results are shown in Fig. 1. Mice that received plasma, splenocytes, or both from mice immunized with normal rabbit immunoglobulins (NRIg) died within 4 days after the viral challenge. However, a statistically significant and reproducible delay in mortality ( $p < 0.001$ ) was observed with naive mice that received a passive transfer of serum from Ab2 $\gamma$ -immunized mice. This significant three-day delay in mortality suggests the important role played by plasma components in protection against infection by this coronavirus. A small and reproducible delay in mortality was also observed in mice that received a combination of plasma and lymphocytes, although statistical significance was not achieved. No difference in mortality was observed for mice that received an adoptive transfer of splenocytes from Ab2 $\gamma$ -immunized BALB/c mice, suggesting that these cells were not directly involved in protection.

Immunization of mice with Ab2 $\gamma$  led to the production of virus-neutralizing Ab3. Virus neutralization activity was observed with titers ranging between 100 and 3000 in different strains of mice (18, 20 and data not shown). We also characterized antibody-mediated activities that may contribute viral neutralization, such as Ab-dependent complement-mediated cytolysis (ADCMC)

and Ab-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). These two biological activities were evaluated using N-11 target cells infected persistently but without cytopathology by MHV-A59. Plasma from Ab2 $\gamma$ -protected BALB/c, DBA/1, DBA/2 and SWR mice (20) were tested. No ADCC or ADCMC activities were detected in Ab2 $\gamma$ -immunized mice, using plasma dilutions as low as 1/50 for ADCC and 1/10 for ADCMC (data not shown). On the other hand, a control anti-ICAM-1 mAb in the ADCMC assay, showed 66% of lysed target cells in presence of 5  $\mu$ g of mAb (data not shown). Overall, these results suggest that the virus neutralization activity of Ab3 may be the principal humoral mechanism involved in Ab2 $\gamma$ -induced protection.

Even though adoptive transfer studies suggested that splenocytes of Ab2 $\gamma$ -immunized mice had no direct cytotoxic antiviral activity, we examined the participation of specific antiviral T lymphocytes in the observed Ab-mediated protection. To investigate the induction of specific cellular antiviral responses to polyclonal Ab2 $\gamma$ , BALB/c mice were primed *in vivo* with Ab2 $\gamma$  or NR1g. Cells from lymph nodes of Ab2 $\gamma$ -immunized BALB/c mice were used in an *in vitro* proliferation assay. These cells were stimulated *in vitro* with various concentrations of Ab2 $\gamma$ , NR1g, virus or with medium alone. As shown in Fig. 2, lymph node cells from Ab2 $\gamma$ -immunized mice proliferated strongly in the presence of Ab2 $\gamma$ , as expected, with a stimulation index of 29.5. Interestingly, these cells also proliferated in the presence of virus, with a significant stimulation index of 4.2. When lymph node cells of virus-immunized mice were stimulated with Ab2 $\gamma$ , we observed significant proliferation, with a stimulation index of 6.7. As expected these cells also proliferated strongly in the presence of virus. In this proliferation assay, virus supernatant showed a better stimulation capability than the infected cell lysate. This could be explained by toxicity generated from the cell lysate. This observed immune T cell cross-reactivity suggests a role for T lymphocytes in the induction of specific neutralizing Ab3 by non-internal image Ab2 $\gamma$ -immunized mice.

## DISCUSSION

We have previously reported that a non-internal image polyclonal Ab<sub>2</sub>γ induced a specific antiviral protective immune response in different strains of mice and that this response was genetically controlled (18, 20). In the present study, we provide evidence that is consistent with direct antibody-mediated neutralization representing the major protective immune response mechanism in protective vaccination by this non-internal image Ab<sub>2</sub>γ. This is based on a reproducible and significant delay in mortality observed in naive BALB/c mice that received a passive transfer of plasma from Ab<sub>2</sub>γ-immunized BALB/c mice, which contained *in vitro* neutralizing antibodies. We have previously shown that anti-Id immunization of BALB/c mice yielded complete protection of about 80% of animals (18, 20). The fact that such a level of protection was not reproduced by passive plasma transfer may simply reflect the availability of lower quantities of protective antibodies in the target tissues.

Antiviral antibodies play an important role in the outcome of acute coronavirus disease in mice. Indeed, mAb against the S glycoprotein modulated MHV-JHM infection of mice from acute lethal encephalitis to chronic demyelinating disease (7). Moreover, neutralizing but also non-neutralizing specific antiviral mAb were shown to passively protect against lethal infection of mice (26). We previously demonstrated that mice immunized with affinity-purified S glycoprotein were protected from lethal encephalitis and developed high titers of neutralizing antibodies that correlated with protection (7).

Other Ab-mediated immune mechanisms were also reported to be activated upon infection of mice with coronaviruses. For example, C57BL/6 mice were shown to be high responders in the production of complement-fixing antibody compared to other strain of mice (26). However, the presence of these antibodies did not correlate with protection (26). Also, we have reported that peptide vaccination against murine coronavirus acute infection may be mediated by non-neutralizing antibodies (27). Thus, the antibody-dependent complement-mediated cytolysis and the antibody-dependent cell cytotoxicity were tested with the plasma of Ab<sub>2</sub>γ-vaccinated BALB/c, DBA/1, DBA/2 and

SWR mice. As we have reported elsewhere, these strains of mice are protected against coronaviral infection by immunization with Ab2 $\gamma$  (20). No such Ab-mediated activities could be detected with the Ab2 $\gamma$ -induced antiviral Ab3. Unfortunately, we could not verify the presence of complement-fixing antibodies in C57BL/6 mice since they were not protected against the infection and did not produce detectable antiviral antibodies (20).

After adoptive transfer of splenocytes from Ab2 $\gamma$ -immunized mice, no protection against lethal acute viral infection was observed, suggesting that the cellular immune response of Ab2 $\gamma$ -immunized mice did not mediate direct antiviral cytotoxic activity. Cellular immune responses were reported to be important in protection against murine coronavirus infection. CD4<sup>+</sup> T cells with cytotoxic activity protected mice when adoptively transferred to naive mice (10, 28, 29). Furthermore, it was demonstrated that internal image anti-Id was able to induce an Ag-specific cellular immune response (17, 30, 31). In the current study, lymph node cells significantly proliferated in response to viral Ag and Ab2 $\gamma$  (Fig. 2). This immune T cell cross-reactivity suggests the participation of a cellular immune response of the helper type for T-dependent induction of antiviral antibodies by anti-Id.

In summary, plasma of Ab2 $\gamma$ -immunized BALB/c mice was identified as the major humoral component involved in the protective immune response against coronavirus infection. Furthermore, the principal humoral mechanism used is probably the virus neutralization activity of specific antiviral Ab3 induced by the collaboration of helper T cell-mediated immune response. Thus, our results are consistent with a T-dependent production of neutralizing and protective antiviral antibodies after immunization of some strains of mice with a non-internal image anti-Id. However, more studies are needed with other protective anti-Id in order to better understand the interactions between the different elements of the immune system before being able to manipulate safely the idiotypic network to modulate a viral infection.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant MT-9203 from the Medical Research Council of Canada to P.J.T. and a studentship from the *Fonds pour la formation et l'aide à la recherche du Québec* to M.W.N.Y. A senior scholarship award from the *Fonds de la recherche en santé du Québec* to P.J.T. is gratefully acknowledged.

## REFERENCES

1. Holmes K.V. & Lai M.M.C. (1996) *Coronaviridae: the viruses and their replication*. In: *Fields Virology* (eds. B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley *et al.*, Third edition, p.1075, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
2. Cheever F.S., Daniels J.B., Pappenheimer A.M. & Bailey O.T. (1949) A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. I. Isolation and biological properties of the virus. *J. Exp. Med.* **90**,181.
3. Weiner L.P. (1973) Pathogenesis of demyelination induced by mouse hepatitis virus (JHM virus). *Arch. Neurol.* **28**,298.
4. Collins A.R., Knobler R.L., Powell H. & Buchmeier M.J. (1982) Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for attachment and cell-cell fusion. *Virology* **199**,358.
5. Sturman L.S., Ricard C.S. & Holmes K.V. (1985) Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus: activation of cell-fusing activity of virions by trypsin and separation of two different 90 K cleavage fragments. *J. Virol.* **56**,904.
6. Talbot P.J., Salmi A.A., Knobler R.L. & Buchmeier M.J. (1984) Topographical mapping of epitopes on the glycoproteins of murine hepatitis virus-4 (strain JHM): Correlation with biological activities. *Virology* **132**,250.
7. Buchmeier M.J., Lewicki H.A., Talbot P.J. & Knobler R.L. (1984) Murine hepatitis virus-4 (strain JHM) induced neurologic disease is modulated in vivo by monoclonal antibody. *Virology* **175**,548.
8. Wege H., Dörries R. & Wege H. (1984) Hybridoma antibodies to the murine coronavirus JHM: Characterization of epitopes on the peplomer protein (E2). *J. Gen. Virol.* **65**,1931.

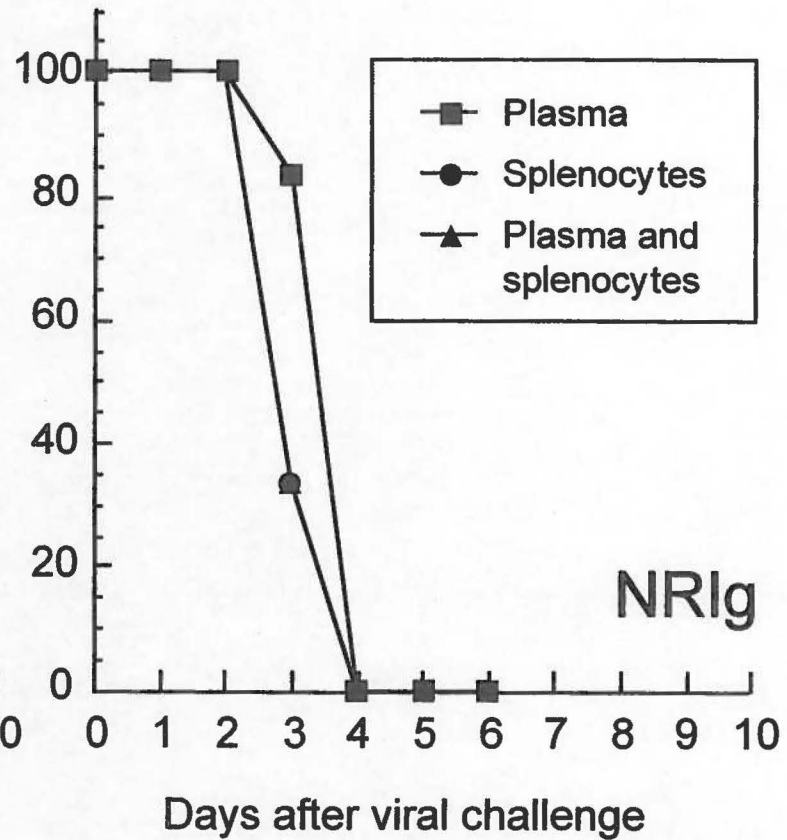
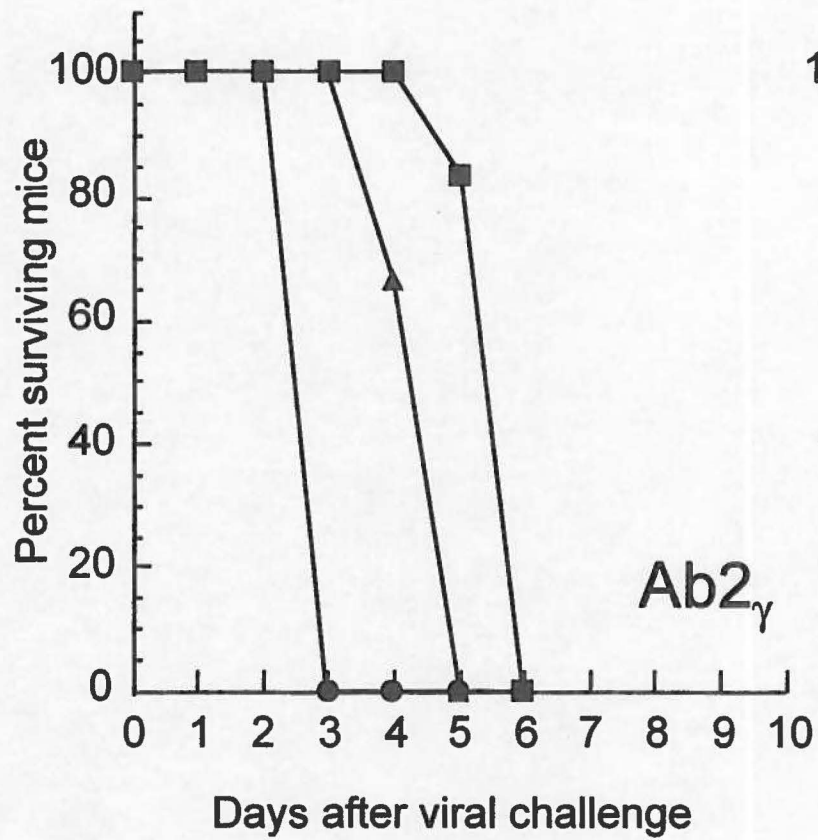
9. Daniel C. & Talbot P.J. (1990) Protection from lethal coronavirus infection by affinity-purified spike glycoprotein of murine hepatitis virus, strain A59. *Virology* **174**,87.
10. Stohlman S.A., Matsushima G.K., Casteel N. & Weiner L.P. (1986) In vivo effects of coronavirus-specific T cell clones: DTH inducer cells prevent a lethal infection but do not inhibit virus replication. *J. Immunol.* **136**,3052.
11. Yamaguchi K., Goto N., Kyuwa S., Hayami M. & Toyoda Y. (1991) Protection of mice from a lethal coronavirus infection in the central nervous system by adoptive transfer of virus-specific T cell clones. *J. Neuroimmunol.* **32**,1.
12. Stohlman S.A., Bergmann C.C., van der Veen R.C. & Hinton D.R. (1995) Mouse hepatitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes protect from lethal infection without eliminating virus from the central nervous system. *J. Virol.* **69**,684.
13. Jerne N.K. (1974) Towards a network theory of the immune system. *Ann. Immunol.* **125C**,373.
14. Su S., Ward M. M., Apicella M.A. & Ward R.E. (1992) A nontoxic, idiotope vaccine against gram-negative bacterial infections. *J. Immunol.* **148**,234.
15. Billeta R., Hollingdale M.R. & Zanetti M. (1991) Immunogenicity of an engineered internal image antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**,4713.
16. Fung M.S.C., Sun C.R.Y., Liou R.S., Gordon W., Chang N.T., Chang S.-W. & Sun N.-C. (1990) Monoclonal anti-idiotypic antibody mimicking the principal neutralization site in HIV-1 GP120 induces HIV-1 neutralizing antibodies in rabbits. *J. Immunol.* **145**,2199.

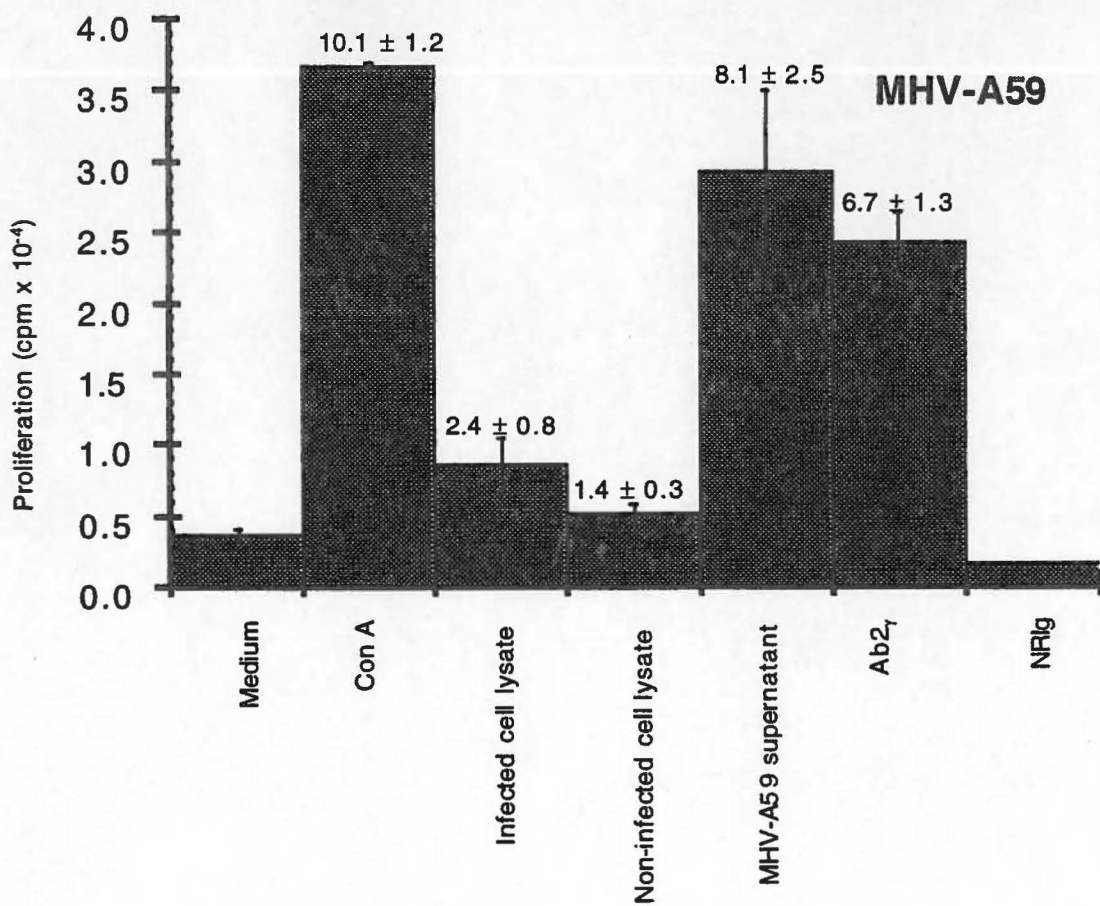
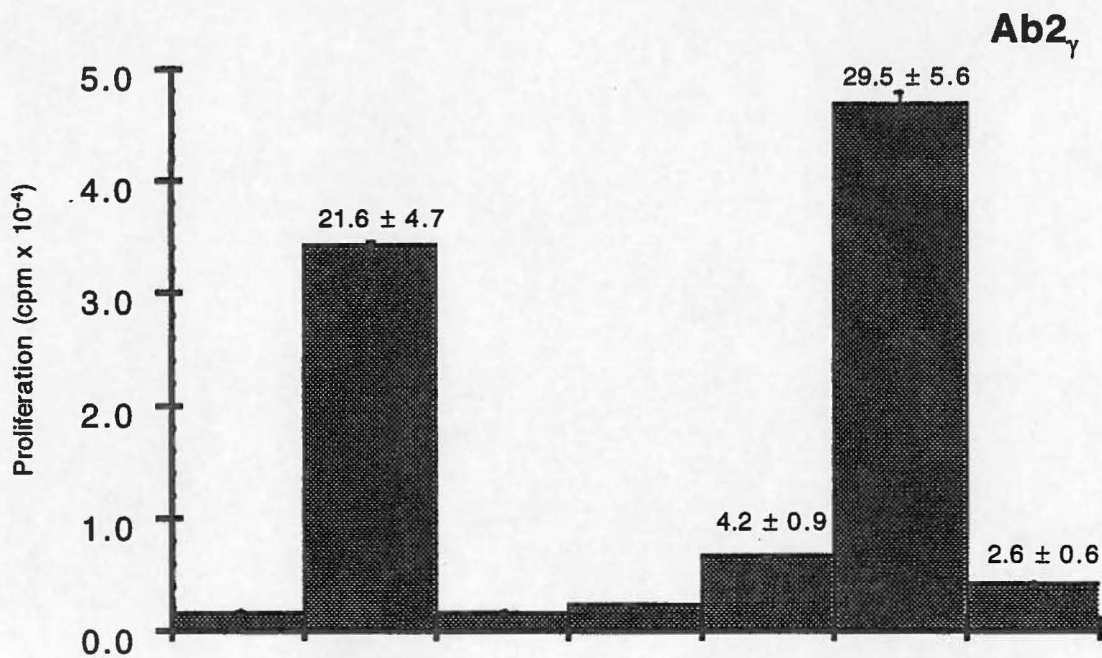


17. Fagerberg J., Steinitz M., Wigzell H., Askelöf P. & Mellstedt H. (1995) Human anti-idiotypic antibodies induced a humoral and cellular immune response against a colorectal carcinoma-associated antigen in patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**,4773.
18. Lamarre A., Lecomte J. & Talbot P.J. (1991) Antiidiotypic vaccination against murine coronavirus infection. *J. Immunol.* **147**,4256.
19. Yu M. & Talbot P.J. (1995) Induction of a protective immune response to murine coronavirus with non-internal image anti-idiotypic antibodies. *Adv. Exp. Med. Biol.* **380**,165.
20. Yu M.W.N., Lemieux S. & Talbot P.J. (1996) Genetic control of anti-idiotypic vaccination against coronavirus infection. *Eur. J. Immunol.* **26**,3230.
21. Manil I., Motté P., Pernas P., Troalen F., Bohuon C. & Bellet D. (1986) Evaluation of protocols for purification of mouse monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods* **90**,25.
22. Daniel C. & Talbot P.J. (1987) Physico-chemical properties of murine hepatitis virus, strain A-59. *Arch. Virol.* **96**,241.
23. Kumanishi T. (1967) Brain tumors induced with Rous Sarcoma virus, Schmidt-Ruppin strain. I. Induction of brain tumors in adult mice with Rous chicken sarcoma cells. *Jap. J. Exp. Med.* **37**,461.
24. Lutz M.B., Granucci F., Winzler C., Marconi G., Paglia P., Foti M., Aßmann C.U., Cairns L., Rescigno M. & Ricciardi-Castagnoli P. (1994) Retroviral immortalization of phagocytic and dendritic cell clones as a tool to investigate functional heterogeneity. *J. Immunol. Meths* **174**,269.
25. Armitage P. & Berry G. (1987) *Statistical methods in medical research*. p.429. 2nd Edn., Blackwell Scientific Publications, Oxford.
26. Nakanaga K., Yamanouchi K. & Fujiwara K. (1986) Protective effect of monoclonal antibodies on lethal mouse hepatitis virus infection in mice. *J. Virol.* **59**,168.

27. Daniel C., Lacroix M. & Talbot P.J. (1994) Mapping of linear antigenic sites on the S glycoprotein of a neurotropic murine coronavirus with synthetic peptides: a combination of nine prediction algorithms fails to identify relevant epitopes and peptide immunogenicity is drastically influenced by the nature of the protein carrier. *Virology* **202**,540.
28. Heemskerk M.H.M., Schoemaker H.M., Spaan W.J.M. & Boog C.J.P. (1995) Predominance of MHC class II-restricted CD4<sup>+</sup> cytotoxic T cells against mouse hepatitis virus A59. *Immunol.* **84**,521.
29. Körner H., Schliephake A., Winter J., Zimprich F., Lassmann H., Sedgwick J., Siddell S. & Wege H. (1991) Nucleocapsid or spike protein-specific CD4<sup>+</sup> T lymphocytes protect against coronavirus-induced encephalomyelitis in the absence of CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol.* **147**,2317.
30. Durrant L.G., Doran M., Austin E.B. & Robins R.A. (1995) Induction of cellular immune responses by a murine monoclonal anti-idiotypic antibody recognizing the 791Tgp72 antigen expressed on colorectal, gastric and ovarian human tumours. *Int. J. Cancer* **6**,62.
31. Yang Y.-F. & Thanavala Y. (1995) A comparison of the antibody and T cell response elicited by internal image and noninternal image anti-idiotypes. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **75**,154.

**Figure 1:** Protection assay illustrating the involvement of plasma components in Ab2 $\gamma$ -mediated vaccination of mice. In a first group of BALB/c mice, plasma from Ab2 $\gamma$  or NR1g-immunized mice was passively transferred to six naive BALB/c mice. In a second group of mice, splenocytes from Ab2 $\gamma$  or NR1g-immunized mice were adoptively transferred to six other naive mice. In a third group of mice, plasma and splenocytes from Ab2 $\gamma$  or NR1g-immunized mice were transferred together into three naive mice. Mice were then challenged with 10 LD<sub>50</sub> of MHV-A59. The statistical significance of the delays in mortality were analyzed by the log rank test and only passive transfer of plasma was determined to be statistically significant ( $p < 0.001$ ). The results presented are representative of two separate experiments, with very similar results.





**Figure 2:** Proliferation of lymph nodes cells from mice immunized with polyclonal Ab2 $\gamma$  (top panel) or MHV-A59 (bottom panel). Lymph node cells were stimulated *in vitro* with either 0.1  $\mu$ g/well of concanavalin A, 10  $\mu$ g/well of infected or non-infected cell lysates, or 10  $\mu$ g/well of Ab2 $\gamma$  or NRlg. Cells were harvested after 4 days of culture and the incorporation of [ $^3$ H] thymidine was quantitated. The stimulation index was calculated for each triplicate by dividing the mean radioactivity of stimulated cells by that of unstimulated cells, and is shown at the top of each box. The results presented are representative of two separate experiments, with very similar results.

**CHAPITRE 3:**

**PRODUCTION ET CARACTERISATION D'ANTICORPS ANTI-  
IDIOTYPIQUES CONTRE L'INFECTION CORONAVIRALE**

### Introduction à l'article III

Comme il a été démontré dans le chapitre précédent, un anticorps anti-idiotypique ne possédant pas la propriété de mimétisme antigénique a été capable de générer une réponse immunitaire protectrice. Les mécanismes de protection induit par l'Ac<sub>2</sub> $\gamma$  ont été étudiés. Cependant, ces anticorps polyclonaux de lapin ne permettent pas d'identifier les mécanismes d'action précis puisqu'ils sont en fait un mélange d'anticorps différents. Par conséquent, dans le but d'approfondir l'étude des mécanismes de protection par cet Ac<sub>2</sub> $\gamma$ , nous avons choisi de produire des AcMo<sub>2</sub> ayant les caractéristiques biologiques de l'Ac<sub>2</sub> $\gamma$ . Ces travaux devraient être publiés prochainement.



**ARTICLE III**

**PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL  
ANTI-IDIOTYPIC ANTIBODIES AGAINST A NEUTRALIZING AND  
PROTECTIVE MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC TO A  
NEUROTROPIC CORONAVIRUS.**

**Mathilde W.N. Yu and Pierre J. Talbot\***

**Laboratory of Neuroimmunovirology,  
Institut Armand-Frappier, Université du Québec  
Laval, Québec, Canada H7V 1B7.**

**Article prochainement soumis pour publication.**

## Sommaire traduit

Nous avons précédemment décrit la production d'un Ac2 $\gamma$  polyclonal protecteur, spécifique à un AcMo1 7-10A neutralisant et protecteur (Lamarre *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1996). Des AcMo2 spécifiques au même AcMo1 7-10A ont été générés et caractérisés afin d'obtenir des anticorps mieux définis permettant d'élucider de façon plus fine, les mécanismes d'induction de la protection. Plusieurs AcMo2 $\gamma$  ont été produits, mais ils n'ont pas protégé les souris BALB/c contre l'infection létale par le coronavirus murin.

**ABSTRACT**

We have previously reported the production of a protective polyclonal non-internal image Ab2 $\gamma$  against a neutralizing and protective mAb1 7-10A (Lamarre *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1996). In order to obtain more defined monoclonal reagents for a better understanding of anti-I<sub>d</sub>-induced protection, mAb2 were generated against the same mAb1 7-10A and characterized. We report the generation of mAb2 of the  $\gamma$  type. However, unlike the polyclonal Ab2 $\gamma$ , they were not capable of inducing a protective immune response.

## INTRODUCTION

Anti-idiotypic antibodies (anti-Id) are antibodies that recognize the antigenic determinants or idiotopes in the variable regions of another antibody. Anti-idiotypic antibodies that bind near the antigen-binding region or the paratope are called Ab2 $\gamma$ , far from the paratope, Ab2 $\alpha$ , and those that bind to the paratope and carry the internal image of the antigen are called Ab2 $\beta$ . By their capacity to molecularly mimic the antigen, the Ab2 $\beta$  has been used successfully as vaccine in different animal models. Several studies have reported an induction of protective immunity with internal image anti-Id against various pathogens (Su *et al.*, 1992; Billetta *et al.*, 1991; Fung *et al.*, 1990). However, the potential of non-internal image anti-Id to induce a specific immune response was also reported. For example, Ab2 $\alpha$  could induce an anti-hepatitis B surface antigen response (Schick *et al.*, 1987), neutralizing antibodies against HIV (Zhou *et al.*, 1990) and a partial protective immune response against the murine coronavirus infection with an induction of specific antiviral antibodies (Yu and Talbot, 1995).

Furthermore, we had previously reported the production of a polyclonal non-internal image Ab2 $\gamma$  against a neutralizing and protective mAb1 7-10A (Lamarre *et al.*, 1991). This Ab2 $\gamma$  was able to successfully vaccinate four different strains of mice. Antiviral Ab3 that neutralize the murine coronavirus *in vitro* were also detected in mice that survived the lethal infection (Yu *et al.*, 1996). In order to obtain more defined monoclonal reagents for a better understanding of anti-Id-induced protection, mAb2 were also generated against the neutralizing and protective antiviral mAb1 7-10A used to produce the polyclonal Ab2 $\gamma$  and characterized.

In the present study, we describe the production of monoclonal anti-idiotypic antibodies against a mAb 7-10A that was previously shown to induce the production of a protective non-internal image polyclonal Ab2 $\gamma$  in rabbit.

## MATERIALS AND METHODS

### *Animals*

Four to 5-week-old MHV-seronegative female BALB/c mice were purchased from Charles River, St-Constant, Québec, Canada.

### *Monoclonal antibodies*

The production and characterization of a mouse hybridoma secreting the neutralizing mAb 7-10A, which is specific for a discontinuous epitope on the S glycoprotein of MHV-A59, was previously described (Daniel *et al.*, 1990). This antibody was purified by standard Protein-A-Sepharose chromatography (Manil *et al.*, 1986).

### *Virus, cells and viral production*

The A59 strain of MHV was initially obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD), plaque-purified twice, and passaged four times at a multiplicity of infection of 0.01 on DBT cells, as described previously (Daniel *et al.*, 1987). DBT astrocytoma cells induced as described previously (Kumanishi, 1967), were a kind gift of Dr. Michael J. Buchmeier (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA).

### *Immunizations and cell fusions*

Four BALB/c mice were immunized intraperitoneally with 100 µg of mAb 7-10A coupled to KLH and emulsified in complete Freund's adjuvant (1:1 (v/v)) for the first injection. For the two subsequent booster doses, mice were immunized with 50 µg of mAb 7-10A using incomplete Freund's adjuvant (1:1 (v/v)) at two-week intervals. Three days before fusion, 100 µg of mAb 7-10A in PBS pH 7.4 were injected intravenously. Mice were sacrificed and spleen cells fused with P3X63-AG8.653 non-secreting mouse myeloma cells (ATCC) at a ratio of 5:1, using polyethylene glycol 1450 (Eastman Kodak Company,

Rochester, NY). The fusion technique used was described previously (Daniel *et al.*, 1990), except that spleen macrophages were eliminated by adherence to a 150 mm plastic petri dish (Canadian Life Technologies) in RPMI medium containing 10% FCS, 1 mM sodium pyruvate, 2.5 mg/ml fungizone, 50 mg/ml gentamycin (Canadian Life Technologies, Inc.) for 1 h at 37°C. The non-adherent cells were washed off with 10 ml of warm medium. After fusion, the culture medium was supplemented with 10% (v/v) of BM-Condimed<sup>®</sup> H1 hybridoma cloning supplement (Boehringer Mannheim Canada, Laval, Québec) and 50 nM of  $\beta$ -mercaptoethanol (BioRad Laboratories (Canada) Ltd., Mississauga, Ontario).

#### *Isotype determination*

The immunoglobulin isotype was determined by a double immunodiffusion assay (Bailey, 1984). Five ml of 1 % (w/v) Seakem agarose gel (FMC Bioproducts, Rockland, ME) in PBS pH 7.4 was melted and then solidified on 5 cm x 5 cm glass plates (thickness of approximately 2.5 mm) . A central hole of 3 mm diameter was punched in the agarose gel surrounded by 5 others holes. Thirty microliters of mAb2 hybridoma supernatant were added in the central hole, and 10  $\mu$ l of specific antiserum to IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA and IgM (Cappel, Organon Teknika, West Chester, PA) in the other holes. Plates were incubated at 37°C for 18 h until precipitation bands were visible.

#### *ELISA for determination of mAb2 specificity*

Ninety six well-microtiter plates (ICN Pharmaceuticals Canada Ltd.) were coated with 60 ng/well of purified F(ab')<sub>2</sub> fragments of mAbs 7-10A and B35 (the latter used as an isotypic control) and KLH. The plates were incubated for 16 h at room temperature. Then, the plates were blocked with 150  $\mu$ l PBS pH 7.4 containing 10% (v/v) FCS and 0.2% (v/v) Tween-20 (ELISA blocking solution) for 30 min at 37°C. Serial fivefold dilutions of 15  $\mu$ g/well of mAb2 in ELISA blocking solution were added to the wells and incubated for 90 min at room temperature. Wells were washed five times with PBS containing 0.1% (v/v) Tween-20 (PBS-T) and 100  $\mu$ l peroxidase-labeled anti-Fc fragment of mouse

immunoglobulin conjugate (ICN ImmunoBiologicals, Costa Mesa, CA) diluted 1/2000 was then added. Plates were then incubated for 90 min at room temperature. Plates were washed five times with PBS-T and specific mAb binding was revealed by the addition of 100  $\mu$ l of 2.2 mM *O*-phenylenediamine and 3 mM hydrogen peroxide. The enzymatic reaction was stopped with 100  $\mu$ l of 1N HCl, and the absorbance read at 492 nm using an SLT EAR 400 AT plate reader (SLT-Labinstruments, Austria).

*ELISA for detection of inhibition of binding of Id to Ag by anti-Id and inhibition of virus-neutralization assay*

This was performed as described previously (Lamarre *et al.*, 1991).

*Mab2 immunization and protection assay*

Groups of 6 BALB/c mice were immunized by intraperitoneal injection of 100  $\mu$ g of mAb2 coupled to KLH and emulsified in complete Freund's adjuvant (1:1 (v/v)) for the first injection. For the two subsequent booster doses, 50  $\mu$ g of mAb2 emulsified in incomplete Freund's adjuvant (1:1 (v/v)) were given at 14 days intervals. Seven days after the last injection, blood samples were drawn from the retro-orbital plexus. An intra-cerebral viral challenge was given 3 days later with 10 LD<sub>50</sub> (Talbot *et al.*, 1988) of MHV-A59 (equivalent of approximately 5 x 10<sup>5</sup> PFU).

## RESULTS

We have previously demonstrated the induction of a protective immune response against coronavirus infection with a polyclonal non-internal image Ab<sub>2</sub> $\gamma$ . This anti-I<sub>d</sub> was identified as an Ab<sub>2</sub> $\gamma$  because no internal image activity was detected and it had the capacity to inhibit the binding of mAb1 7-10A to virus (Lamarre *et al.*, 1991). However, presence of traces of internal image anti-I<sub>d</sub> in the Ab<sub>2</sub> $\gamma$  population that could be sufficient to induce the observed protection could not be excluded. Thus, more defined protective monoclonal reagents need to be produced from the same mAb1 that induced the polyclonal Ab<sub>2</sub> $\gamma$ . Furthermore, the generation of monoclonal anti-I<sub>d</sub> antibodies (mAb2), will facilitate a more precise characterization of the protective immune response induced by non-internal image anti-I<sub>d</sub>.

Thus, four BALB/c mice were immunized with mAb1 7-10A coupled to KLH to generate mAb2. After four injections, mouse spleen cells were isolated and fused to myeloma cells. Hybridoma supernatant fluids were screened for the presence of anti-I<sub>d</sub> antibodies by ELISA using viral Ag as the coating Ag. The hybridoma in the positive wells were cloned and tested again for their specific reactivity to mAb1. Figure 1 illustrates that supernatant of hybridoma clones were specific to the idiotype of mAb1 since we observed a strong reactivity with mAb1 7-10A and only a background level response with another mAb of the same isotype B35. MAb2 did not react either with KLH, which was used as coupling molecule during immunization. As a positive control, the plasma of mice used for the cell fusion were also tested. It reacted with the idiotype, isotype and KLH as expected.

Based on the ability of Ab2 to inhibit the interaction between Ab1 and virus, Ab<sub>2</sub> $\beta$  and Ab<sub>2</sub> $\gamma$  can be differentiated from Ab<sub>2</sub> $\alpha$ . An Ab<sub>2</sub> $\alpha$  is unable to inhibit Ab1 binding to Ag since it binds to idiotopes located away from the paratope of Ab1. On the other hand, Ab<sub>2</sub> $\beta$  and Ab<sub>2</sub> $\gamma$  inhibit the interaction of Ab1 with virus by steric hindrance ( $\gamma$ ) or by mimicry of the Ag ( $\beta$ ). Thus, the hybridoma clones were further examined for inhibition of the binding of mAb1 7-10A to the virus. As illustrated in Figure 2, mAbs secreted by some hybridoma clones showed more than 90 % inhibition of binding of mAb1 to virus. Ten ng of mAb2 was



enough to inhibit over 80% of mAb1 7-10A binding to virus, while the same amount of isotypic control did not have any effect on this binding. However, mAbs secreted by other hybridoma clones inhibited binding of mAb1 to virus to a lesser extent. MAb2 were also tested for their capacity to inhibit virus neutralization by mAb1. Here again, the same clones exhibited inhibition confirming the inhibition of attachment assay. As shown in Table 1, a reduction of neutralization titers by 3 to 4 log<sub>10</sub> was observed with as little as 10 µg of mAb2. Both results suggest that the mAb2 sites recognized are in or near the antigen combining site of mAb1 and that these cells probably produce Ab2<sub>β</sub> or Ab2<sub>γ</sub>. The other mAb2 were identified as mAb2<sub>α</sub>. It is interesting to note that all the mAb2 generated in this cell fusion were of the IgG1 isotype (Table 2).

The induction of Ag-specific immune response in animals immunized with anti-I<sub>d</sub> allows the distinction between internal image and non-internal image anti-I<sub>d</sub>. Moreover, in our goal to find protective mAb2, mice were immunized with mAb2 that were able to strongly inhibit the binding of mAb1 to virus and/or inhibit virus neutralization. After a first injection of 100 µg of mAb2 coupled to KLH and emulsified in Freund's adjuvant, and two booster injections of 50 µg, mouse plasma were tested for the presence of antiviral Ab3. Unfortunately, none of the mAb2 injected in BALB/c mice induced detectable specific antiviral Ab3 by ELISA (data not shown). However, since the polyclonal Ab2<sub>γ</sub> anti-7-10A had induced neutralizing Ab3 and that the *in vitro* neutralization assay was more sensitive than ELISA, sera of mAb2-immunized mice were also tested for their capacity to neutralize viral infectivity. Again, no virus neutralizing activity were detected with dilutions as little to 1/50. Ten days after the last boost, mAb2-immunized mice were challenge intracerebrally with 10 LD<sub>50</sub> of MHV-A59. None of the mAb2-immunized BALB/c mice survived the coronaviral challenge (Table 2). The absence of protection and the absence of induction of specific antiviral Ab3 in mAb2-immunized mice suggest that mAb2 produced were not of the β-type, as structural mimicry would induce a specific antiviral Ab3.

## DISCUSSION

Since a protective polyclonal Ab<sub>2</sub> $\gamma$  was produced from mAb1 7-10A, mAb2 were generated to define more precisely the mechanisms of protection of an homogenous population of anti-Id. In this study, we were able to select mAb2 that were specific to mAb1 7-10A. They were characterized as mAb2 $\alpha$  or mAb2 $\gamma$ . All mAb2 were of IgG1 isotype, which corroborates another study that suggested that IgG1 is the main isotype expressed in anti-idiotypic responses to idiotypes in mice and rat (Rouseaux-Prévost *et al.*, 1993). Another study demonstrated that an anti-idiotypic antibody response is dependent on T helper cells (Janeway *et al.*, 1975) and that thymus-dependent antigens predominantly stimulate IgG1 in the mouse. Furthermore, Freund's adjuvant was reported to favor the production of antibodies of the IgG1 isotype (Karagouni *et al.*, 1990). Among all specific mAb2 isolated, six mAb2 $\gamma$  were selected for evaluation of potential protective activities. In contrast to the polyclonal Ab<sub>2</sub> $\gamma$  generated from mAb1 7-10A-immunized rabbit, no mAb2 $\gamma$ -immunized BALB/c mice were protected against the lethal coronavirus infection, or showed the induction of coronavirus-specific Ab3.

Results from a previous study (Yu et Talbot, 1995) and the current study indicate that in the MHV model, the generation of protective mAb2 is difficult by the classical hybridoma technique (Köhler and Milstein, 1975). In another study using the molecular biology technology, Ab2 clones were successfully selected using phage-displayed recombinant anti-idiotypic antibody scFv fragments library against coronavirus-neutralizing mAb. However, the selected anti-Id were not able to induce a protective immune response in mice (Lamarre and Talbot, 1998). The results from these studies suggest the presence of a low frequency of protective anti-Id in the antibody repertoire. However, even the presence of low quantities of anti-idiotypic antibody seems to play an important role in the induction of the protection as shown with the protective polyclonal Ab<sub>2</sub> $\gamma$ .

Since no protective mAb2 were induced by mAb1 7-10A in contrast to the protective Ab<sub>2</sub> $\gamma$  generated from this same mAb1, the hypothesis that traces of beta type anti-Id, not detectable in the polyclonal Ab<sub>2</sub> $\gamma$  population, could not be

eliminated. However, the mAb2 were produced in a different species than the polyclonal Ab2 $\gamma$  which does not necessarily share the same antibody repertoire. The antibodies that recognize the idiotope of mAb1 responsible for the protection observed could be present in the rabbit and absent in the mouse since the species are different. Furthermore, there are reports of induction of antigen-specific responses with monoclonal or polyclonal noninternal image anti-idiotypes (Zhou *et al.*, 1990; Schick *et al.*, 1987; Huang *et al.*, 1986), which support the antiviral immune response induced by our non-internal image Ab2 $\gamma$ .

It is probable that the complexities of the idiotypic network will take time before being completely understood. This emphasizes the need to further characterize the mechanisms of protective immune response with anti-idiotypic antibodies before being able to safely manipulate the idiotypic network.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant MT-9203 from the Medical Research Council of Canada to P.J.T. M.W.N.Y. received a studentship from the Fonds pour la formation et l'aide à la recherche du Québec. P.J.T. acknowledges a senior scholarship from the *Fonds de la recherche en santé du Québec*.

## REFERENCES

- Bailey, G.S. 1984. Immunodiffusion in gels. In: *Methods in molecular biology. Proteins*. Walker, J.M. (Ed.), Humana Press Clifton, NJ, p.301.
- Billeta, R., M.R. Hollingdale, and M. Zanetti. 1991. Immunogenicity of an engineered internal image antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4713.
- Daniel, C., and P.J. Talbot. 1987. Physico-chemical properties of murine hepatitis virus, strain A-59. *Arch. Virol.* 96:241.
- Daniel, C., and P.J. Talbot. 1990. Protection from lethal coronavirus infection by affinity-purified spike glycoprotein of murine hepatitis virus, strain A59. *Virology.* 174:87.
- Fung, M.S.C., C.R.Y Sun, R.S. Liou, W. Gordon, N.T. Chang, S.-W. Chang, and N.-C. Sun. 1990. Monoclonal anti-idotypic antibody mimicking the principal neutralization site in HIV-1 GP120 induces HIV-1 neutralizing antibodies in rabbits. *J. Immunol.* 145:2199.
- Huang, J.H., Ward, R.E., and H. Kohler. 1986. Idiotope antigens (Ab2 alpha and Ab2 beta) can induce in vitro B cell proliferation and antibody production. *J. Immunol.* 137:770.
- Janeway, C.A. Jr, Koren H.S., and P. We. 1975. The role of thymus-derived lymphocytes in an antibody-mediated hapten-specific helper effect. *Eur. J. Immunol.* 5:17.
- Karagouni, E.E., and L. Hadjipetrou-Kourounakis. 1990. Regulation of isotype immunoglobulin production by adjuvants in vivo. *Scand. J. Immunol.* 31:745.
- Köhler, G., and C. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495.
- Kumanishi, T. 1967. Brain tumors induced with Rous Sarcoma virus, Schmidt-Ruppin strain. I. Induction of brain tumors in adult mice with Rous chicken sarcoma cells. *Jap. J. Exp. Med.* 37:461.

Lamarre, A., J. Lecomte, and P.J. Talbot. 1991. Antiidiotypic vaccination against murine coronavirus infection. *J. Immunol.* 147:4256.

Lamarre A., and P.J. Talbot. 1998. Characterization of phage-displayed recombinant anti-idiotypic antibody fragments against coronavirus-neutralizing monoclonal antibodies. *Viral Immunol.* 10:175.

Manil, I., P. Motté, P. Pernas, F. Troalen, C. Bohuon, and D. Bellet. 1986. Evaluation of protocols for purification of mouse monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods* 90:25.

Rousseaux-Prévost, R., J. Bonnetterre, H. Bazin, and J. Rousseaux. 1983. Subclass restriction of the antiidiotypic antibody response in the rat. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)* 134D:167.

Schick, M.R., Dreesman, G.R., and R.C. Kennedy. 1987. Induction of an anti-hepatitis B surface antigen response in mice by noninternal image (Ab2 $\alpha$ ) anti-idiotypic antibodies. *J. Immunol.* 138:3419.

Su, S., M. M. Ward, M.A. Apicella, and R.E. Ward. 1992. A nontoxic, idiotope vaccine against gram-negative bacterial infections. *J. Immunol.* 148:234.

Talbot, P.J., G. Dionne, and M. Lacroix. 1988. Protection against viral encephalitis by a synthetic peptide selected for surface probability. In *Technological Advances in Vaccine Development*. Alan R. Liss, Inc. p 379.

Yu, M., and P.J. Talbot. 1995. Induction of a protective immune response to murine coronavirus with non-internal image anti-idiotypic antibodies. *Adv. Exp. Med. Biol.* 380:165.

Yu, M.W.N., S. Lemieux, and P.J. Talbot. 1996. Genetic control of anti-idiotypic vaccination against coronavirus infection. *Eur. J. Immunol.* 26:3230.

Zhou, E.-M., Lohman, K.L., and R.C. Kennedy. 1990. Administration of noninternal image monoclonal anti-idiotypic antibodies induces idiotype-restricted responses specific for human immunodeficiency virus envelope glycoprotein epitopes. *Virology* 174:9.

**Table 1:** Inhibition of mAb1 virus neutralization with mAb2

mAb2 competitor	Neutralization titer ( $\log_{10}$ ) <sup>1</sup>
6-11C.1	2
1-3A.2	3
10-1H.1	2
8-5F.1	2
7-12F.1	2
2-10E.1	3
4-2A.1	2
5-8G.1	6
4-12G.1	6
8-10A.1	6
9E10.2	6
Medium	6

<sup>1</sup> Reciprocal of the highest dilution of mAb1 7-10A ascite fluid that neutralized 50% of input virus after incubation with competitor

**Table 2: mAb2 characteristics**

MAb2	Isotype	Suggested nature of mAb2 type <sup>1</sup>	Protection	Antiviral Ab3 (ELISA) <sup>2</sup>	Neutralizing antiviral Ab3 <sup>3</sup>
6-11C.1	IgG1	$\gamma$	0/5	< 1/100	< 1/50
1-3A.2	IgG1	$\gamma$	0/6	< 1/100	< 1/50
10-1H.1	IgG1	$\gamma$	0/6	< 1/100	< 1/50
8-5F.1	IgG1	$\gamma$	0/6	< 1/100	< 1/50
4-2A.1	IgG1	$\gamma$	0/6	< 1/100	< 1/50
7-12F.1	IgG1	$\gamma$	0/6	< 1/100	< 1/50
2-10E.1	IgG1	$\gamma$	0/6	< 1/25	ND <sup>4</sup>
5-8G.1	IgG1	$\alpha$	0/6	< 1/25	ND
4-12G.1	IgG1	$\alpha$	0/6	< 1/25	ND
3-7G.1	IgG1	$\alpha$	0/6	< 1/25	ND
1-1C.1	IgG1	$\gamma$	0/15	< 1/25	ND
6-2H.2	IgG1	$\alpha$	0/6	< 1/25	ND
1-9H.1	IgG1	$\gamma$	0/6	< 1/25	ND
3-6B.2	IgG1	$\gamma$	0/6	< 1/25	ND
5-12E.1	IgG1	$\alpha$	0/6	< 1/25	ND
8-10A.1	IgG1	$\alpha$	ND	ND	ND
10-12D.2	IgG1	$\alpha$	0/6	< 1/25	ND

<sup>1</sup> Immunoglobulin isotype determined by a double immunodiffusion assay

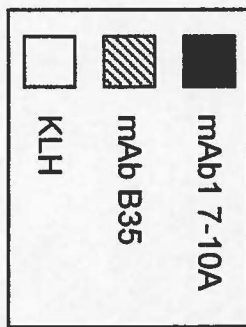
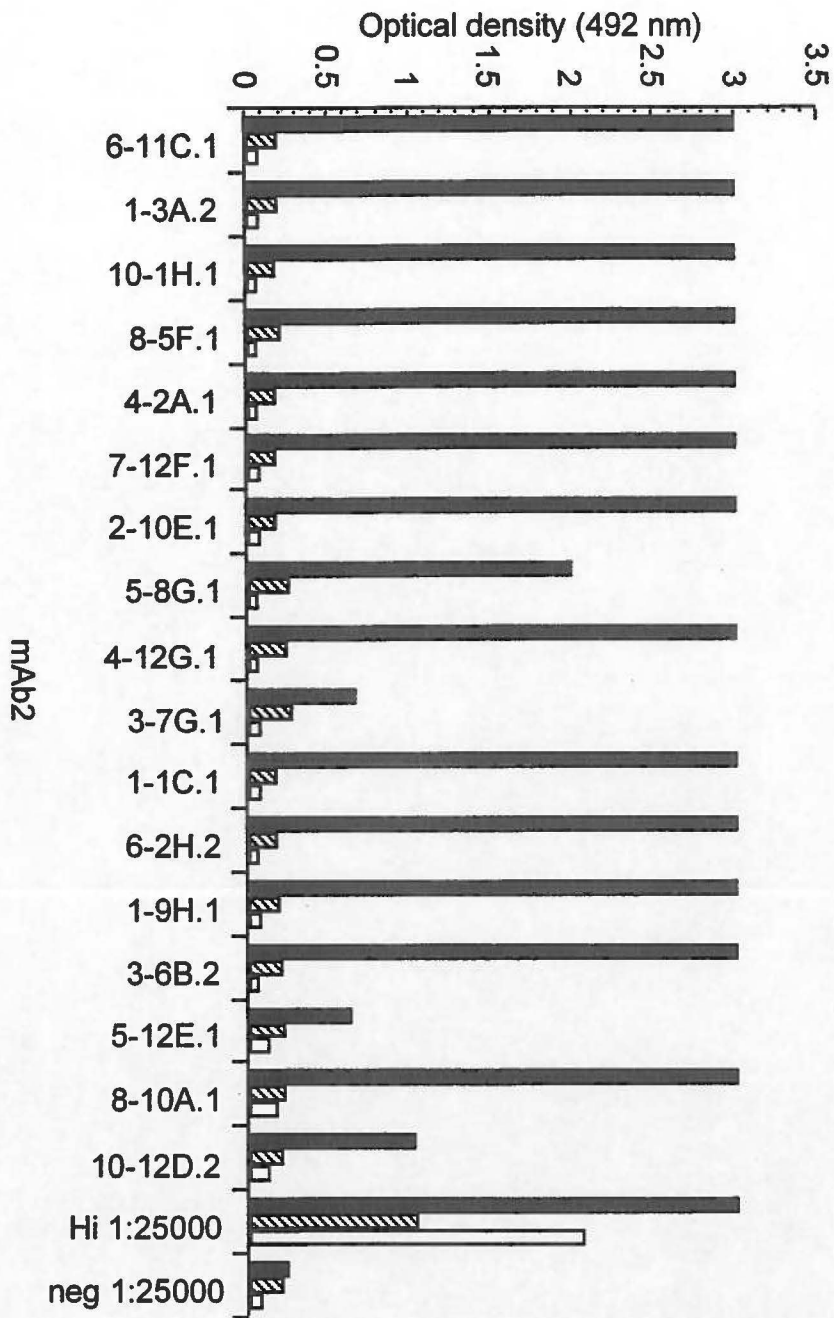
<sup>2</sup> Highest plasma dilution where specific antiviral Ab3 is detectable by ELISA

<sup>3</sup> Plasma dilution that neutralized 50% of input virus

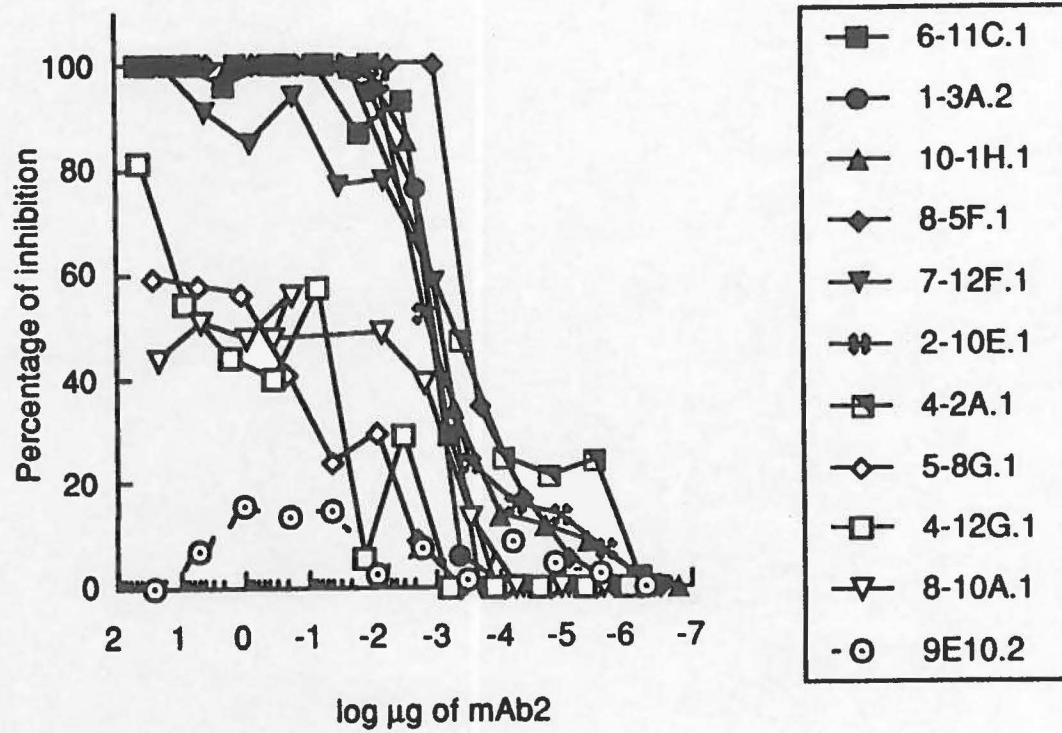
<sup>4</sup> Not determined



**Figure 1:** ELISA for determining mAb2 specificity. Ninety six well-microtiter plates were coated with 60 ng/well of F(ab')<sub>2</sub> fragments of mAb1, isotypic control mAb B35 (IgG2a) or KLH, and binding of 4.8 ng/well of mAb2 supernatant or mAb 9E10.2 of the same isotype as the mAb2 (IgG1) was determined using peroxidase-labeled mouse anti-Fc fragments. Hi is defined as hyperimmune plasma and neg for preimmune plasma.



**Figure 2:** Inhibition of binding of mAb1 to the virus by mAb2. Ninety six well-microtiter plates were coated with 25 ng/well of viral Ag. Biotinylated mAb1 and dilutions of mAb2 supernatant or isotypic control mAb 9E10.2 were preincubated together and transferred onto the viral Ag-coated plates. The binding of mAb1 to viral Ag was detected using peroxidase-labeled streptavidin. The results of inhibition of binding of mAb1 to the virus by the isotypic control mAb 9E10.2 is represented by the dashed curve.



## Introduction à l'article IV

Puisque l'AcMo1 7-10A de la précédente étude n'a pas permis d'obtenir d'AcMo2 protecteurs, d'autres anticorps anti-idiotypiques ont été générés contre deux autres AcMo1 nommés 5B170 et 4-11G. Les AcMo2 ont été produits chez la souris BALB/c, tandis que les Ac2 polyclonaux ont été générés chez le lapin. Les lapins ont subi plusieurs immunisations avec l'AcMo1. Après vérification de la présence d'anticorps anti-idiotypiques dans le sérum des lapins, les anticorps anti-idiotypiques ont été purifiés par chromatographie d'affinité et caractérisés biologiquement par des tests *in vitro* et *in vivo*. Les résultats obtenus de cette partie du projet ont été publiés dans "Advances in Experimental Medicine and Biology".

**ARTICLE IV**

**INDUCTION OF A PROTECTIVE IMMUNE RESPONSE TO MURINE  
CORONAVIRUS WITH NON-INTERNAL IMAGE ANTI-IDIOTYPIC  
ANTIBODIES.**

**Mathilde Yu et Pierre J. Talbot**

**Laboratoire de neuroimmunovirologie,  
Institut Armand-Frappier, Université du Québec  
Laval, Québec, Canada H7V 1B7**

**Article publié dans: "Advance in Experimental Medicine and Biology" (1995)  
380:165-172.**

## Sommaire traduit

Le coronavirus murin neurotrope (MHV) constitue un excellent modèle animal pour étudier les modulations de la réponse immunitaire contre des pathogènes viraux à l'aide d'anticorps anti-idiotypiques. Parmi les divers types d'anticorps anti-idiotypiques, ceux communément appelés bêta ( $\beta$ ) ou images internes, ont la particularité de mimer au niveau moléculaire l'antigène et d'induire des réponses immunitaires menant à la neutralisation du virus et à la protection contre l'infection virale. Récemment, nous avons démontré une immunité protectrice spécifique contre le coronavirus à l'aide d'un anticorps anti-idiotypique polyclonal non-image interne de type  $\gamma$ .

Dans la présente étude, un autre anticorps polyclonal anti-idiotypique non-image interne a été produit chez le lapin contre un anticorps monoclonal (AcMo) neutralisant appelé 5B170. Étonnamment, les souris immunisées avec cet Ac2 $\alpha$  purifié par chromatographie d'affinité ont été partiellement protégées contre l'infection létale par le MHV-JHM. Par contre, d'autres anticorps polyclonaux et monoclonaux non-images internes générés à partir de l'AcMo 4-11G n'ont pas protégé les souris contre l'infection létale par le MHV-A59.

Ces résultats démontrent qu'en altérant le réseau idiotypique, la protection contre l'infection coronavirale peut même être obtenue par des anticorps anti-idiotypiques non-image interne de type  $\alpha$ .

## ABSTRACT

Neurotropic murine coronaviruses (MHV) provide an excellent animal model to study experimental modulation of the immune response to a viral pathogen with anti-idiotypic antibodies. It is known that among the various types of anti-idiotypic antibodies (anti-Id), those designated beta ( $\beta$ ) or internal image can molecularly mimic the antigen and induce biological activities such as anti-viral protection and neutralization. We have recently shown that polyclonal non-internal image anti-idiotypic antibodies of the  $\gamma$ -type could induce protective anti-coronavirus immunity<sup>1</sup>.

In the present study, a polyclonal anti-Id (Ab2) was induced against a neutralizing murine monoclonal antibody (MAb1), designated 5B170.11. Mice immunized with this affinity-purified rabbit Ab2 $_{\alpha}$ , a non-internal image antibody, were partially protected against lethal infection by the JHM strain of MHV. However, other polyclonal and monoclonal non-internal image Ab2 induced against another neutralizing MAb1, designated 4-11G.6, were not able to protect mice against lethal infection with the A59 strain of MHV.

These results demonstrate that anti-viral protection by altering the idiotypic network with non-internal image-bearing anti-idiotypic reagents can be achieved even with some anti-Id of the  $\alpha$ -type.



## INTRODUCTION

Anti-idiotypic antibodies are potentially involved in the regulation of the immune response to a given antigen (Ag)<sup>2</sup>. Moreover, anti-Id have been used to manipulate the immune response *in vivo* in several experimental systems<sup>3,4</sup>.

Anti-Id (Ab2) are classified in three different categories based on the idiotopes they recognize on Ab1. Ab2<sub>α</sub> recognize idiotopes far from the antigen combining site (paratope) of Ab1. Ab2<sub>γ</sub> recognize idiotopes near the paratope of Ab1 and can compete with antigen for the binding site of Ab1. Ab2<sub>β</sub> are referred to as internal image anti-Id. They have the capacity to mimic the antigen used to generate the Ab1 and can substitute for antigen in inducing an anti-antigen response because they recognize an idiopeptide at the level of the paratope. However, the idiotypic network is complex because some non-internal image anti-Id can also induce an immune response to antigen, which can be described as biological rather than a structural mimicry. For example, Ab2<sub>α</sub> could induce an anti-hepatitis B surface Ag response<sup>5</sup> and neutralizing antibodies against HIV<sup>6</sup>. Also, we have described an Ab2<sub>γ</sub>-induced protective immune response against MHV-A59<sup>1</sup>. Therefore, non-internal image Ab2 can have interesting biological properties, although we do not yet understand their mechanisms of action.

Neurotropic murine coronaviruses (MHV strains JHM and A59) provide an excellent animal model to study the manipulation of the idiotypic network and its effect on a viral infection.

In the present study, we describe the production and characterization of non-internal image Ab2s against *in vitro* neutralizing and *in vivo* protective monoclonal antibodies (MAb1) specific to MHV-A59 and MHV-JHM. MAb1 4-11G.6 recognizes a discontinuous epitope on the spike (S) glycoprotein of MHV-A59, whereas MAb1 5B170.11 recognizes a linear epitope on the homologous protein of MHV-JHM. These two MAb1 had both been characterized previously and shown to neutralize virus infectivity *in vitro* and passively protect mice *in vivo* against a lethal MHV infection<sup>7,10</sup>. This suggested that the S protein has biological importance in immune protection against MHV infection, which was confirmed by the demonstration that affinity-

purified S glycoprotein could vaccinate against lethal coronavirus infection<sup>7</sup>.

Administration of these Ab<sub>2</sub>s to BALB/c mice showed that some non-internal image Ab<sub>2</sub><sub>α</sub> could partially mimic interesting biological properties of internal image Ab<sub>2</sub>, such as *in vivo* protection against viral infection. This emphasizes the complexity of the idiotypic network and how little is known on the mechanisms of induction of a protective immune response by anti-Id.

## MATERIALS AND METHODS

*Animals.* New-Zealand white female rabbits of 2.5 to 3 kg were purchased from *Ferme de sélection Cunipur*, Stukely Sud, Québec, Canada. Four to 5 week-old female BALB/c mice were purchased from Charles River, St-Constant, Québec, Canada.

*Antibodies.* The production and characterization of the hybridoma secreting mouse neutralizing MAb 4-11G.6, specific for a discontinuous epitope on the S glycoprotein of MHV-A59, has been previously described<sup>7</sup>. Monoclonal antibody 5B170 is specific for a continuous epitope on the S protein of MHV-JHM<sup>8</sup>. All antibodies including normal rabbit immunoglobulins (NRlg) were purified by standard Protein-A-Sepharose chromatography.

*Polyclonal anti-Id and antibody assays.* The immunization protocols for generating polyclonal anti-Id and their characterization have been described elsewhere<sup>1</sup>, including virus neutralization and protection assays and ELISA for detection of Ab3 against MHV-A59 in mice sera. ELISA for detection of idiotype in antiviral sera and of inhibition of binding of idiotype to antigen by anti-Id were also described previously<sup>1</sup>.

*Monoclonal anti-Id.* The production of MAb was described previously<sup>7</sup>: BALB/c mice were immunized with 100 µg of affinity purified MAb 4-11G.6 and given two booster injections of 50 mg.

*ELISA for detection of MAb2.* Microtiter plates were coated with affinity purified F(ab')<sub>2</sub> MAb1 [1.25 µg/mL in phosphate buffered saline (PBS)] and incubated for 16 h at room temperature. The plates were blocked with PBS containing 10% (v/v) fetal calf serum and 0.2% (v/v) Tween-20 for 30 min at 37°C. Hybridoma culture supernatants (4 days of growth) diluted 1/2 were added to the wells and incubated for 90 min at room temperature. The plates were then washed five times with PBS containing 0.1% (v/v) Tween-20. Peroxidase-labeled goat anti-mouse Fc antibody (ICN Biologicals, Miles) was then added and incubated for 90 min at room temperature. The plates were washed five

times and the reaction was developed with *O*-phenylenediamine and hydrogen peroxide. The reaction was stopped with 1N HCl and the absorbance read at 492 nm using an SLT EAR 400 AT plate reader.

*Virus and cells.* MHV-A59 and MHV-JHM were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD), plaque-purified twice, and passaged four times at a multiplicity of infection of 0.01 on DBT cells as described previously<sup>9</sup>.

*Plaque assays with brain homogenates of mice immunized with anti-Id.* Brains were collected 5 days after virus challenge and plaque assays performed as described elsewhere<sup>10</sup>.

*Statistics.* Results of *in vivo* protection assays were analyzed with the Kaplan-Meier survival curve<sup>11</sup>. Antiviral Ab3 antibody responses were evaluated at a 1/500 dilution and analyzed with the Mann-Whitney test<sup>12</sup>. Brain viral titers observed after NR1g or anti-Id treatment and the repeated experiments were first analyzed with a Manova test<sup>13</sup>. This test included an interaction test which in our case was shown to be significant, so the two treatments were then compared separately by a Student t-test<sup>14</sup>.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Polyclonal anti-5B170.11

A polyclonal anti-I<sub>d</sub> 5B170.11 was purified by affinity chromatography from the serum of a rabbit immunized with MAb1 5B170.11. To determine if the anti-I<sub>d</sub> bound to the paratope of MAb1, inhibition of virus-binding by anti-I<sub>d</sub> was tested. This inhibition of attachment assay can discriminate  $\alpha$ -type from  $\beta$  and  $\gamma$ -types anti-I<sub>d</sub>. The polyclonal anti-I<sub>d</sub> produced against MAb1 5B170.11 did not inhibit the interaction between MAb1 and antigen, consistent with it being an Ab2 $_{\alpha}$  (Fig. 1A). The anti-I<sub>d</sub> was also tested for its capacity to inhibit the neutralizing ability of MAb1 in an inhibition of virus-neutralization assay. As much as 10  $\mu$ g of anti-I<sub>d</sub> could not reduce the neutralization titer of MAb1 (data not shown), which confirmed the results of the inhibition of attachment assay.

On the basis of previous studies showing that non-internal image anti-I<sub>d</sub> could trigger an antigen-specific immune response<sup>1,16,17</sup> like internal image anti-I<sub>d</sub>, we examined the *in vivo* modulation capability of the rabbit polyclonal Ab2 $_{\alpha}$  anti-5B170.11. Two groups of 6 BALB/c mice were immunized with anti-I<sub>d</sub> or NRIg three times at two-week intervals. After the third injection, the MHV-specific Ab3 response was examined by ELISA. No detectable antiviral antibodies were produced in mice immunized with Ab2 $_{\alpha}$  (data not shown). To verify whether the Ab2 $_{\alpha}$  could nevertheless induce a protective immune response, mice were challenged intracerebrally with 10 LD<sub>50</sub> of MHV-JHM, 10 days after the last booster anti-I<sub>d</sub> injection. All mice showed clinical signs of MHV infection. Animals in control groups died from MHV-JHM infection within 6 to 10 days, whereas 16% to 33% of mice in the Ab2 $_{\alpha}$  group lived longer (until day 41) (Fig. 2A). In a repeat experiment some mice survived in both control and Ab2 $_{\alpha}$  treated group (Fig. 2B). In the third repeat experiment, anti-viral Ab3s were detected by ELISA at a dilution of 1/500 (data not shown). The presence of specific Ab3s at this dilution was significant for a *p* value of 0.0014 in the Mann-Whitney test. However, these Ab3s could not neutralize viral infection *in vitro* (data not shown). No specific reactivity was observed in control groups (NRIg) or pre-immune sera. We then evaluated whether the apparent partial protection of mice correlated with reduced viral titers in the brain (Fig. 3). The first plaque

assay did not show a significant reduction of viral titers but two other plaque assays from the same brain aliquots did show significant reductions in viral titers between mice treated with Ab2 $\alpha$  and NRlg. The reduction in viral titer was significant at a *p* value of 0.014 with the second assay and at a *p* value of 0.004 for the third assay. Such reduced viral titers could explain the observed apparent protection.

We observed either a weak or non-existent antiviral Ab3 response (data not shown) and variable protection after treatment with polyclonal Ab2 $\alpha$  anti-5B170.11 (Fig. 2). This suggests either a need to optimize the conditions for antiviral Ab3 induction, or an involvement of cellular protective responses. The induction of specific immune responses by Ab2 $\alpha$  has been studied in different experimental systems<sup>15,16,17,18,19</sup> and the activation of the cellular component of the immune response by anti-Id was reported<sup>20,21,22</sup>.

Further experiments are needed to understand the mechanisms involved in the induction of protective immunity by non-internal image anti-Id. For example, very little is known on the interactions between anti-idiotypic antibody and immune cells.

The reasons why some Ab2 $\alpha$  induce protection and others do not are unclear. Ab2 $\alpha$ -induced immune responses might be the result of the induction of a regulatory pathway of idiotypes. Anti-Id could induce a different series of immunological reactions within an idiotypic network than those induced by the antigen.

### **Polyclonal and monoclonal anti-4-11G.6**

Polyclonal and monoclonal anti-Id were also produced in animals immunized with MAb1 4-11G.6. They are listed in Table 1.

### **Polyclonal anti-4-11G.6**

As a first approach towards determining whether the polyclonal anti-I<sub>d</sub> against MAb1 4-11G.6 was an internal image (Ab2<sub>β</sub>) anti-I<sub>d</sub>, its ability to bind to the paratope of MAb1 was tested. The results of the ELISA inhibition of attachment assay are shown in Fig.1B. Binding of MAb1 4-11G.6 to viral antigen could be inhibited by purified anti-I<sub>d</sub> in a dose-dependent manner. Twenty ng of anti-I<sub>d</sub> was enough to inhibit 100% of MAb1 binding to antigen, while the same amount of NRIg did not have any effect on this binding, indicating that the polyclonal anti-I<sub>d</sub> was not an Ab2<sub>α</sub>. The ability of the polyclonal Ab2 to abrogate the neutralization of virus infectivity was also tested. Ten μg of anti-I<sub>d</sub> could reduce the neutralization titer of MAb1 by 400-fold, whereas the same amount of NRIg did not have any effect (data not shown). These results confirmed the ELISA inhibition of attachment assay and suggested that this anti-I<sub>d</sub> binds at or near the paratope of MAb1 and was therefore an Ab2<sub>β</sub> or Ab2<sub>γ</sub>. To distinguish between these two possibilities, we investigated the ability of this anti-I<sub>d</sub> to be recognized by antisera from different animal species raised against the initial antigen. An Ab2<sub>β</sub> should bind to all anti-MHV hyperimmune sera because of its internal image properties. As shown in Fig.4, our polyclonal anti-I<sub>d</sub> recognized a share idiootype in hyperimmune sera from BALB/c, C57BL/6, AKR and SJL mice. It also bound weakly to rat sera, but not to rabbit sera. These results demonstrated that this anti-I<sub>d</sub> could not induce antibody responses to the antigen across species barrier. Therefore, this polyclonal anti-I<sub>d</sub> must only bind near the antigen-binding site of MAb1. This gamma-type reaction was confirmed by the absence of both specific antiviral Ab3 induction and protection (Table 1).

Interestingly, we previously demonstrated that Ab2<sub>γ</sub> against MAb1 7-10A specific for a related epitope could vaccinate mice against infection by this coronavirus<sup>1</sup>. We now show that Ab2<sub>γ</sub> anti-4-11G.6 did not induce a protective immune response. MAbs1 7-10A and 4-11G.6 were previously shown to recognize two overlapping conformational epitopes by an ELISA competition assay<sup>7</sup>. Therefore, the mechanisms of protection induced by the Ab2<sub>γ</sub> anti-7-10A remain to be investigated.

### Monoclonal anti-4-11G.6

Anti-4-11G.6 MAb2 were also generated in BALB/c mice. They were all of IgG2b isotype and, as shown in Table 1, did not compete with antigen for binding of MAb1, which suggests that they recognize framework idiotopes and can be classified as Ab2 $_{\alpha}$ . These MAb2, coupled to KLH to enhance their immunogenicity, did not induce specific antiviral Ab3 nor induced protection against MHV-A59 (Table 1). Previous studies have shown that such Ab2s could induce Ab3s in other viral systems<sup>16,17</sup>. However, in the present work, no MAb2 $_{\alpha}$  were able to induce an antiviral Ab3 response.

The use of monoclonal anti-Id with interesting biological activities should help clarify the mechanisms of protection induced by non-internal image anti-Id. Moreover, the production of monoclonal internal image Ab2 $_{\beta}$ , although potentially interesting for characterization of molecular determinants involved in viral pathogenesis, identification of cellular receptors and vaccination, is technically difficult. Molecular cloning of the antibody repertoire could overcome this technical problem<sup>23</sup>. Such studies are in progress.



## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Eduardo Franco and Marie Désy for expert assistance with statistical analyses, Francine Lambert for excellent technical assistance, Alain Lamarre for assistance in the early stages of this work and Michael J. Buchmeier (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, U.S.A) for his generous gift of MAb 5B170. Mathilde Yu acknowledges studentships from the Institut Armand-Frappier and the *Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche* (FCAR) and Pierre J. Talbot scholarship support from the *Fonds de la Recherche en santé du Québec* (FRSQ). This work was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada (MRC) to P.J.T.

**REFERENCES**

- 1- Lamarre, A., Lecomte, J., Talbot, P. J. 1991. Antiidiotypic vaccination against murine coronavirus infection. *J. Immunol.* 147:4256-4262.
- 2- Jerne, N. K. 1974. Towards a network theory of the immune system. *Ann. Immunol.* 125c:373-389.
- 3- UytdeHaag, G. C. M., Bunschoten, H., Weijer, K., Osterhaus, A. D. M. E. 1986. From Jenner to Jerne: Towards idiotypic vaccines. *Immunol. Rev.* 90:93-113.
- 4- Zhou, E.-M., Chanh, T. C., Dreesman, G. R., Kanda, P., Kennedy, R. C. 1987. Immune response to human immunodeficiency virus. *In vivo* administration of anti-idiotypic induces an anti-gp160 response specific for a synthetic peptide. *J. Immunol.* 139:2950-2956.
- 5- Kennedy, R. C., Eichberg, J. W., Lanford, R. E., Dreesman, G. R. 1986. Anti-idiotypic antibody vaccine for type B viral hepatitis in chimpanzees. *Science* 232:220-223.
- 6- Fung, M. S. C., Sun, C. R. Y., Liou, R. S., Gordon, W., Chang, N. T., Chang, T.-W., Sun, N.-C. 1990. Monoclonal anti-idiotypic antibody mimicking the principal neutralization site in HIV-1 gp120 induces HIV-1 neutralizing antibodies in rabbits. *J. Immunol.* 145:2199-2206.
- 7- Daniel, C., Talbot, P. J. 1990. Protection from lethal coronavirus infection by affinity-purified spike glycoprotein of murine hepatitis virus, strain A59. *Virology.* 174:87-94.
- 8- Collins, A. R., Knobler, R. L., Powell, H., Buchmeier, M. J. 1982. Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for attachment and cell-cell fusion. *Virology* 119:358-371.

- 9- Daniel, C., Talbot, P. J. 1987. Physico-chemical properties of murine hepatitis virus, strain A59. *Arch. Virol.* 96:241-248.
- 10- Buchmeier, M. J., Lewicki, H. A., Talbot, P. J., Knobler, R. L. 1984. Murine hepatitis virus-4 (strain JHM)-induced neurologic disease is modulated *in vivo* by monoclonal antibody. *Virology* 132:261-270.
- 11- Armitage, P., Berry, G. *Statistical methods in medical research*. Second edition, 1987, Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. 428-433.
- 12- Armitage, P., Berry, G. *Statistical methods in medical research*. Second edition, 1987, Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. 411-412.
- 13- Tabachnick, B. G., Fidell, L. S. *Using Multivariate Statistics*. Second edition, 1989, Harper Collins Publishers, Inc., New York. p. 376.
- 14- Armitage, P., Berry, G. *Statistical methods in medical research*. Second edition, 1987, Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. 107-111.
- 15- Francotte, M., Urbain, J. 1984. Induction of anti-tobacco mosaic virus antibodies in mice by rabbit antiidiotypic antibodies. *J. Exp. Med.* 160:1485-1494.
- 16- Schick, M. R., Dreesman, G. R., Kennedy, R. C. 1987. Induction of an anti-hepatitis B surface antigen response in mice by noninternal image (Ab<sub>2α</sub>) anti-idiotypic antibodies. *J. Immunol.* 138:3419-3425.
- 17- Zhou, E.-M., Lohman, K. L., Kennedy, R. C. 1990. Administration of noninternal image monoclonal anti-idiotypic antibodies induces idioyperestricted responses specific for human immunodeficiency virus envelope glycoprotein epitopes. *Virology* 174:9-17.
- 18- Suñé, C., Smerdou, C., Antón, I. M., Abril, P., Plana, J., Enjuanes, L. 1991. A conserved coronavirus epitope, critical in virus neutralization, mimicked by internal-image monoclonal anti-idiotypic antibodies. *J. Virol.* 65:6979-6984.

- 19- Kang, C.-U., Nara, P., Chamat, S., Caralli, V., Chen, A., Nguyen, M.-L., Yoshiyama, H., Morrow, W. J. W., Ho, D. D., Köhler, H. 1992. Anti-idiotypic monoclonal antibody elicits broadly neutralizing anti-gp120 antibodies in monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2546-2550.
- 20- Rees, A. D. M., Praputpittaya, K., Scoging, A. Dobson, N., Ivanyi, J., Young, D., Lamb, J. R. 1987. T-cell activation by anti-idiotypic antibody: evidence for the internal image . *Immunology* 60:389-393.
- 21- Huang, J.-H., Ward, R. E., Kohler, H. 1986. Idiotope antigens (Ab2<sub>a</sub> and Ab2<sub>β</sub>) can induce *in vitro* B cell proliferation and antibody production. *J. Immunol.* 137:770-776.
- 22- Zhou, S.-R., Whitaker, J. N. 1993. Specific modulation of T cells and murine experimental allergic encephalomyelitis by monoclonal anti-idiotypic antibodies. *J. Immunol.* 150:1629-1642.
- 23- Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., Winter , G. 1992. Molecular evolution of proteins on filamentous phage. *J. Biol. Chem.* 267:16007-16010.

**Table 1: Ab2 anti-4-11G.6.**

	anti-4-11G.6				
	Polyclonal	MAb2 3-2A.1	MAb2 8-11G.1	MAb2 2-10F.1	MAb2 7-11E.1
Anti-Id	$\gamma$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$
Ab3 <sup>a</sup>	<100	<100	<100	<100	<100
Neutralizing <sup>b</sup> Ab3	<50	<50	<50	<50	<50
Protection <sup>c</sup>	-	-	-	-	-

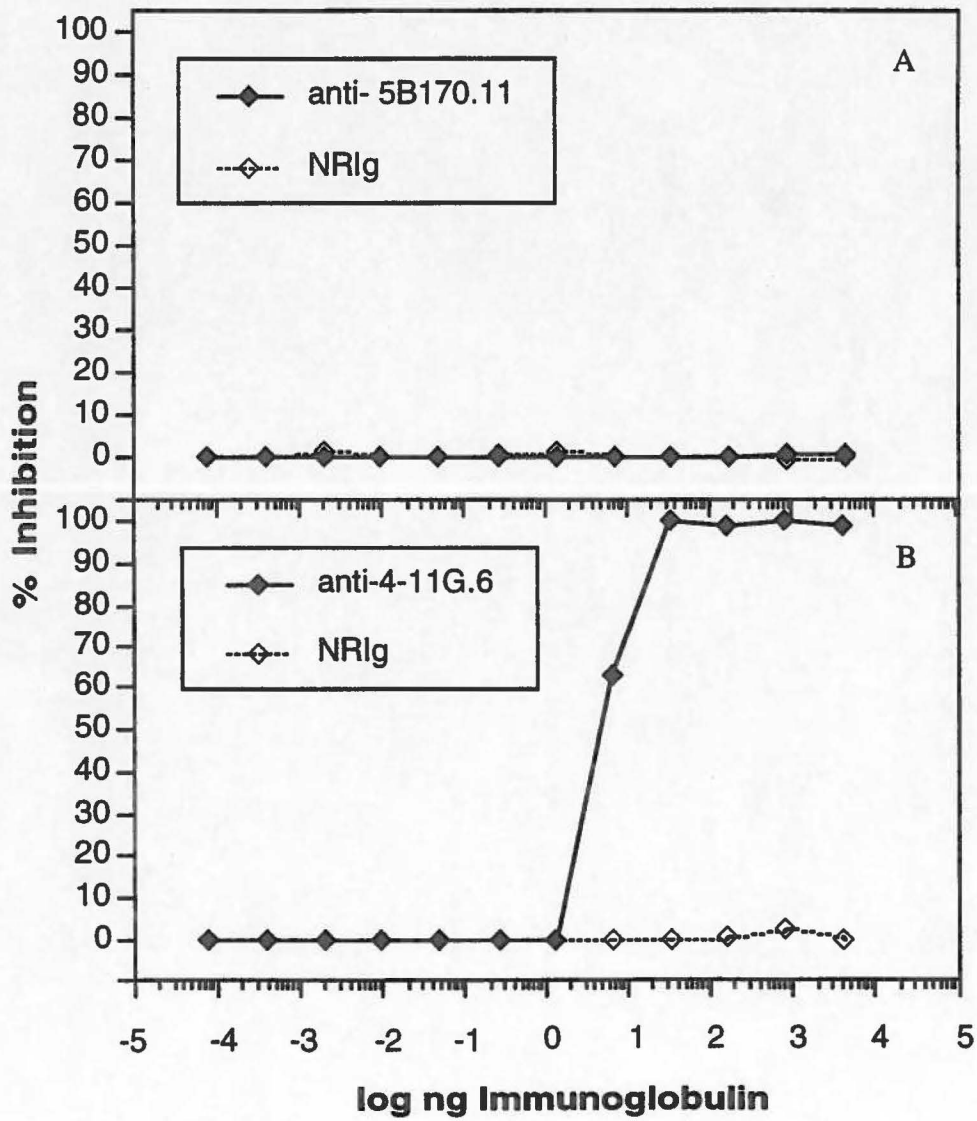
a Highest dilution where Ab3 anti-virus is detectable by ELISA.

b Reciprocal of the highest dilution of serum that neutralized 50% of input virus.

c BALB/c mice immunized with Ab2 and challenged intracerebrally with MHV-A59.

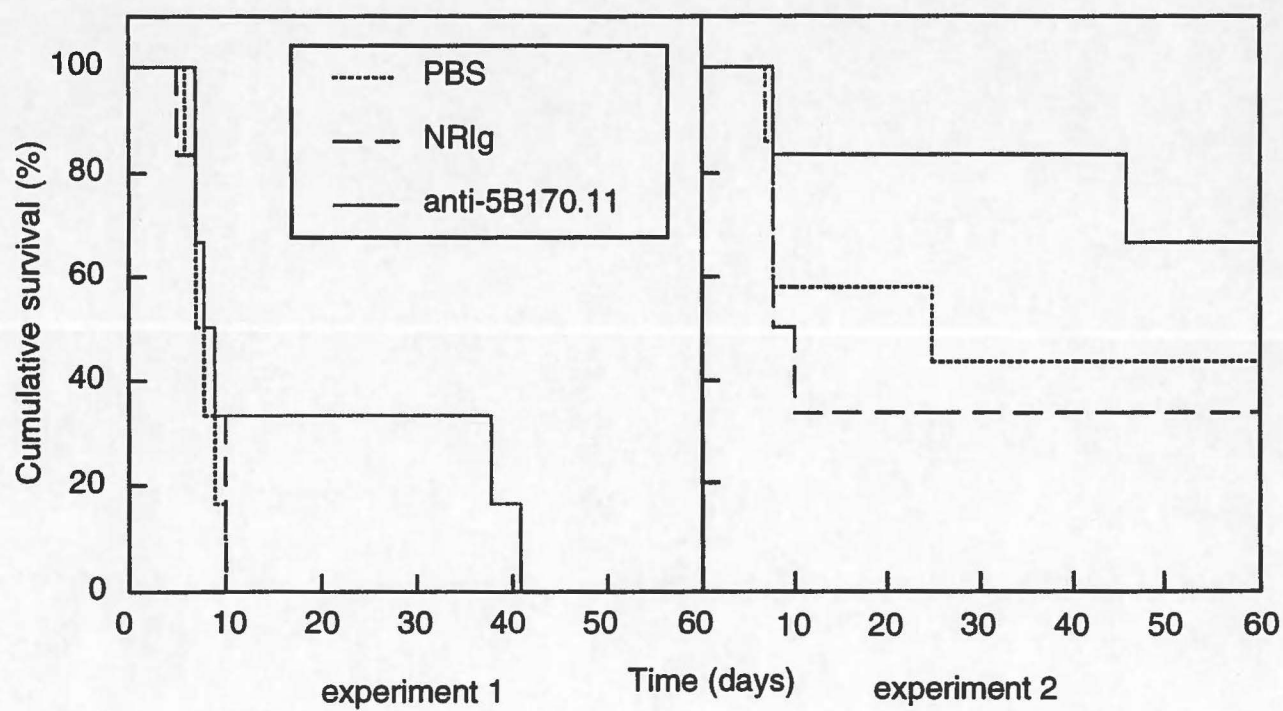
**Figure 1:** Inhibition of attachment assay for discrimination of  $\alpha$ -type from  $\beta$  and  $\gamma$ -type anti-Id. Microtiter plates were coated with 5  $\mu\text{g/mL}$  of viral antigen. Biotinylated MAb1 and dilutions of purified Ab2 or NR1g were pre-incubated together and transferred onto the viral antigen-coated plates. The residual binding of MAb1 to viral antigens was detected using peroxidase-labeled streptavidin.

Figure 1

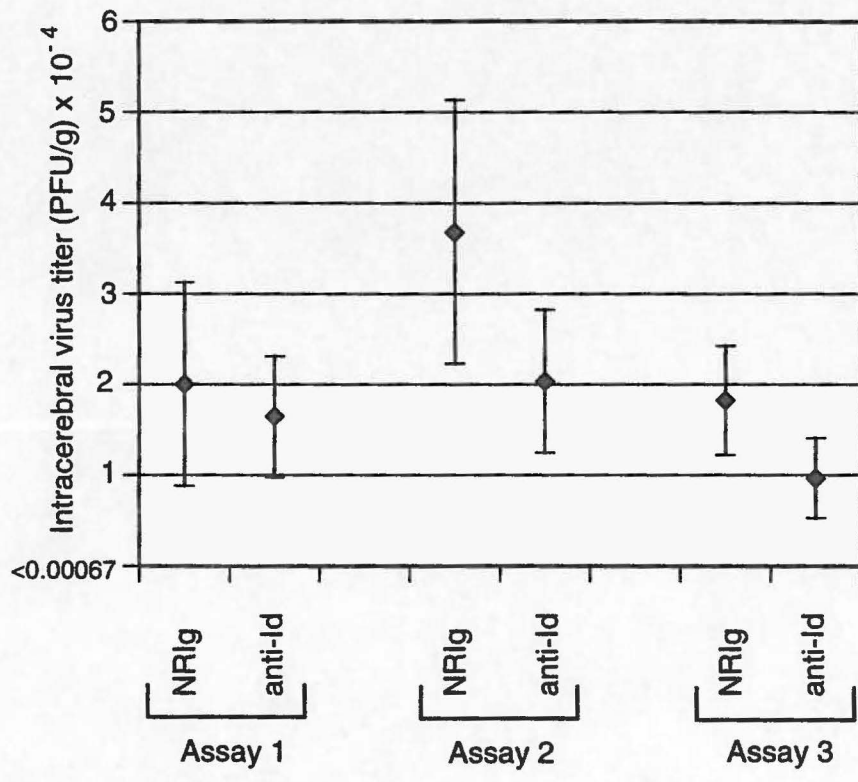


**Figure 2:** Survival curves of mice immunized with polyclonal Ab2 anti-5B170.11. Groups of 6 BALB/c mice were immunized with Ab2, NRIg or PBS and challenged with 10 LD<sub>50</sub> of MHV-JHM. A: experiment 1; B: experiment 2.



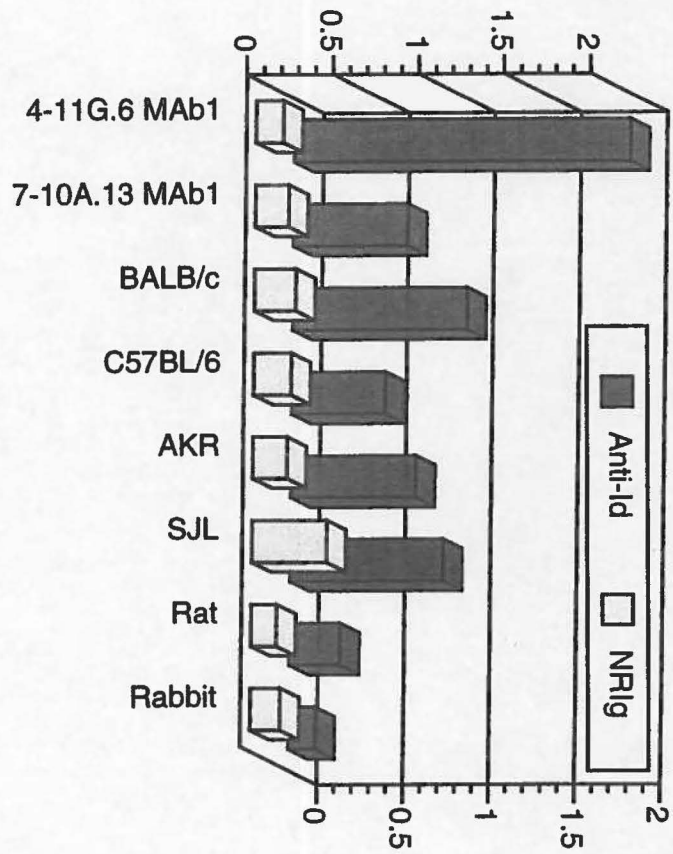


**Figure 3:** Brain viral titers observed after anti-Id and NRlg treatments. Virus titers from brains of mice immunized with Ab2 anti-5B170.11 or NRlg were quantitated by plaque assay.



**Figure 4:** Detection of idiotype by Ab2. Microtiter plates were coated with 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of purified polyclonal Ab2 anti-4-11G.6 or NRlg. The binding of syngeneic (BALB/c), allogeneic (C57BL/6, AKR, SJL) and xenogeneic (rat and rabbit) anti-viral sera produced against MHV-A59 was determined by ELISA using peroxidase-labeled species-specific anti-Ig.

Absorbance (492 nm)



**CHAPITRE 4:**

**ETUDE DE L'INDUCTION D'UNE REponse IMMUNITAIRE  
PROTECTRICE CONTRE LE CORONAVIRUS NEUROTROPE PAR  
DES PHAGES SELECTIONNES DE BANQUES PEPTIDIQUES.**

## Introduction à l'article V

Dans le but de mieux définir les mécanismes de protection contre l'infection coronavirale, il a été important de caractériser les épitopes contre lesquels les anticorps anti-idiotypiques protecteurs ont été générés. Les banques de phages exprimant à leur surface des peptides offrent une approche intéressante pour l'identification d'épitopes continus et discontinus reconnus par des AcMo ainsi que pour l'étude des propriétés immunogéniques des séquences sélectionnées. Les résultats obtenus pour cette partie du projet ont été soumis pour publication et constituent ce dernier chapitre. Cette étude a été effectuée avec la collaboration du Dr Jamie K. Scott, de la Simon Fraser University en Colombie-Britannique, qui a sélectionné et séquencé les phages portant les peptides liant le plus fortement les AcMo.

Nous rapportons dans cette publication, la caractérisation d'épitopes continus et discontinus d'AcMo anti-glycoprotéine de surface S du coronavirus murin. Douze banques peptidiques différentes ont été criblées avec les AcMo 5B170, 7-10A et 5B19 qui tous les trois sont capables de neutraliser le virus *in vitro* et de protéger des souris non sensibilisées. La séquence de l'épitope continu reconnu par l'AcMo 5B19 étant déjà connue, celui-ci a servi de témoin positif dans cette étude. La séquence en acides aminés d'un phage sélectionné par l'AcMo 7-10A suggère la localisation de l'épitope discontinu dans la région N-terminale de la sous-unité S1. Les séquences en acides aminés obtenues avec l'AcMo 5B170 ont confirmé la reconnaissance du même épitope que celui reconnu par l'AcMo 5B19, malgré que le séquençage des régions variables de ces deux anticorps ait révélé que ces AcMo ne sont pas identiques. De façon plus importante, nous avons démontré l'utilisation directe des phages sélectionnés pour une vaccination protectrice chez des souris C57BL/6. D'ailleurs, des anticorps reconnaissant spécifiquement la région immunodominante, tout comme l'AcMo 5B170 qui a sélectionné le phage, ont été détectés dans le plasma des souris immunisées. A notre connaissance, cette étude constitue la première démonstration d'une vaccination protectrice par des peptides exprimés à la surface de phages et sélectionnés par des AcMo.

**ARTICLE V**

**PROTECTIVE VACCINATION AGAINST CORONAVIRUS USING  
PHAGE-DISPLAYED PEPTIDES SELECTED BY NEUTRALIZING  
ANTIBODIES.**

**Mathilde W.N. Yu, Jamie K. Scott\* et Pierre J. Talbot**

**Laboratoire de neuroimmunovirologie,  
Institut Armand-Frappier, Université du Québec  
Laval, Québec, Canada H7V 1B7  
et \*Institute of Molecular Biology and Biochemistry,  
Simon Fraser University, Burnaby, British Columbia, Canada V5A 1S6.**

**Article soumis pour publication**



## Sommaire traduit

Des banques de phages exprimant à leur surface des peptides, ont été utilisées pour cartographier des épitopes continus et discontinus, d'importance immunologique sur la glycoprotéine de surface (S) du coronavirus murin neurotrope (MHV-A59). Trois AcMo neutralisant le virus *in vitro* et protecteurs *in vivo*, ont été utilisés pour cribler douze différentes banques de phages. Dans ces banques, les peptides sont présentés sur les protéines majeures pVIII du bactériophage fd. Ce criblage a permis d'identifier des séquences consensus qui correspondent à de courtes régions au sein de la glycoprotéine S. La séquence d'un peptide liant fortement l'AcMo a permis la localisation potentielle d'un épitope discontinu dans la région N-terminale de la sous-unité S1. De plus, plusieurs phages liant fortement les AcMo ont été amplifiés et ont servi directement d'immunogènes chez des souris BALB/c et C57BL/6. Des souris C57BL/6 vaccinées avec une préparation phagique exprimant un épitope linéaire, ont été protégées contre l'infection létale. Cette protection est en corrélation avec la présence d'un niveau suffisant d'anticorps antiviraux reconnaissant le même domaine immunodominant que l'AcMo qui a servi à la sélection. Les phages exprimant des peptides à leur surface peuvent donc être directement utilisés pour induire des réponses immunitaires protectrices contre le virus. Cette étude représente la première démonstration d'une vaccination protectrice avec des phages sélectionnés par un AcMo.

**ABSTRACT**

Phage-displayed peptide libraries were used to map immunologically-relevant epitopes on the surface (S) glycoprotein of a neurotropic murine coronavirus (MHV-A59). Three *in vitro* virus-neutralizing and *in vivo* protective mAbs against either continuous or discontinuous epitopes on the S glycoprotein were used to screen twelve different peptide libraries expressed on the pVIII major coat protein of the fd filamentous bacteriophage. Consensus sequences were identified that matched short sequences within the S glycoprotein. The sequence of a tight-binding, mAb-selected peptide suggested the location of a discontinuous epitope within the N-terminal S1 subunit. Several tightly-binding phage were amplified and used directly as immunogens in BALB/c and C57BL/6 mice. Protection of C57BL/6 mice against a lethal acute virus infection was achieved with a phage preparation that displayed a linear epitope. Protection correlated with the presence of sufficient levels of specific antiviral antibodies recognizing the same immunodominant domain, located within the C-terminal S2 subunit, as the selecting mAb. Thus, phage-displayed peptides can be used directly to induce protective anti-viral immune responses. This is the first demonstration of protective immunization induced by mAb-selected phage-displayed peptides.

## INTRODUCTION

Coronaviruses are enveloped, positive-stranded RNA viruses of the *Coronaviridae* family (1). Among the identified viral structural proteins, the surface (S) glycoprotein forms spike projections from the surface of the virion, and is involved in binding to cellular receptors and in membrane fusion (2-4). It is also the target of humoral and cellular immune responses (3, 5, 6). Moreover, various reports have emphasized the protective capacity of anti-S glycoprotein antibodies (7, 8). A proteolytic cleavage site divides the S glycoprotein into two subunits, the N-terminal S1 and the C-terminal S2 (4, 9). It is believed that S1 forms the bulbous part of the spike and S2 the stalk portion (10). It has also been shown that the N-terminal region of the S1 subunit is involved in binding to the cellular receptor (11). Murine coronaviruses, also called mouse hepatitis viruses (MHV<sup>3</sup>), induce various respiratory, gastrointestinal and neurological infections in rodents. The neurotropic strains A59 and JHM lead to infections of the central nervous system that result in an acute lethal encephalitis (12, 13). Mice who survive the acute infection develop a chronic demyelinating disease resembling human multiple sclerosis (14).

We have used a panel of specific mAbs to characterize the molecular determinants of the S glycoprotein that are involved in the induction of a protective immune response against MHV-A59-induced lethal encephalitis. MAbs 7-10A, 5B19 and 5B170 were selected for the present study since they neutralize virus infectivity *in vitro* and passively protect BALB/c mice against lethal infection *in vivo* (8, 15). MAb 7-10A was predicted to recognize a discontinuous epitope on the S1 subunit since it did not bind to the denatured S glycoprotein in Western immunoblots (15) and did bind to purified, native S1 subunit (P.J. Talbot and K.V. Holmes, unpublished data). In contrast, mAbs 5B19 and 5B170 recognize linear epitopes within an immunodominant region of the S2 subunit (16); critical binding residues have been identified for mAb 5B19 (17). A previous study using papain- and pepsin-derived fragments or recombinant single chain Fv molecules derived from mAb 7-10A showed that the Fc portion of this antibody is not required for neutralization of MHV-A59 *in vitro* and *in vivo* (18, 19); this mAb can also induce protective anti-idiotypic antibodies (20).

Phage-displayed peptide libraries offer an attractive approach for the identification of discontinuous (21, 22) and linear peptide ligands for mAb (22-26), and for studying the immunogenic properties of the selected sequences (27-30). We now report on the characterization of epitopes recognized by protective anti-coronavirus antibodies and, more importantly, demonstrate the direct use of a selected phage for protective vaccination. Protection correlated with the production of specific antiviral antibodies. To our knowledge, this study is the first demonstration of protective vaccination by mAb-selected phage-displayed peptides.

## MATERIALS AND METHODS

### *Animals*

Four to 5-week-old MHV-seronegative BALB/c and C57BL/6 mice were purchased from Charles River, St-Constant, Québec.

### *Virus, cells and viral production*

The A59 strain of MHV was initially obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD), plaque-purified twice, and passaged four times at a multiplicity of infection of 0.01 on DBT astrocytoma cells (31) as described previously (32). The DBT cells were a gift of Dr. Michael J. Buchmeier (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA). N-11 immortalized mouse microglial cells (33), were provided of Drs. Yves Lombard and Jacques Borg (Université Louis Pasteur de Strasbourg, Illkirch). Persistently infected N-11 cells were obtained by infecting the cells with MHV-A59 at a multiplicity of infection of 0.9. After a 60-min incubation at 37°C with 5% (v/v) CO<sub>2</sub>, the cells were washed twice with 10 ml of PBS, pH 7.4, then 10 ml of RPMI medium supplemented with 10% (v/v) FCS were added. The infected cells were incubated at 37°C with 5% (v/v) CO<sub>2</sub> for 2 days before being passaged. Cells were tested for production of infectious virus at each passage by plaque assay as described previously (32). Virus production levels varied between  $3 \times 10^4$  to  $2 \times 10^7$  PFU/ml.

### *Monoclonal antibodies*

We have previously reported the production and characterization of a mouse hybridoma secreting the neutralizing mAb 7-10A, which is specific for a discontinuous epitope on the S glycoprotein of MHV-A59 (15). The mAbs 5B170 and 5B19, which are specific for continuous epitopes on the S glycoprotein (3, 16, 17) of MHV-JHM (conserved in MHV-A59) were a kind gift of Dr. Michael J. Buchmeier (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA). A mAb against

murine ICAM-1 (YN1/1.7.4, CRL 1818; ATCC) was used in some tests: it was a kind gift of Dr. Yves St-Pierre (Institut Armand-Frappier). An isotype control mAb for ELISA was specific for anti-c-myc (CRL 1729; ATCC). All these antibodies were purified by standard Protein-A-Sepharose chromatography (34).

#### *Nucleotide sequencing of mAb cDNAs*

Isolation of total cellular RNA from hybridoma cells, RT-PCR and nucleotide sequencing were performed as described previously (19). Briefly, total cellular RNA from 5B19 and 5B170 hybridomas was isolated by cesium chloride density gradient centrifugation and 2.5 mg of total RNA were reverse-transcribed with Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Pharmacia Canada Inc., Baie-d'Urfé, Québec) using the MOCG12FOR primer (19). Then, PCR amplification of the VH cDNA was performed using *Taq* DNA polymerase (BIO/CAN Scientific, Mississauga, Ontario) with the VH1FOR and VH1BACK primers (19). The PCR products were then cloned into the pCRII TA cloning vector (Invitrogen Corporation, San Diego, CA) according to the manufacturer's instructions. Nucleotide sequencing was performed on both strands by the dideoxynucleotide chain termination method, using T7 DNA polymerase (Pharmacia) and [ $\alpha$ - $^{35}$ S] dATP (ICN Pharmaceuticals Canada Ltd., Montréal, Québec) according to the manufacturer's instructions. Nucleotide sequences were analyzed with GeneWorks<sup>®</sup> 2.5.1 software (Oxford Molecular, Oxford), BLAST analysis (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) and DNAPLOT analysis (<http://www.genetik.uni-koeln.de/dnplot/>).

#### *Peptide libraries*

The twelve phage-displayed peptide libraries used in this study were: X<sub>6</sub>, X<sub>15</sub>, X<sub>8</sub>CX<sub>8</sub>, X<sub>15</sub>CX, XCX<sub>15</sub>, XCX<sub>4</sub>CX (LX4), XCX<sub>6</sub>CX (LX6), XCX<sub>10</sub>CX (LX10), X<sub>5</sub>CX<sub>3</sub>CX<sub>5</sub> (Cys3), X<sub>5</sub>CX<sub>4</sub>CX<sub>5</sub> (Cys4), X<sub>5</sub>CX<sub>5</sub>CX<sub>4</sub> (Cys5) and X<sub>4</sub>CX<sub>6</sub>CX<sub>4</sub> (Cys6), where X represents a randomized amino acid and C represents a fixed cysteine residue. The Cys3-6 libraries were kindly provided by Dr. G.P. Smith (University of Missouri-Columbia); the remaining libraries were constructed as described (35). Peptides are expressed at the N-terminus of the major coat protein (pVIII) of the phage vector f88.4 (36).

### *Affinity selection of phage libraries*

Screening of the peptide libraries with antibodies is described in detail elsewhere (35). Briefly, microtiter wells were coated with streptavidin, then biotinylated mAb. Phage libraries ( $10^{11}$  particles/library) were added to each of eleven wells, with f88.4 phage being used in a twelfth well as control. Phage were allowed to bind for 4 hours at 4°C, then the plates were washed using an automated plate washer. Bound phage were eluted in acid, and the eluates were neutralized and used to infect K91 *E. coli* cells. The cells were grown in microtiter wells in LB medium containing tetracycline. The phage produced were used in subsequent rounds of panning, or infected clones were chosen at random from selected phage pools, and used for ELISA and DNA sequencing.

### *Nucleotide sequencing of phage DNA*

Nucleic-acid sequencing protocols are described in detail elsewhere (35, 37). Briefly, the DNA from  $\sim 10^{11}$  PEG-purified virions was released by treatment in 180 mM NaOH containing sequencing primer. The solutions were neutralized, and dideoxynucleotide sequencing was performed using Sequenase and 5'[ $\alpha$ - $^{35}$ S]dATP. Labeled reactions were analyzed by polyacrylamide-gel electrophoresis under denaturing conditions.

### *ELISA in reducing conditions*

Ninety-six well flat-bottomed microtiter plates (ICN) were coated with 1  $\mu$ g/well of caprylic-acid purified, rabbit anti-phage antibody (35) or with MHV-A59-infected DBT cell lysate (60 ng/well in PBS, pH 7.4), and incubated for 16 hours at room temperature. The plates were blocked with TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) containing 2% (w/v) BSA for 30 min at 37°C, then washed three times with TBS containing 0.1% (v/v) Tween 20 (TBS-T). Approximately  $10^{10}$  phage particles, purified by precipitation with PEG and NaCl (35), were added in 50  $\mu$ l aliquots to wells containing immobilized anti-phage antibody and incubated for 2 hours at 4°C. The plates were then washed six times with TBS-T. Fifty  $\mu$ l of 15  $\mu$ M DTT (Sigma Chemical Co.,

St-Louis, MO) were added to some wells and incubated for 30 min at 4°C. These wells were then washed once with 75 µl of 50 µM DTT. One-hundred µl of 60 nM mAb in TBS-T containing 50 µM DTT were then added, and incubated for 2 hours at 4°C. For non-DTT-treated wells, TBS-T was used instead. Plates were washed six times with TBS-T, then 100 µl peroxidase-labeled goat anti-mouse Fc antibody (ICN) diluted 1/2000 in TBS-T was added and incubated for 90 min at room temperature. The plates were washed six times with TBS-T, and specific mAb binding was revealed by the addition of 100 µl of 2.2 mM *O*-phenylenediamine and 3 mM hydrogen peroxide. The enzymatic reaction was stopped by the addition of 100 µl of 1N HCl, and the absorbance was read at 492 nm using an SLT EAR 400 AT plate reader (SLT-Labinstruments, Austria).

#### *ELISA for determining cross-reactive phage recognition by mAb*

Ninety-six well flat-bottomed microtiter plates (ICN) were coated with 0.1 µg/well of purified 5B170 and 5B19 mAb, as well as an irrelevant anti-c-myc mAb used as an isotypic control. The plates were incubated for 16 hours at room temperature. Then, the plates were blocked with 150 µl of ELISA blocking solution [PBS, pH 7.4, containing 10% (v/v) FCS and 0.2% (v/v) Tween-20] for 2 hours at room temperature. Serial, five-fold dilutions of PEG/NaCl-precipitated phage (10 mg/ml) diluted 1/10 were added to the wells and incubated for 90 min at room temperature. Wells were washed five times with PBS-T (PBS, pH 7.4, containing 0.1% (v/v) Tween-20) and 100 µl peroxidase-labeled anti-M13 conjugate (Pharmacia Biotech Inc., Baie d'Urfé, Québec) diluted 1/5000 in ELISA blocking solution was added. Plates were incubated for 90 min at room temperature, and washed five times with PBS-T; the remaining steps were performed as described above.

#### *Phage immunization and protection assay*

Phage were purified by two consecutive PEG/NaCl precipitation steps and quantitated, assuming 1 mg/ml = 1 OD<sub>260</sub> (27). Groups of six BALB/c or C57BL/6 mice were immunized four times, at 14-day intervals, by i.p. injection of 1 mg of phage emulsified in complete Freund's adjuvant [1:1 (v/v); VWR/Canlab



Inc., Ville Mont-Royal, Québec] for the first injection and in incomplete Freund's adjuvant for the three subsequent booster doses. Seven days after the last injection, blood samples were drawn from the retro-orbital plexus. An intracerebral viral challenge was given three days later with 10 LD<sub>50</sub> (38) of MHV-A59, a dose that corresponds to  $5 \times 10^5$  PFU for BALB/c mice and  $6 \times 10^4$  PFU for C57BL/6 mice. This dose reproducibly yielded 100% mortality by 5 days after infection (20, 38). The statistical significance of survival of mice was examined with Cox's proportional hazards model (39).

#### *Neutralization assay*

Serial dilutions of mouse plasma were incubated in tubes with approximately 80 PFU of MHV-A59 for 60 min at 37°C. The mixtures were transferred in duplicate onto 12-well plates (ICN) containing confluent monolayers of DBT cells. After a 60-min incubation at 37°C with 5% (v/v) CO<sub>2</sub>, the virus-antibody mixtures were removed and the cells were overlaid with 1.5% (w/v) Bacto-Agar (Difco Laboratories, Detroit, MI) in Earle's minimal essential media/Hanks' M199, 1:1 (v/v) (Canadian Life Technologies Inc., Burlington, Ontario), supplemented with 5% (v/v) FCS and 50 µg/ml gentamicin (Canadian Life Technologies, Inc.). The plates were incubated for 48 hours at 37°C with 5% (v/v) CO<sub>2</sub>. The cells were then fixed with 25% (v/v) formalin and stained with 0.1% (w/v) crystal violet. Plaques were counted visually and viral neutralizing titers were expressed as the reciprocal of the dilution of plasma that neutralized 50% of viral input. A known virus-neutralizing mAb (5B170) was used as positive control.

#### *Western immunoblotting*

Ten µg of the previously-described immunodominant region of the S2 subunit of the MHV S glycoprotein expressed in *E. coli* (16) were electrophoresed on 10% (w/v) polyacrylamide gels in SDS buffer (40) and transferred to a 0.45 µm nitrocellulose membrane (Amersham Life Science Inc., Oakville, Ontario). Following transfer, the nitrocellulose membrane was blocked with PBS-T for 30 min at room temperature and cut into strips. Strips were

incubated for 90 min at room temperature with 1.5 ml of mouse plasma diluted 1/500 in PBS-T, then washed five times with PBS-T. The strips were then incubated for 90 min at room temperature with 1.5 ml horseradish peroxidase-labeled goat anti-mouse IgG (H+L) (Kirkegaard and Perry, Gaithersburg, MD) diluted 1/500 in PBS-T. The strips were washed five times with PBS-T, and specific antibody binding was revealed with 0.5 mg/ml of 4-chloro-1-naphtol (Bio-Rad, Mississauga, Ontario) and 0.01% (w/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The reaction was stopped after 30 min by washing in deionized water.

#### *Antibody-dependent complement-mediated cytotoxicity*

Approximately  $1.5 \times 10^7$  N-11 cells persistently infected with MHV-A59, as described above, were labeled with 600 mCi of sodium chromate (Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>, ICN Pharmaceuticals Canada Ltd.) in flat-bottomed microwells for 18 hours at 37°C with 5% (v/v) CO<sub>2</sub>. Labeled target cells were then washed four times with Hank's balanced sodium salts (HBSS; Canadian Life Technologies) and detached by adding 0.4 mM EDTA (Anachemia, Montréal, Québec) for 5 min. Flat-bottomed microtiter wells were seeded with 10<sup>4</sup> target cells per well and the cells were allowed to bind to the plastic for 2 hours at 37°C. The medium was aspirated and mouse plasma was serially diluted in RPMI medium containing 10% (v/v) FCS, and added in triplicate to the target cells, in a final volume of 100 µl per well. After 1-hour incubation at 37°C, the antibodies were aspirated and 100 µl/well of rabbit complement (Pel-Freez, Rogers, Arkansas), diluted 1/15 in RPMI medium containing 10% (v/v) FCS, were added and allowed to react for 45 min at 37°C and 5% (v/v) CO<sub>2</sub>. For determination of spontaneous and maximum release, medium or 5% (v/v) Triton X-100 was added to the wells, respectively, followed by 100 µl/well of RPMI medium without FCS. The cells were then centrifuged at 200 x g for 8 min, and 150 µl of supernatant was collected from each well and counted for radioactivity in a Beckman Gamma 7000 counter [Beckman Instruments (Canada) Inc., Mississauga, Ontario]. A mAb against murine ICAM-1 was used as a positive control.

Results are expressed as percent specific release:

$$100 \times \frac{(\text{cpm experimental} - \text{cpm spontaneous})}{(\text{cpm maximum} - \text{cpm spontaneous})}$$

*Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*

Mouse plasma was serially diluted and added in quadruplicate to flat-bottomed microwells, with a final volume of 50  $\mu$ l per well. Ten thousand target cells/well (50  $\mu$ l), prepared as described above, were added to the diluted plasma and the mixture was incubated for 1 hour at 37°C. One million naive BALB/c mouse splenocytes per well (100  $\mu$ l) were added as effector cells to the mixture of target cells and sera. For determination of spontaneous and maximum release, medium or 5% (v/v) Triton X-100 was added to the wells, respectively. Plates were incubated for 6 hours at 37°C with 5% (v/v) CO<sub>2</sub>. At the end of the incubation period, plates were centrifuged, the supernatant collected and the results expressed as described above.

## RESULTS

### *Selection and characterization of phage-displayed peptides by mAb 7-10A, 5B19 and 5B170.*

The mAbs 7-10A, 5B19 and 5B170 were used to screen, side-by-side, different conformationally-constrained and unconstrained phage libraries. As indicated in Table I, phage pools having the highest yields and ELISA signals were selected for further study. From these, phage clones were isolated and sequenced in the nucleotide region encoding the displayed peptides (Table II). As illustrated in Table I, the highest yields in rounds 3 and 4 of panning for all three mAbs were from libraries displaying one or two fixed cysteine residues, and the ELISA data showed further restriction of the tightest binding-phage to a single library for each mAb. Analysis of the amino-acid sequences of the selected phage allowed the identification of consensus sequences for peptides recognized by the antiviral mAbs 5B19 and 5B170, which recognize continuous epitopes (Table II). The critical binding sequence for each of these two mAbs was very similar since phage selected by both mAbs cross-reacted: phage selected by mAb 5B170 were recognized strongly by mAb 5B19, and vice-versa, albeit at a lower level, whereas no phage reacted with the isotypic control mAb (Figure 1). For mAb 7-10A, which recognizes a discontinuous epitope (15), consensus amino acid sequences were more difficult to identify; this is typical of antibodies against discontinuous epitopes (*e.g.*, see 41, 42).

Figure 2 illustrates the amino-acid identities between selected phage-displayed peptides and murine coronavirus S glycoprotein sequences. In contrast with other studies (41-43), amino-acid identity was obtained for phage 12.9, selected by mAb 7-10A, and a linear region of the S glycoprotein of several coronavirus strains. The 7-10A mAb recognizes a discontinuous epitope on S1, as shown by binding studies on isolated S glycoprotein subunits (P.J. Talbot and K.V. Holmes, unpublished data). Clone 12.9 contains two cysteines and bears similarities to residues 153-161 of the S glycoprotein of murine hepatitis virus (MHV). This clone represents the first sequence information obtained on the epitope recognized by mAb 7-10A.

For mAb 5B170, Figure 2 shows that three different phage clones had amino-acid identity with sequences of the S glycoprotein of MHV. Sequences within and including the C(V/I)GSXC consensus of clones 7.2 and 8.3 show a match of six amino acids within residues 850-857 of MHV-A59 (44), 902-909 of MHV-4 (45) and MHV-JHM (cl-2) (46) and 761-768 of MHV-JHM (47). Moreover, the matching sequence of clone 8.3 is almost exact with the residues mentioned above since the Ile to Val amino acid change is conservative. Finally, the matching sequence observed for clone 9.1 shares almost complete identity with residues 890-897 of MHV-Y (48); it also shares six amino acids with the same residues described above. This is the first detailed information reported on the epitope recognized by mAb 5B170, which was only known to bind to an immunodominant region on S2 subunit of the S glycoprotein (16). This epitope appears to be conserved among several strains of MHV.

We used mAb 5B19 as a positive control for our experiments since synthetic peptide scanning (PEPSCAN) was previously used to characterize the epitope recognized by this mAb (17). The peptide sequence that it selected bears the C(V/I)GSXC consensus identified by mAb 5B170, confirming our results. This result is consistent with previous epitope mapping by ELISA (16) showing that mAbs 5B170 and 5B19 compete with each other for binding to virus. The sequences of the binding region for both antibodies are identical in MHV-JHM and A59, suggesting that the epitopes recognized by mAbs 5B19 and 5B170 are conserved on the S2 subunit of MHV. To exclude the possibility that these two mAbs are the same or closely related antibody, the V<sub>H</sub> regions of both antibodies were sequenced. Table III illustrates the very different amino acid sequences of complementarity-determining regions (CDR) of mAbs used in this study.

To evaluate the importance of disulfide bridging in binding to mAbs, an ELISA test was performed in the presence or absence of the reducing agent DTT. The results shown in Figure 3 indicate that disulfide bridging within the phage-displayed peptides was more important for recognition by mAb 7-10A than for mAbs 5B19 and 5B170, since the binding of mAb 7-10A with peptides was more affected by DTT. As a control, immobilized virus was also treated with DTT; the binding of mAb 7-10A to virus was not affected (Figure 3, panel B). However, the binding of mAbs 5B19 and 5B170 with the virus was unexpectedly

more affected when the virus was treated with DTT. The results suggest that the two cysteines observed in the peptides recognized by mAbs 5B19 and 5B170 may directly interact with the mAb binding site, or that disulfide constraints are important but not absolutely required for binding. The alignment analysis shown in Figure 2 (panel c), in which two cysteines form a portion of the epitope, is supported by the fact that several of the clones selected by mAb 5B170 came from the X8CX8 library, in which only one Cys residue is fixed. The second, C-terminal Cys residue in the sequence was selected by mAb from a fully-randomized residue.

#### *Immunization and induction of a protective immunity*

It was previously shown that the epitope recognized by mAb 5B19 is able to protect BALB/c mice when used as an immunogen (16, 49). Having identified peptides that are recognized by three *in vitro* neutralizing and *in vivo* protective mAbs, we examined whether these peptides, displayed on the phage surface, could be used directly as immunogens for the induction of neutralizing and protective antibodies in mice. Selected phage showing relatively strong ELISA signals were injected into both BALB/c and C57BL/6 mice; it has been shown that C57BL/10 mice respond better than BALB/c mice for induction of specific anti-peptide antibodies, using the phage itself as a carrier molecule (27). Four i.p. injections were given, followed by viral challenge 10 days after the last injection. The survival of mice was then evaluated. As shown in Figure 4, of all the different phage selected by the three mAbs, only the mAb 5B170-selected clone 9.1 induced a statistically significant protective immune response against the lethal coronavirus infection. Three of six C57BL/6 mice were protected whereas no BALB/c mice immunized with the same phage 9.1 survived the viral challenge. Mice immunized with control vector phage or other selected phage died between days 4 and 9 after the viral challenge, a normal outcome of acute viral encephalitis. The observed survival of one of six C57BL/6 mice immunized with clone 12.4 selected by mAb 7-10A was not statistically significant.

### *Humoral immune response*

To evaluate the possible humoral immune mechanisms underlying the observed, statistically-significant protection of C57BL/6 mice by the mAb 5B170-selected clone 9.1, post-immunization plasma samples were tested by ELISA for the detection of antiviral antibodies. Antiviral antibodies were specifically induced in protected C57BL/6 mice (Table IV); this was statistically significant with a  $p$  value of 0.01 from the Mann-Whitney test (comparing means at a 1/500 plasma dilution). No statistically-significant levels of specific antiviral antibodies were detected in mice immunized with other selected phage or the control phage vector, suggesting a strong correlation between the presence of specific antiviral antibodies and protection.

To confirm the specificity of the antiviral antibodies induced by clone 9.1 to the displayed peptide, Western blotting was performed with a bacterially-expressed immunodominant S2 subunit region that includes the mAb 5B19 and 5B170 epitopes. As shown in Figure 5, plasma samples from C57BL/6 mice immunized with clone 9.1 strongly and specifically recognized the immunodominant S2 subunit region, as did mAb 5B170 used for panning. Even BALB/c mice, which were not protected against the viral infection, had raised specific antibodies to the immunodominant S2 subunit region, although the response appeared weaker (fainter bands). The immunoglobulin isotypic control and pre-immune plasma, as well as plasma from mice immunized with other phage, did not recognize the immunodominant region, confirming the specificity of antiviral antibodies to the phage-displayed peptides.

To evaluate possible mechanisms of protection mediated by specific antiviral antibodies, we evaluated the *in vitro* virus neutralization activity. As shown in Table IV, no *in vitro* neutralization activity was detected at dilutions of plasma samples that could be tested, down to a dilution of 1/50. Moreover, antibody-dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC) and antibody dependent complement-mediated cytotoxicity (ADCCM) activities were also evaluated, but such activities were not detected either (down to a dilution 1/50 for ADCC and 1/10 for ADCCM; data not shown). Positive control mAbs were used in all the *in vitro* assays (except for the ADCC assay because, to our knowledge, no

positive mAb is available in the coronavirus system). For unknown reasons and despite numerous attempts in our laboratory, ADCC activities could not be demonstrated for various anti-MHV mAbs (data not shown).

In summary, we have used three *in vitro* neutralizing and *in vivo* protective anti-MHV mAbs to select phage-displayed peptides, which allowed further characterization of immunologically-relevant epitopes on the S glycoprotein of MHV-A59. Moreover, we were able to demonstrate protective vaccination of mice with a phage-displayed peptide. Protection correlated with the induction of specific antibodies.



## DISCUSSION

In this study, we used a panel of constrained and unconstrained phage-displayed peptide libraries to define binding motifs for and map the epitopes recognized by three murine coronavirus-specific mAbs. MAb 7-10A was thought to bind a discontinuous epitope (15) on the S1 subunit of the S glycoprotein of murine coronavirus (P.J. Talbot and K.V. Holmes, unpublished data); whereas mAbs 5B19 and 5B170 were known to bind linear epitopes on the S2 subunit of the S glycoprotein (16). Previous studies have shown that peptides can cross-react with linear, discontinuous and even non-proteinaceous epitopes (36, 50-52). All three mAbs selected binding phage from libraries encoding one or two fixed cysteine residues, but not from the unconstrained peptide libraries. Many of the sequences of the mAb-selected phage bore similarity with linear regions on the S glycoprotein of several murine coronaviruses. Immunization studies with a number of the tightest-binding phage revealed that one clone, whose displayed peptide was a linear-epitope mimic, was able to induce protective immunity in a significant proportion of mice.

For discontinuous epitopes, only limited identity is usually found between the sequence of a peptide mimic and that of the corresponding epitope on the protein antigen (40-42). In spite of the lack of an obvious consensus sequence among the clones selected with mAb 7-10A (Table II), clone 12.9, which reacted relatively strongly in ELISA, shares five to six homologous amino acids with a linear region between amino acids 153 to 161 of the S1 subunit of the S glycoprotein (Figure 2). This N-terminal, globular domain is involved in the binding of virus to cells (11); however, for several reasons, the epitope recognized by mAb 7-10A is probably not directly involved in binding to the cellular receptor. First, we have previously shown that mAb 7-10A only weakly inhibits virus binding to the cell, whereas it strongly neutralizes viral infectivity after the virus binds to the cell (Y. Salvas, S. Lemieux and P.J. Talbot, unpublished data). In contrast, mAb 5B19, whose epitope is located on the C-terminal, stalk-like S2 subunit, is far more potent than mAb 7-10A in inhibiting viral binding to cells (Y. Salvas, S. Lemieux and P.J. Talbot, unpublished data). Second, clone 12.9 did not inhibit the attachment of MHV-A59 to DBT cells (data not shown), suggesting that the displayed peptide did not bind to the cellular

receptor. Third, in a recent study (53), it was shown that amino-acid residues 62-65 on S1 are involved in binding to the cellular receptor; the mAb 7-10A epitope mimic displayed by clone 12.9 (Fig. 2) does not localize within this region.

In spite of the potential for conformational mimicry, mice immunized with clone 12.9 phage (as well as other phage selected by mAb 7-10A) did not survive a lethal doses of coronavirus (Figure 4). Presumably, the peptides selected by this mAb did not mimic the discontinuous epitope sufficiently and/or did not bind strongly enough to elicit detectable cross-reactivity with the viral antigen. The binding of mAb 7-10A to several clones that did not bear the same peptide sequence as clone 12.9 indicates that further studies using, for example, synthetic peptides bearing amino-acid replacements in the sequence of the clone 12.9 peptide, are needed to pinpoint the exact nature of this epitope. Such studies will be important given the apparent importance of this epitope in the virus life cycle. Indeed, we have been unable to select viable mAb 7-10A-resistant virus variants (P.J. Talbot, unpublished data) and mAb 7-10A very efficiently protects against acute viral infection (15), without apparent involvement of the Fc portion (18, 19).

Phage selected by mAbs 5B19 and 5B170 showed consensus sequences that share homology with the S2 subunit of the S glycoprotein. The C(I/V)GSXC motif selected by mAbs 5B19 and 5B170 from different phage libraries highlights the importance of these residues to antibody binding. Most phage selected by both mAbs bear two Cys residues separated by four amino acids. Peptides with this Cys pattern were even selected from libraries in which only one Cys was fixed (*i.e.* the X8CX8 library), suggesting the importance of the position of the two Cys in binding mAb. Yet, binding to these peptides was only mildly affected by reducing conditions (Figure 3), indicating that disulfide-bridge formation is not an absolute requirement for binding, and that the Cys residues may be interacting directly with the antibody binding site.

Previous studies suggest that mAbs 5B19 and 5B170 recognize identical or overlapping linear epitopes located within the immunodominant region of the S2 subunit (16, 17). Our data are consistent with these observations, since phage selected by both mAbs bear consensus sequences that are similar to a portion of the epitope characterized by Luytjes *et al.* (17). Moreover, phage

selected by either mAb were recognized by both mAbs, albeit with weaker binding for mAb 5B170 (Figure 1). This confirms that both mAbs recognize similar epitopes and that 5B19 has a stronger affinity than 5B170 for peptides selected by either antibody (Figure 1). The sequences of CDRs H1, H2 and H3 for the two mAbs bear little similarity and the mAbs derive from different VH families (Table III). Since the heavy-chain CDRs are likely to be involved in antigen binding (54), our results strongly suggest that these mAbs bind similar or identical epitopes on the S2 subunit by different mechanisms.

Tight-binding phage selected by mAbs 7-10A, 5B19 and 5B170 were used as antigens to immunize BALB/c and C57BL/6 mice. Of all the phage tested, only clone 9.1, selected by mAb 5B170, induced a statistically significant protective immune response in C57BL/6 mice (Figure 4), which correlated with the production of statistically significant levels of antiviral antibodies (Table IV), confirming that the S glycoprotein epitope mimicked by the phage-borne peptide is immunogenic in mice. Surprisingly, biological activities by which antibodies could mediate protection of C57BL/6 mice, such as neutralization, ADCC and ADCMC, were not detected. However, the presence of antibodies specific to the immunodominant region of the S2 subunit correlated with the protection observed (Figure 5). These results suggest the important role of the specific humoral immune response in clone 9.1-induced protection.

Interestingly, unprotected BALB/c mice immunized with clone 9.1, produced antiviral antibodies that reacted specifically with the immunodominant region of the S2 subunit in Western blots (Figure 5); however, as suggested by the intensities of the blotting signals, the concentration of antibodies was probably too low to protect these animals from a lethal coronavirus infection. Indeed, a recent report suggests that a minimal antibody concentration in serum is necessary for *in vivo* protection against vesicular stomatitis virus infection, and that protection is independent of antibody subclass, avidity and *in vitro* neutralizing activity (55). Furthermore, we have previously shown that BALB/c mice were protected against MHV infection by immunization with synthetic peptide A, which includes the epitope found by Luytjes *et al.* (17), when coupled to keyhole limpet hemocyanin. In this case, the protected mice also developed virus-specific antibodies that did not neutralize the virus *in vitro* (56).

Phage from clone 9.1 induced protective immunity, whereas the phage from other clones bearing the C(I/V)GSXC consensus sequence did not (Figure 4), even though they gave similar results in ELISA assay (Table II). This apparent discrepancy may be explained by differences between clones in the sequences flanking the consensus sequence. These flanking residues could alter the conformation of the presented peptide (57), and in only some cases, allow it to select virus cross-reactive B-cell clones. Thus, by allowing the mAbs to select binding peptides from random-peptide libraries, we were able to identify flanking regions that could not have been anticipated *a priori*. This emphasizes the major contribution that random-peptide libraries can make in identifying immunogenic epitopes.

Our use of the phage vector f88.4 (35) was in part based on the work of Greenwood *et al.* (58), who showed that peptides expressed on the pVIII major coat protein are more immunogenic than those expressed on the pIII minor coat protein; presumably, this is due to the higher copy number of the displayed peptide. Moreover, it has also been shown that peptides displayed on phage induce a stronger immune response than a peptide coupled to another carrier molecule (27, 59, 60). However, other studies have demonstrated that phage-displayed peptides selected by mAbs are not necessarily immunogenic. For example, a study by Felici *et al.* (41) reported that phage clones, selected for their ability to bind a mAb against the *Bordetella pertussis* toxin, failed to elicit a specific immune response against the toxin; whereas similar work by the same group on the human hepatitis B virus surface antigen (59) resulted in cross-reactive antibody production. Thus, the ability of an antibody-selected peptide mimic to elicit antibodies that will recognize a target antigen depends on a number of variables, including (i) its ability to mimic the structure of the epitope, (ii) its ability to bind specifically to the selecting antibody, and (iii) the structure and biological properties of the selecting antibody.

The genetics of the mouse could also play a role in vaccination; various studies have shown both successful vaccination in different strains of mice (60-62) and unsuccessful vaccination (29). In our work, successful immunization with peptides displayed on phage depended on the strain of mice used, which is consistent with the work reported by de la Cruz *et al.* (27). Moreover, Meola *et al.* (59) reported no significant differences between the two strains of mice

used, although C57BL mice tended to respond better, as we have also shown.

To our knowledge, this study shows for the first time an evaluation of a protective immune response produced by direct immunization with a phage-displayed peptide that was specifically selected by a pathogen-specific mAb. Several studies have reported mAb-selected peptides that can induce antibodies that, in turn, recognize the mAb's cognate antigen; these experimental systems, however, were not appropriate to evaluate protection (61-63). Recently, Bastien *et al.* (64) reported the induction of a protective immune response by immunizing BALB/c mice with a recombinant phage expressing a protective epitope of human respiratory syncytial virus that had been previously identified with synthetic peptides. Also, other authors have reported the induction of protection by the immunization with synthetic peptides that are homologous to the peptides presented by the selected phage (65, 66). Our study represents an example of the successful use of phage-displayed peptide libraries for epitope characterization, and emphasizes for the first time the possibility of a direct evaluation of protective immune responses induced by the selected peptide displayed by a phage carrier.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jarnail Mehroke and Mike Rashed for excellent technical support. We also thank Dr. Michael J. Buchmeier (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA) for his gift of hybridomas secreting mAbs 5B19 and 5B170.

## REFERENCES

1. Holmes, K.V., and M.M.C. Lai. 1996. *Coronaviridae: the viruses and their replication*. In: *Fields Virology*, B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley *et al.* eds., third edition, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, p.1075.
2. Williams, R.K., G.S. Jiang, and K.V. Holmes. 1991. Receptor for mouse hepatitis virus is a member of the carcinoembryonic antigen family of glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5533.
3. Collins, A.R., R.L. Knobler, H. Powell, and M.J. Buchmeier. 1982. Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for attachment and cell-cell fusion. *Virology* 199:358.
4. Sturman, L.S., C.S. Ricard, and K.V. Holmes. 1985. Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus: activation of cell-fusing activity of virions by trypsin and separation of two different 90 K cleavage fragments. *J. Virol.* 56:904.
5. Stohlman, S.A., C.C. Bergmann, R.C. van der Veen, and D.R. Hinton. 1995. Mouse hepatitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes protect from lethal infection without eliminating virus from the central nervous system. *J. Virol.* 69:684.
6. Williamson, J.S.P., and S.A. Stohlman. 1990. Effective clearance of mouse hepatitis virus from the central nervous system requires both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Virol.* 64:4589.
7. Nakanaga, K., K. Yamanouchi, and K. Fujiwara. 1986. Protective effect of monoclonal antibodies on lethal mouse hepatitis virus infection in mice. *J. Virol.* 59:168.

8. Buchmeier, M.J., H.A. Lewicki, P.J. Talbot, and R.L. Knobler. 1984. Murine hepatitis virus-4 (strain JHM) induced neurologic disease is modulated *in vivo* by monoclonal antibody. *Virology* 175:548.
9. Spaan, W., D. Cavanagh, and M. C. Horzinek. 1988. Coronaviruses: structure and genome expression. *J. Gen. Virol.* 69:2939.
10. De Groot, R.J., W. Luytjes, M.C. Horzinek, B.A.M. van der Zeijst, W.J.M. Spaan, and J.A. Lenstra. 1987. Evidence for a coiled-coil structure in the spike of coronaviruses. *J. Mol. Biol.* 196:963.
11. Kubo, H., Y. K. Yamada, and F. Taguchi. 1994. Localization of neutralizing epitopes and the receptor-binding site within the amino-terminal 330 amino acids of the murine coronavirus spike protein. *J. Virol.* 68:5403.
12. Cheever, F.S., J.B. Daniels, A.M. Pappenheimer, and O.T. Bailey. 1949. A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. I. Isolation and biological properties of the virus. *J. Exp. Med.* 90:181.
13. Weiner, L.P. 1973. Pathogenesis of demyelination induced by mouse hepatitis virus (JHM virus). *Arch. Neurol.* 28:298.
14. Siddell, S., H. Wege, and V. ter Meulen. 1983. The biology of coronaviruses. *J. Gen Virol.* 64:761.
15. Daniel, C., and P.J. Talbot. 1990. Protection from lethal coronavirus infection by affinity-purified spike glycoprotein of murine hepatitis virus, strain A59. *Virology.* 174:87.
16. Daniel, C., R. Anderson, M. J. Buchmeier, J. O. Fleming, W.J.M. Spaan, H. Wege, and P.J. Talbot. 1993. Identification of an immunodominant linear neutralization domain on the S2 portion of the murine coronavirus spike glycoprotein and evidence that it forms part of a complex tridimensional structure. *J. Virol.* 67:1185.



17. Luytjes, W., D. Geerts, W. Posthumus, R. Meloen, and W. Spaan. 1989. Amino acid sequence of a conserved neutralizing epitope of murine coronaviruses. *J. Virol.* 63:1408.
18. Lamarre, A., and P.J. Talbot. 1995. Protection from lethal coronavirus infection by immunoglobulin fragments. *J. Immunol.* 154:3975.
19. Lamarre, A., M.W.N. Yu, F. Chagnon, and P.J. Talbot. 1997. A recombinant single chain antibody neutralizes coronavirus infectivity but only slightly delays lethal infection of mice. *Eur. J. Immunol.* 27:3447.
20. Yu, M.W.N., S. Lemieux, and P.J. Talbot. 1996. Genetic control of anti-idiotypic vaccination against coronavirus infection. *Eur. J. Immunol.* 26:3230.
21. Chen, Y.-C.J., K. Delbrook, C. Dealwis, L. Mimms, I.K. Mushahwar, and W. Mandeck. 1996. Discontinuous epitopes of hepatitis B surface antigen derived from a filamentous phage peptide library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:1997.
22. Hoess, R.H., A.J. Mack, H. Walton, and T.M. Reilly. 1994. Identification of a structural epitope by using a peptide library displayed on filamentous bacteriophage. *J. Immunol.* 153:724.
23. Scott, J.K., and G.P. Smith. 1990. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 249:386.
24. Cwirla, S.E., E.A. Peters, R.W. Barrett, and W.J. Dower. 1990. Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378.
25. Felici, F., L. Castagnoli, A. Musacchio, R. Jappelli, and G. Cesareni. 1991. Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. *J. Mol. Biol.* 222:301.

26. Stephen, C.W., and D.P. Lane. 1992. Mutant conformation of p53: precise epitope mapping using a filamentous phage epitope library. *J. Mol. Biol.* 225:577.
27. de la Cruz, V.F., A.A. Lal, and T.F. McCutchan. 1988. Antigenicity and epitope mapping of foreign sequences via genetically engineered filamentous phage. *J. Biol. Chem.* 263:4318.
28. Minenkova, O.O., A.A. Il'ichev, G.P. Kishchenko, T.N. Il'icheva, Y.L. Khripin, S.F. Oreshkov, and V.A. Petrenko. 1993. Design of specific immunogen using bacteriophage M13 as carrier. *Mol. Biol.* 27:336.
29. Demangel, C., P. Lafaye, and J.C. Mazie. 1996. Reproducing the immune response against the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 with mimotopes selected from a phage-displayed peptide library. *Mol. Immunol.* 33:909.
30. Prezzi, C., M. Nuzzo, A. Meola, P. Delmastro, G. Galfrè, R. Cortese, A. Nicosia, and P. Monaci. 1996. Selection of antigenic and immunogenic mimics of hepatitis C virus using sera from patients. *J. Immunol.* 156:4504.
31. Kumanishi, T. 1967. Brain tumors induced with Rous Sarcoma virus, Schmidt-Ruppin strain. I. Induction of brain tumors in adult mice with Rous chicken sarcoma cells. *Jap. J. Exp. Med.* 37:461.
32. Daniel, C., and P.J. Talbot. 1987. Physico-chemical properties of murine hepatitis virus, strain A-59. *Arch. Virol.* 96:241.
33. Lutz, M.B., F. Granucci, C. Winzler, G. Marconi, P. Paglia, M. Foti, C.U. Abmann, L. Cairns, M. Rescigno, and P. Ricciardi-Castagnoli. 1994. Retroviral immortalization of phagocytic and dendritic cell clones as a tool to investigate functional heterogeneity. *J. Immunol. Methods* 174:269.
34. Manil, I., P. Motté, P. Pernas, F. Troalen, C. Bohuon, and D. Bellet. 1986. Evaluation of protocols for purification of mouse monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods* 90:25.

35. Bonnycastle, L. L. C., J. S. Mehroke, M. Rashed, X. Gong, and J.K. Scott. 1996. Probing the basis of antibody reactivity with a panel of constrained peptide libraries displayed by filamentous phage. *J. Mol. Biol.* 258:747.
36. Zhong, G., G.P. Smith, J. Berry, and R.C. Brunham. 1994. Conformational mimicry of a chlamydial neutralization epitope on filamentous phage. *J. Biol. Chem.* 269:24183.
37. Smith, P., and J. K. Scott. 1993. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods in Enzymol.* 217:228.
38. Talbot, P.J., G. Dionne, and M. Lacroix. 1988. Protection against viral encephalitis by a synthetic peptide selected for surface probability. In: *Technological advances in vaccine development*, Alan R. Liss, Inc., p.379.
39. Armitage, P., and G. Berry eds. 1987. *Statistical methods in medical research.*, second edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
40. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680.
41. Felici, F., A. Luzzago, A. Folgori, and R. Cortese. 1993. Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides. II. Selection of clones recognized by a protective monoclonal antibody against the *Bordetella pertussis* toxin from phage peptide libraries. *Gene* 128:21.
42. Luzzago, A., F., Felici, A., Tramontano, A., Pessi, and R. Cortese. 1993. Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides. I. Epitope mapping of human H ferritin using a phage library of constrained peptides. *Gene* 128:51.
43. Balass, M., Y. Heldman, S. Cabilly, D. Givol, E. Katchalski-Katzir, and S. Fuchs. 1993. Identification of a hexapeptide that mimics a conformation-dependent binding site of acetylcholine receptor by use of a phage-epitope library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10638.

44. Luytjes, W., L.S. Sturman, P.J. Bredenbeek, J. Charite, B.A. van der Zeijst, M.C. Horzinek, and W.J. Spaan. 1987. Primary structure of the glycoprotein E2 of coronavirus MHV-A59 and identification of the trypsin cleavage site. *Virology* 161:479.
45. Schmidt, I., M. Skinner, and S. Siddell. 1987. Nucleotide sequence of the gene encoding the surface projection glycoprotein of coronavirus MHV-JHM. *J. Gen. Virol.* 68:47.
46. Taguchi, F., T. Ikeda, and H. Shida. 1992. Molecular cloning and expression of a spike protein of neurovirulent murine coronavirus JHMV variant CI-2. *J. Gen. Virol.* 73:1065.
47. Grosse, B., and S.G. Siddell. 1993. Characterization of a monoclonal antibody resistant variant of MHV. *Adv. Exp. Med. Biol.* 342:177.
48. Kunita, S., L. Zhang, F.R. Homberger, and S.R. Compton. 1995. Molecular characterization of the S proteins of two enterotropic murine coronavirus strains. *Virus Res.* 35:277.
49. Koolen, M.J.M., M.A.J. Borst, M.C. Horzinek, and W.J.M. Spaan. 1990. Immunogenic peptide comprising a mouse hepatitis virus A59 B-cell epitope and an influenza virus T-cell epitope protects against lethal infection. *J. Virol.* 64:6270.
50. Harris, S.L., L. Craig, J.S. Mehroke, M. Rashed, M.B. Zwick, K. Kenar, E.J. Toone, N. Greenspan, F.-I. Auzanneau, J.-R. Marino-Albernas, B.M. Pinto, and J.K. Scott. 1997. Exploring the basis of peptide-carbohydrate crossreactivity: Evidence for discrimination by peptides between closely related anti-carbohydrate antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:2454.
51. Scott, J.K., D. Loganathan, R.B. Easley, X. Gong, and I.J. Goldstein. 1992. A family of concanavalin A-binding peptides from a hexapeptide epitope library *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5398.

52. Oldenburg, K.R., D. Loganathan, I.J. Goldstein, P.G. Schultz, and M.A. Gallop. 1992. Peptide ligands for a sugar-binding protein isolated from a random peptide library. *Proc. Natl., Acad. Sci. USA* 89:5393.
53. Saeki, K., N. Ohtsuka, and F. Taguchi. 1997. Identification of spike protein residues of murine coronavirus responsible for receptor-binding activity by use of soluble receptor-resistant mutants. *J. Virol.* 71:9024.
54. Ward, E. S., D. Güsson, A.D. Griffiths, P.T. Jones, and G. Winter. 1989. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature* 341:544.
55. Bachmann, M.F., U. Kalinke, A. Althage, G. Freer, C. Burkhart, H.-P. Roost, M. Aguet, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 1997. The role of antibody concentration and avidity in antiviral protection. *Science* 276:2024.
56. Daniel, C., M. Lacroix, and P.J. Talbot. 1994. Mapping of linear antigenic sites on the S glycoprotein of a neurotropic murine coronavirus with synthetic peptides: A combination of nine prediction algorithms fails to identify relevant epitopes and peptide immunogenicity is drastically influenced by the nature of the protein carrier. *Virol.* 202:540.
57. Vijayakrishnan, L., S. Sarkar, R.P. Roy, and K.V.S Rao. 1997. B cell responses to a peptide epitope. IV. Subtle sequence changes in flanking residues modulate immunogenicity. *J. Immunol.* 159:1809.
58. Greenwood, J., A.E. Willis, and R.N. Perham. 1991 Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage. Peptides from *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein as antigens. *J. Mol. Biol.* 220:821.
59. Meola, A., P. Delmastro, P. Monaci, A. Luzzago, A. Nicosia, F. Felici, R. Cortese, and G Galfrè. 1995. Derivation of vaccines from mimotopes. Immunologic properties of human hepatitis B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous phage. *J. Immunol.* 154:3162.

60. Lenstra, J.A., J.H.F. Erkens, J.G.A. Langeveld, W.P.A. Posthumus, R.H. Melen, F. Gebauer, I. Correa, L. Enjuanes, and K.K. Stanley. 1992. Isolation of sequences from a random-sequence expression library that mimic viral epitopes. *J. Immunol. Methods* 152:149.
61. Motti, C., M. Nuzzo, A. Meola, G. Galfré, F. Felici, R. Cortese, A. Nicosia, and P. Monaci. 1994. Recognition by human sera and immunogenicity of HBsAg mimotopes selected from an M13 phage display library. *Gene* 146:191.
62. Willis, A.E., R.N. Perham, and D. Wraith. 1993. Immunological properties of foreign peptides in multiple display on a filamentous bacteriophage. *Gene* 128:79.
63. Folgori, A., R. Tafi, A. Meola, F. Felici, G. Galfré, R. Cortese, P. Monaci, and A. Nicosia. 1994. A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera. *EMBO J.* 13:2236.
64. Bastien, N., M. Trudel, and C. Simard. 1997. Protective immune responses induced by the immunization of mice with a recombinant bacteriophage displaying an epitope of the human respiratory syncytial virus. *Virology* 234:118.
65. Stoute, J.A., W.R. Ballou, N. Kolodny, C.D. Deal, R.A. Wirtz, and L.E. Lindler. 1995. Induction of humoral immune response against *Plasmodium falciparum* sporozoites by immunization with a synthetic peptide mimotope whose sequence was derived from screening a filamentous phage epitope library. *Infect. Immun.* 63:934.
66. Steward, M.W., C.M. Stanley, and O.E. Obeid. 1995. A mimotope from a solid-phase peptide library induces a measles virus-neutralizing and protective antibody response. *J. Virol.* 69:7668.

## FOOTNOTES

- <sup>1</sup> This work was supported by grant MT-9203 from the Medical Research Council of Canada to P.J.T. and by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to J.K.S. and the U.S. Army Research Office (Grant DAAL03-92-G-0178 to G.P. Smith, University of Missouri-Columbia). M.W.N.Y. received a studentship from the *Fonds pour la formation et l'aide à la recherche du Québec*. P.J.T. acknowledges a senior scholarship from the *Fonds de la recherche en santé du Québec*. J.K.S. was supported, in part, by a scholarship from the B.C. Health Research Foundation.
- <sup>2</sup> Address correspondence and reprint requests to: Dr. Pierre J. Talbot, Laboratoire de neuroimmunovirologie, Institut Armand-Frappier, 531 boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1 B7.
- <sup>3</sup> Abbreviations used in this paper: MHV, murine hepatitis virus; PFU, plaque-forming unit; ADCC, antibody-dependent cell mediated cytotoxicity; ADCMC, antibody-dependent complement mediated cytotoxicity; CDR, complementary determining region; VH, variable region of immunoglobulin heavy chain; TBS, Tris-buffered saline; TBS-T, TBS supplemented with 0.1% (v/v) Tween 20; PEG, polyethylene glycol.

**Table I:** Yields for each round (R) of panning for all peptide libraries.

mAb	Library	% Yield (log <sub>10</sub> )				ELISA OD (405-490 nm)	
		R1	R2	R3	R4	R3	R4
5B170	X6	-2.65	< -3.6	< -3.6	< -3.1	0.037	0.035
	LX6B	-3.9	< -3.6	< -3.6	< -3.1	0.032	0.031
	LX8	-3.7	< -3.6	< -3.6	< -3.1	0.032	0.034
	LX10	-3.9	< -3.6	< -3.6	< -3.1	0.031	0.031
	LX4	-3.9	< -3.6	<b>-0.2*</b>	-0.26	<b>0.091*</b>	0.153
	X15	-4.5	< -3.6	< -3.6	< -3.1	0.034	0.029
	X8CX8	-4.2	-4.5	-1.2	<b>-0.6*</b>	0.053	<b>0.185*</b>
	XCX15/X15CX	-4.1	< -3.6	< -3.6	< -3.1	0.035	0.037
	Cys3	-4.0	< -3.6	< -3.6	< -3.1	0.030	0.032
	Cys4	-1.7	< -3.6	-0.6	-0.1	0.038	0.087
	Cys5/6	-4.5	-2.7	-1.0	<b>-0.3*</b>	0.287	<b>0.526*</b>
f88.4	-5.3	< -3.6	< -3.6	< -3.1	0.037	0.059	
5B19	X6	-4.0	-1.6	< -3.6	< -3.1	0.017	0.016
	LX6B	-3.8	-2.7	< -3.6	< -3.1	0.018	0.016
	LX8	-3.8	< -3.6	<b>-2.2*</b>	< -3.1	<b>0.015*</b>	0.014
	LX10	-3.8	< -3.6	< -3.6	< -3.1	0.018	0.016
	LX4	-3.9	< -3.6	< -3.6	< -3.1	0.020	0.076
	X15	-4.5	< -3.6	< -3.6	< -3.1	0.015	0.015
	X8CX8	-3.9	< -3.6	<b>-1.7*</b>	< -3.1	<b>0.022*</b>	0.035
	XCX15/X15CX	-4.2	< -3.6	< -3.6	< -3.1	0.018	0.018
	Cys3	-4.1	< -3.6	< -3.6	< -3.1	0.013	0.013
	Cys4	-4.1	-2.8	<b>-0.8*</b>	-1.7	<b>0.811*</b>	0.690
	Cys5/6	-4.2	< -3.6	< -3.6	< -3.1	0.015	0.016
f88.4	-5.5	< -3.6	< -3.6	< -3.1	0.018	0.028	
7-10A	X6	-4.0	< -3.6	< -3.6	-2.2	0.147	0.068
	LX6B	-3.9	-0.7	-1.0	ND†	0.056	0.042
	LX8	-3.6	-2.1	<b>0.08*</b>	-0.3	<b>0.127*</b>	0.140
	LX10	-3.9	-2.6	-0.22	-0.9	0.104	0.081
	LX4	-3.7	< -3.6	-1.52	-0.61	0.047	0.047
	X15	-5.1	-1.9	-0.7	-2.2	0.114	0.077
	X8CX8	-3.9	-2.7	-0.5	-0.6	0.123	0.099
	XCX15/ X15CX	-4.0	-2.7	-0.5	<b>-0.9*</b>	0.070	<b>0.121*</b>
	Cys3	-4.0	< -3.6	-0.7	-0.6	0.090	0.159
	Cys4	-4.7	-2.1	-0.6	<b>-0.9*</b>	0.086	<b>0.523*</b>
	Cys5/6	-4.1	-1.8	-0.2	-0.3	0.189	0.305
f88.4	-4.5	< -3.6	< -3.6	< -3.1	0.041	0.055	

\* Phage pools selected for cloning are indicated in bold type

† ND: not determined



**Table II: Amino acid sequences of phage-displayed peptides selected with three mAbs**

mAb	Library*	Phage clone	Amino acid sequence†	ELISA OD (405-490)	Effect of DTT‡
5B170	Cys 4	9.1§, 9.3, 9.4, 9.5, 9.9	SASR <b>SCIGSQ</b> CSTTA	0.847	-
	LX4	7.2, 7.4, 7.6, 7.7, 7.8	<b>GCIGSYCV</b>	0.760	-
	X8CX8	8.3	GPALKPRG <b>CVGSTCFWA</b>	0.652	-
	X8CX8	8.1, 8.4	<b>AEGCVGRV</b> CDSRAMAVM	0.372	+/-
	X8CX8	8.2, 8.9	<b>SELCIGSVCT</b> FWTTRMR	0.170	ND
	f88.4			0.065	
5B19	Cys 4	33.2, 33.4, 33.5, 33.6, 33.9	ASTT <b>NCIGSQ</b> CLMTN	1.096	-
	f88.4			0.049	
7-10A	Cys 4	12.4, 12.5, 12.7, 12.8	DPARDCVH <b>NICIFAG</b>		
	Cys 4	12.9	ADREYCKY <b>TVCTYPG</b>	0.647	+
	LX8	10.10	RCKDLL <b>TLAKCH</b>	0.547	-
	LX8	10.1, 10.8	<b>NCRPRLE</b> LMPCV	0.392	ND
	X15CX	11.1	GMQAFF <b>RPRCAK</b> TLSCA	0.275	ND
	X15CX	11.5	<b>TDR</b> LDRCLPAISTDPCF	0.216	+
	X15CX	11.6	MRLQVSPETL <b>FWMECS</b>	0.210	+
	LX8	10.3	KCTN <b>TDRP</b> PFCQ	0.197	ND
	LX8	10.4	QCAPAWRGR <b>NCG</b>	0.181	BD#
	X15CX	11.10	SCLVVAG <b>DRWMH</b> LPSCE	0.150	ND
	f88.4			ND‡	ND
				0.141	

\* Randomized amino acids in each library are designated by X and C represents cysteine

† Consensus motifs are shown in bold type

‡ Not determined

§ Clone inducing protective antibody responses in some mice

¶ Data from Fig. 3

# Below detection level

**Table III:** Amino acid sequences of the H1 and H2 CDRs of mAbs 5B19 and 5B170.

mAb	VH family	CDR-H1	CDR-H2	CDR3-H3
7-10A*	ND†	SGYSWHW	YIHYSGSTTYNPSLKS	YYEYFDY
5B19	VH2	SYGVHW	VIMSDGSTTYNSALKS	EPPTYFAY
5B170	VH6	NYWMS	EIRLKSDNYVT	SAYGLY

\* Data from reference 19

† Not determined

**Table IV:** Induction of specific antiviral antibodies in mice immunized with phage-displayed peptides

Mouse strain	Phage clone	No. of mice	Corrected ELISA absorbance at 1/500 plasma dilution	Significance of ELISA absorbance value*	Neutralization titer†
C57BL/6	9.1	6	1.59 ± 0.50	0.01	< 1/50
	7.2	5	0.63 ± 0.13	NS‡	< 1/50
	8.3	6	0.62 ± 0.35	NS	< 1/50
	8.1	6	0.56 ± 0.26	NS	< 1/50
	10.3	5	0.63 ± 0.48	NS	< 1/50
	11.1	6	0.92 ± 0.41	NS	< 1/50
	11.5	6	0.51 ± 0.36	NS	< 1/50
	33.2	6	0.90 ± 0.72	NS	< 1/50
	12.4	5	0.42 ± 0.34	NS	< 1/50
	12.9	4	0.31 ± 0.32	NS	< 1/50
	f88.4	6	0.57 ± 0.43	ND§	< 1/50
BALB/c	9.1	6	1.03 ± 0.35	NS	< 1/50
	7.2	6	1.19 ± 0.65	NS	< 1/50
	8.3	5	0.64 ± 0.67	NS	< 1/50
	8.1	6	0.67 ± 0.16	NS	< 1/50
	10.3	6	0.44 ± 0.27	NS	< 1/50
	11.1	5	0.47 ± 0.40	NS	< 1/50
	11.5	6	0.66 ± 0.37	NS	< 1/50
	33.2	6	0.59 ± 0.25	NS	< 1/50
	12.4	6	0.48 ± 0.35	NS	< 1/50
	12.9	5	0.39 ± 0.37	NS	< 1/50
	f88.4	5	0.56 ± 0.39	ND	< 1/50

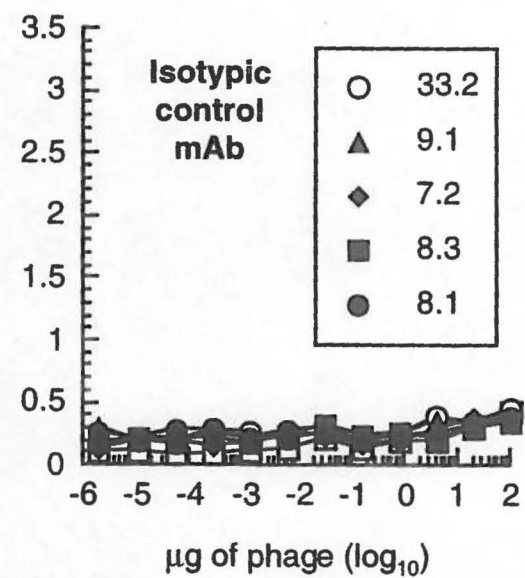
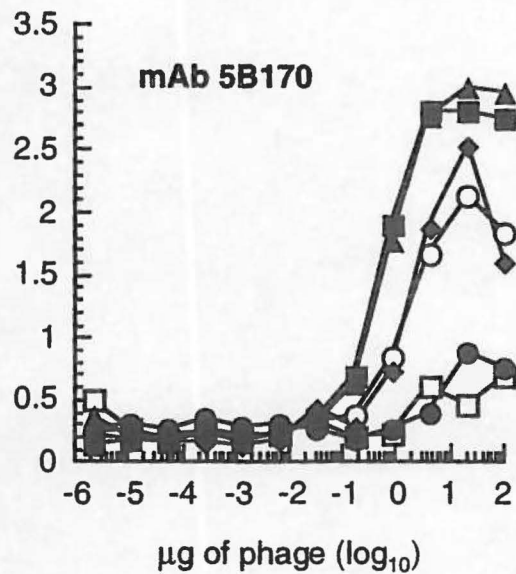
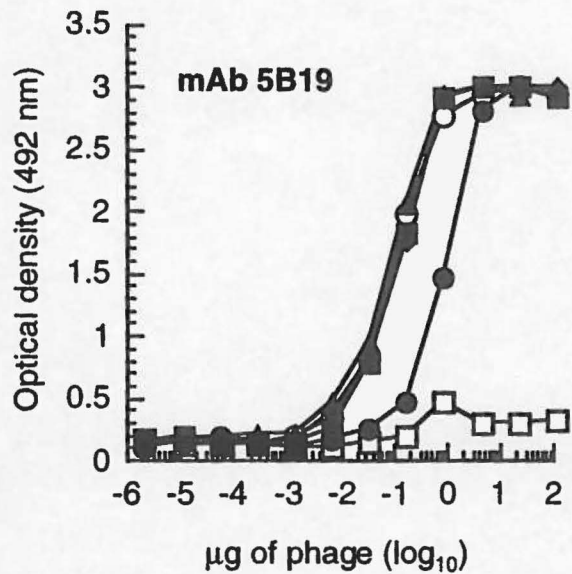
\* *p* values from Mann-Whitney test comparing absorbance means at a 1/500 plasma dilution between mice immunized with phage clones and with control vector phage f88.4

† Highest dilution of plasma neutralizing 50% of input virus

‡ Not significant

§ Not determined

Figure 1: ELISA for determining cross-reactive phage recognition by mAbs 5B19 and 5B170. Microtiter plates were coated with 1  $\mu\text{g/ml}$  of the indicated mAbs, and binding of varying amounts of mAb 5B19- and 5B170-selected phage was determined using horseradish peroxidase-labeled anti-M13 conjugate. Open symbols represent phage selected by mAb 5B19 (except G: control vector phage f88.4), and filled symbols represent phage selected by mAb 5B170.



**Figure 2:** Alignment of viral protein sequences and peptides selected with mAbs: a) 7-10A, b) 5B170, and c) 5B19. The clones and the amino acid sequences of their phage-displayed peptides are shown in bold. Amino acid identities are indicated with vertical bars, conservative amino acid differences with plus signs and dissimilarities with dots. Differences observed in amino acid numbering of different sequences of coronaviruses are due to deletions of various lengths found in the S1 subunit from different strains of MHV (strains A59, JHM, 4).

a) mAb 7-10A

153 CQYTICQLP 161 MHV-A59, 1, 2, 3, S (S1) (reference 44)  
|·||+|··|  
**ADREYCKYTVCTYPG** **clone 12.9**

b) mAb 5B170

**GCIGSYCV** **clone 7.2**  
||||·|+  
850 GCIGSTCA 857 MHV-A59 (S2) (reference 44)  
902 GCIGSTCA 909 MHV-4 and JHM(cl-2) (S2) (references 45, 46)  
761 GCIGSTCA 768 MHV-JHM (S2) (reference 47)  
||+||||·  
**GPALKRGCVGSTCFWA** **clone 8.3**

850 GCIGSTCA 857 MHV-A59 (S2) (reference 44)  
902 GCIGSTCA 909 MHV-4 and MHV-JHM(cl-2) (S2) (references 45, 46)  
761 GCIGSTCA 768 MHV-JHM (S2) (reference 47)

||||·|·  
**SASRGCIGSQCSTTA** **clone 9.1**

||·|||||  
890 GCLGSQCS 897 MHV-Y (S2) (reference 48)

c) mAb 5B19

**ASTTNCIGSQCLMTN** **clone 33.2**  
||||·|  
848 LLGCIGSTC 856 mAb 5B19 epitope on MHV-A59 (S2) (reference 17)

**Figure 3:** ELISA of mAb binding to immobilized phage (panel A) and to immobilized MHV-A59 (panel B) in reducing and non-reducing conditions. Results are representative of at least two separate experiments.



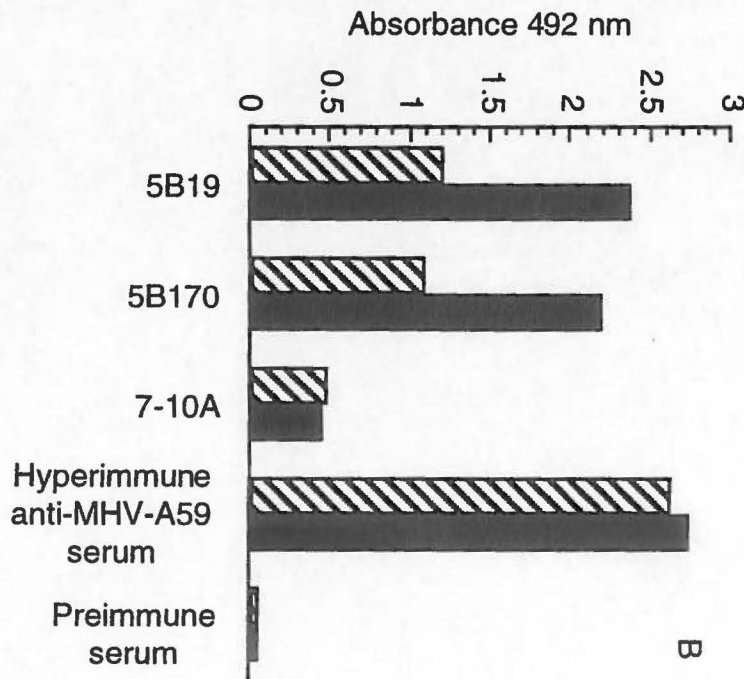
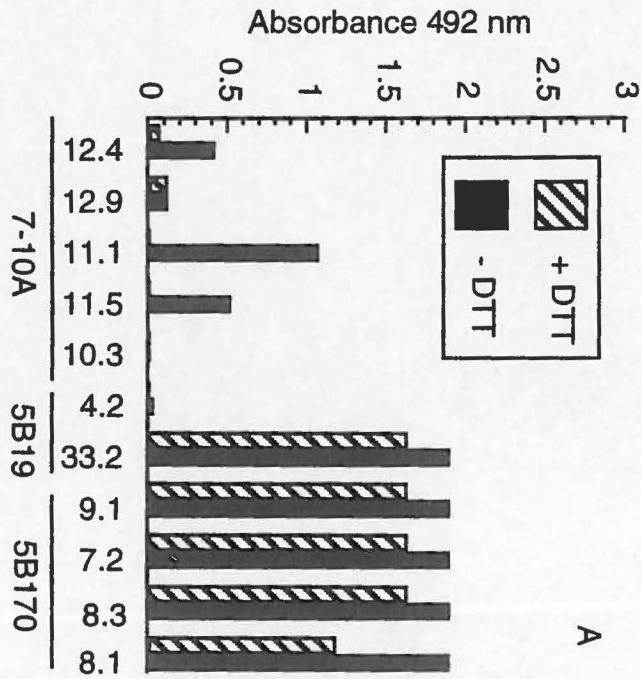
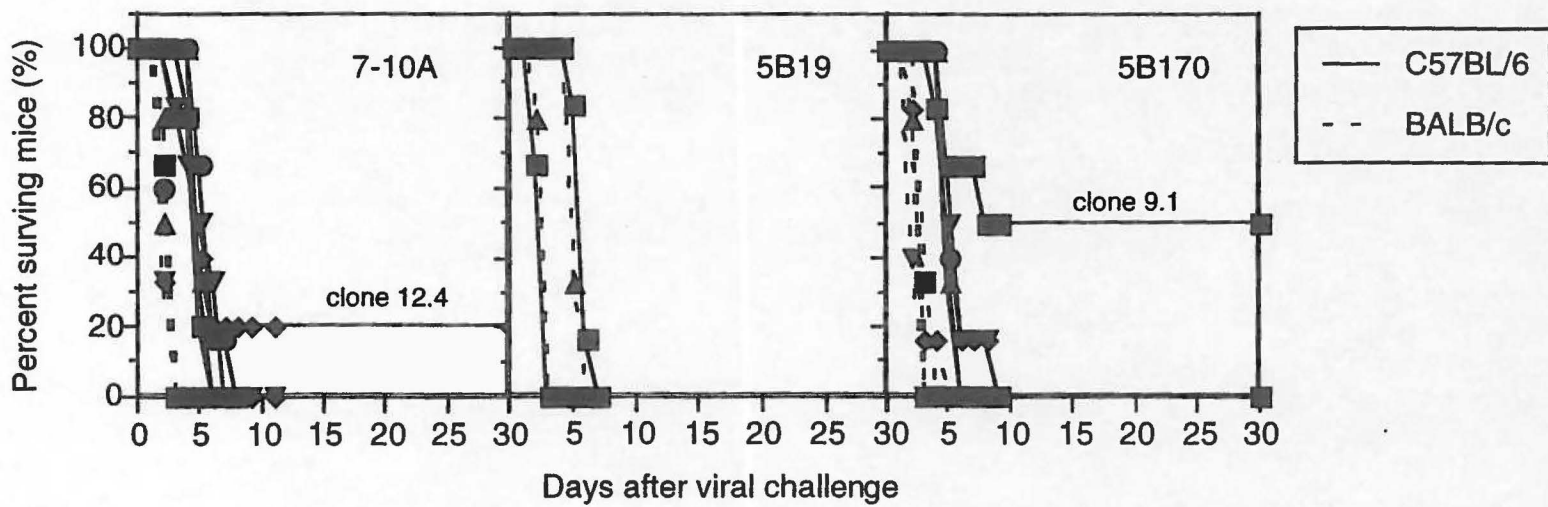
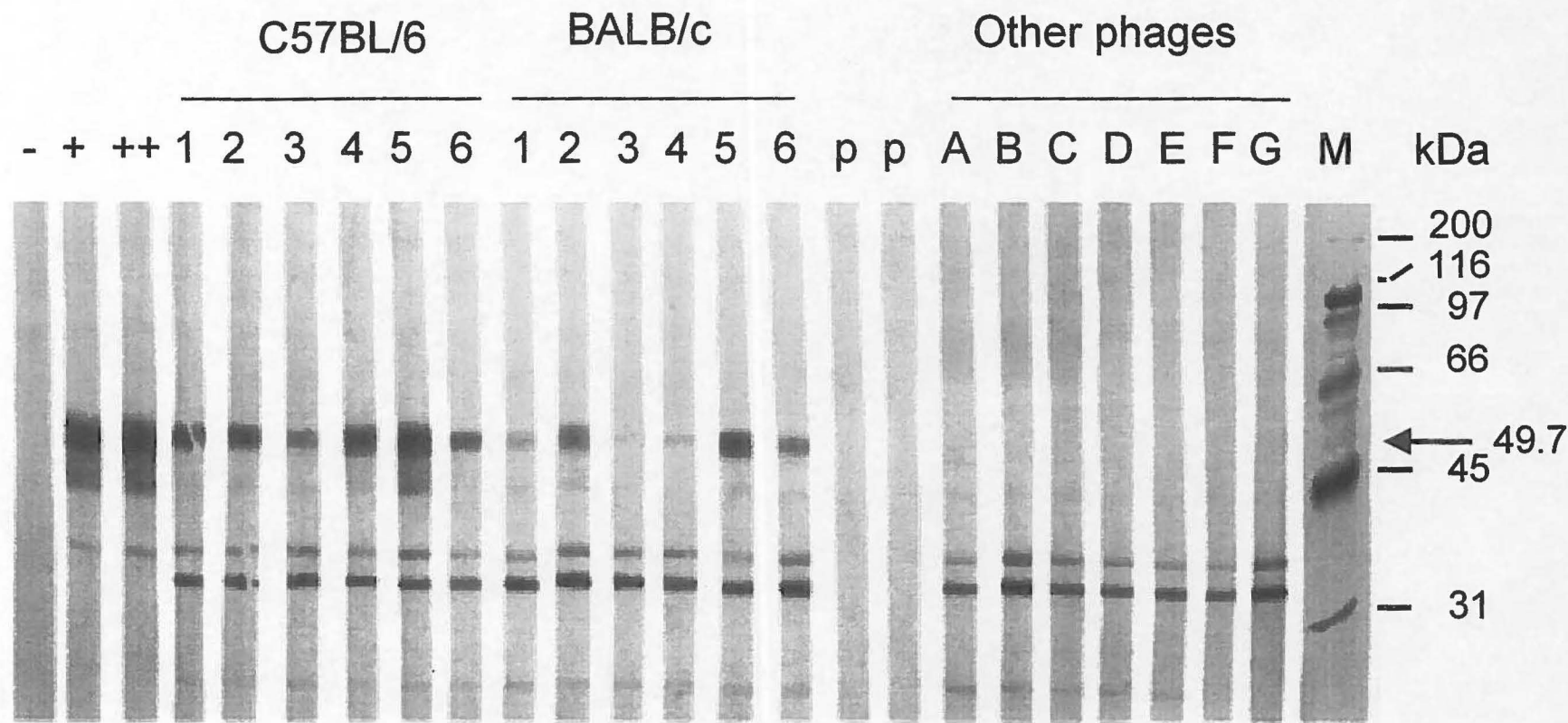


Figure 4: Survival of BALB/c and C57BL/6 mice immunized with phage-displayed mAb-selected peptides. Groups of six mice were immunized i.p. with different selected phage then challenged intracerebrally with 10 LD<sub>50</sub> of MHV-A59. Phage clones selected by mAb 7-10A: 10.3 (B), 11.1 (J), 11.5 (H), 12.4 (F), 12.9 (P). Clones selected by mAb 5B19: 33.2 (B). Clones selected by mAb 5B170: 9.1 (B), 7.2 (J), 8.3 (P), 8.1 (F). Control vector phage f88.4 (H). Protection of C57BL/6 mice by clone 9.1 was statistically significant and is representative of two separate experiments.



**Figure 5:** Western blot analysis of virus-specific antibody in the plasma of mice immunized with selected phage-displayed peptides. The immunodominant region of the S2 subunit of the S glycoprotein of MHV-A59 was loaded into 10% (w/v) polyacrylamide SDS-PAGE gel and electrotransferred onto a nitrocellulose membrane. -: mAb F18 that recognizes an epitope located outside the immunodominant region of the S2 subunit of the S glycoprotein; +: mAb 5B170; ++: mAb 5B19 ; 1, 2, 3, 4, 5, 6: individual mouse number (clone 9.1-immunized mice); p: C57BL/6 and BALB/c mice pre-immune sera; A: phage f88.4-immunized C57BL/6 mouse; B: phage f88.4-immunized BALB/c mouse; C: clone 8.1-immunized C57BL/6 mouse; D: clone 7.2-immunized C57BL/6 mouse; E: clone 8.3-immunized C57BL/6 mouse; F: clone 33.2-immunized C57BL/6 mouse; G: clone 33.2-immunized BALB/c mouse; M: molecular mass standards (Bio-Rad). The molecular mass of 49.7 kDa represents the immunodominant region expressed in *E. coli*.



**DISCUSSION GENERALE**

## **1- MECANISMES DE PROTECTION CONTRE L'INFECTION CORONAVIRALE A L'AIDE D'UN ANTICORPS NON-IMAGE INTERNE**

Peu de données décrivant les mécanismes de protection induits par des anticorps anti-idiotypiques sont disponibles, et moins encore concernant les mécanismes de protection induits par des anticorps anti-idiotypiques ne possédant pas d'image interne. La première partie de ce projet visait à étudier les mécanismes de protection contre l'infection aiguë par le coronavirus murin neurotrope suite à une vaccination avec un Ac2 $\gamma$  ne possédant pas de mimétisme moléculaire. Cet anticorps anti-idiotypique a été identifié de type gamma par son incapacité à être reconnu spécifiquement par des sérums anti-MHV-A59 produits chez des espèces animales différentes, le rat et le lapin (Lamarre *et al.*, 1991). Le mimétisme fonctionnel a donc été suggéré comme mode d'action pour l'induction de la réponse immunitaire protectrice. Dans un premier temps, nous avons évalué le rôle et l'importance de l'haplotype H-2 du complexe majeur d'histocompatibilité dans cette protection contre l'infection coronavirale et, dans un deuxième temps, nous avons identifié les composantes de la réponse immunitaire protectrice impliquées directement dans cette réponse.

### **1.1- Étude des mécanismes de protection contre l'infection coronavirale au niveau génétique**

Le potentiel vaccinant de l'Ac2 $\gamma$  a été démontré dans le modèle d'infection par le coronavirus. Afin de déterminer si ces Ac2 $\gamma$  ont la capacité d'induire une réponse protectrice chez des animaux génétiquement différents, permettant ainsi de mimer fonctionnellement l'Ac2 $\beta$ , huit différentes souches de souris consanguines d'haplotype H-2<sup>b</sup>, H-2<sup>d</sup>, H-2<sup>k</sup> et H-2<sup>q</sup> ont été testées. La réponse immunitaire protectrice induite chez les différentes souris avec l'Ac2 $\gamma$  est partiellement restreinte génétiquement, étant donné que sur les huit différentes souches de souris consanguines, seules les souches d'haplotype H-2<sup>d</sup> et H-2<sup>q</sup> ont été protégées de l'infection coronavirale. Alors que la vaccination restreinte par H-2<sup>d</sup> et H-2<sup>q</sup> nous avait d'abord suggéré que la réponse pouvait être

dépendante du complexe H-2, des souris congéniques pour ces deux haplotypes, sur fond génétique de souris non-protégées, n'ont cependant pas survécu à l'infection virale. Ainsi, l'expression des haplotypes H-2<sup>d</sup> et H-2<sup>q</sup> n'est pas suffisante pour permettre la protection, démontrant qu'ils ne sont pas les éléments majeurs contrôlant efficacement la vaccination. D'autre part, une protection partielle a été observée avec les souris congéniques, ayant un fond génétique de souris protégées mais possédant un haplotype H-2 non associé à la protection. Ces observations suggèrent que des gènes de fond présents dans les souris BALB/c, DBA/2, DBA/1 et SWR sont responsables de la réponse immunitaire protectrice. D'ailleurs, la variabilité des niveaux de protection générés par les différentes souches de souris indique la participation de plusieurs gènes du fond génétique de la souris. En portant une attention particulière aux niveaux de protections obtenus chez les souris de différentes souches immunisées avec l'Ac2<sub>γ</sub>, nous observons que la réponse antivirale optimale semble être contrôlée par l'association des gènes du fond génétique de la souris et d'un ou plusieurs gènes du CMH, notamment H-2<sup>d</sup> ou d'un ou plusieurs gènes qui lui sont associés. En effet, 70% des souris BALB/c ont survécu à l'épreuve virale, comparativement à seulement 40% pour les souris BALB.K (H-2<sup>k</sup>) et BALB.B (H-2<sup>b</sup>).

Par ailleurs, une réponse humorale spécifique contre le coronavirus murin a été détectée chez les souris protégées. Les Ac3 induits par immunisation avec l'Ac2<sub>γ</sub> lient spécifiquement le virus et le neutralisent *in vitro*. Une corrélation significative est observée entre le niveau de protection induit par les Ac2<sub>γ</sub> et les titres neutralisants des Ac3 dans le plasma des souris immunisées, montrant le rôle important de ces Ac3 dans l'induction de la protection. Les mécanismes impliqués dans l'induction d'une réponse immunitaire protectrice par des anticorps anti-idiotypiques de type gamma sont peu connus. La présence de ces Ac3 peut être due à la stimulation de clones de lymphocytes T ou B silencieux. Il a été décrit que les Ac2 pourraient reconnaître spécifiquement des idiotopes présents à la surface des clones de cellules B d'Ac1 normalement silencieux, activer leur prolifération et induire la production d'anticorps qui ne sont normalement pas générés par l'antigène (Zhou *et al.*, 1990). Une autre hypothèse impliquerait la présence d'idiotopes récurrents présents sur plusieurs anticorps reconnaissant spécifiquement un même antigène. Ainsi, l'anticorps anti-idiotypique spécifique à cet idiotope commun



stimulerait la production des anticorps portant cet idiotope et ayant une spécificité commune (Rajewsky, 1983). Des études ultérieures pourraient être entreprises pour identifier l'idiotope de l'AcMo1 7-10A qui a généré l'Ac2 $\gamma$  protecteur. L'identité de cet idiotope reconnu par l'Ac2 $\gamma$  pourrait être déterminée à l'aide de peptides générés à partir de la région variable de l'Ac1 7-10A ou à l'aide de banques peptidiques.

Nos résultats montrent que les anticorps anti-idiotypiques de type gamma doivent aussi être considérés dans l'induction d'une réponse immunitaire protectrice contre les agents pathogènes puisqu'ils ne sont pas nécessairement génétiquement restreints dans leur potentiel immunogénique. En effet, la capacité de cet Ac2 $\gamma$  d'induire une réponse protectrice chez des souris génétiquement différentes n'était pas attendue pour des anticorps anti-idiotypiques sans mimétisme moléculaire. Ces données sont en accord avec l'étude de Lucas *et al.* (1993) qui a montré l'induction spécifique d'Ac3 anti-toxine cholérique chez des lapins et des rats avec un anticorps anti-idiotypique non-image interne quoique ce dernier soit de type  $\alpha$ . Quelques études ont décrit la production d'Ac3 spécifiques à l'antigène original, avec induction de protection, mais peu ont analysé la protection chez des animaux génétiquement différents. Cette étude représente donc le premier exemple de vaccination de différentes souris contre une infection virale par un anticorps anti-idiotypique de type gamma.

### **1.2- Étude des mécanismes de protection contre l'infection coronavirale au niveau humoral et cellulaire**

Dans cette deuxième section du chapitre, les éléments majeurs participant à la protection antivirale ont été identifiés, afin d'étudier les mécanismes d'induction de la protection par des anticorps anti-idiotypiques non-image interne.

Pour ce faire, nous avons évalué la protection conférée à des souris non sensibilisées par le transfert du plasma, et/ou des splénocytes de souris BALB/c immunisées avec l'Ac2 $\gamma$ . Le retard dans la mortalité chez les souris ayant reçu du plasma de souris immunisées avec l'Ac2 $\gamma$ , indique que la protection des souris immunisées avec cet anticorps est probablement due à la présence des

Ac3 antiviraux neutralisants par leur pouvoir d'action directe. Par ailleurs, dans le modèle murin, les anticorps antiviraux jouent un rôle important dans l'issue de la maladie aiguë causée par le coronavirus. En effet, chez la souris, les AcMo produits contre la glycoprotéine de surface S sont capables de moduler d'aiguë à chronique l'infection par le MHV-JHM (Buchmeier *et al.*, 1984). Une autre étude a aussi montré que des AcMo spécifiques au virus, possédant ou pas la propriété de neutralisation virale, ont protégé passivement des souris contre l'infection coronavirale (Nakanaga *et al.*, 1986). Des observations effectuées dans notre laboratoire montrent que la présence de hauts titres d'anticorps neutralisants est en corrélation avec la protection contre l'encéphalite létale générée par l'immunisation avec la glycoprotéine S purifiée par chromatographie d'affinité (Daniel et Talbot, 1990). Le fait qu'il n'y ait pas eu survie mais seulement retard dans la mortalité chez les souris immunisées avec l'Ac2 $\gamma$ , pourrait être expliqué par la présence d'une quantité insuffisante d'Ac3 antiviraux neutralisants ou par l'incapacité des Ac3 par leur action isolée de protéger les souris contre l'infection. D'autre part, on ne peut exclure la participation directe de cellules du système immunitaire autres que les splénocytes dans la protection contre l'infection aiguë. La protection observée chez les souris ayant survécu à l'infection létale pourrait éventuellement être reconstituée par l'inoculation combinée de cellules autres que les splénocytes avec les Ac3 antiviraux.

Malgré l'importance des anticorps antiviraux dans la réponse immunitaire protectrice par les Ac2 $\gamma$ , nous avons aussi évalué les activités biologiques complémentaires à la neutralisation virale. En effet, d'autres mécanismes immunitaires impliquant les anticorps, tel que l'action du complément sur des anticorps antiviraux, ont été rapportés dans l'infection de souris par le coronavirus (Nakanaga *et al.*, 1983). Ainsi, l'activité antivirale induite par l'action du complément et l'activité cytotoxique cellulaire avec l'aide d'anticorps antiviraux spécifiques ont été analysées. Cependant, aucune des activités décrites n'a été observée chez les souris immunisées avec l'Ac2 $\gamma$ , suggérant que la neutralisation serait le principal mécanisme humoral dans la réponse immunitaire protectrice.

Parce que plusieurs équipes ont démontré une protection contre l'infection létale au coronavirus par des cellules T cytotoxiques (Stohlman *et al.*, 1986;

Heemskerk *et al.*, 1995; Körner *et al.*, 1991) et parce qu'il a déjà été décrit que les anticorps anti-idiotypiques, autant images internes que non-images internes, ont la capacité de générer une réponse cellulaire (Fagerberg *et al.*, 1995; Durrant *et al.*, 1995; Yang et Thanavala, 1995), nous avons évalué la participation de la composante cellulaire dans la réponse immunitaire protectrice par l'Ac2 $\gamma$ . Le transfert adoptif de splénocytes provenant de souris immunisées avec l'Ac2 $\gamma$ , n'a conféré aucune protection contre l'infection virale létale, ce qui laisse croire que la réponse immunitaire cellulaire induite par l'Ac2 $\gamma$  ne s'effectue pas par l'action directe d'une activité cytotoxique. Cependant, lorsque les cellules de ganglions de souris immunisées avec l'Ac2 $\gamma$  ont été soumises à un test de prolifération lymphocytaire en présence de l'Ac2 $\gamma$  et du virus, une réponse proliférative significative a été observée. La réaction croisée des cellules de ganglions suggère la participation d'une réponse cellulaire de type auxiliaire dans l'induction d'anticorps antiviraux T-dépendants par l'Ac2 $\gamma$ . Des études ultérieures permettraient de déterminer plus précisément les populations de lymphocytes T impliqués dans la protection ainsi que d'identifier les épitopes reconnus par les lymphocytes T antiviraux induit par l'Ac2 $\gamma$ .

Ainsi, l'élément majeur participant directement à la réponse immunitaire protectrice est la réponse humorale et celle-ci résulterait probablement de l'activité neutralisante des Ac3, eux-mêmes induits avec la collaboration des lymphocytes T auxiliaires.

## **2- PRODUCTION ET CARACTERISATION D'ANTICORPS ANTI-IDIOTYPIQUES**

Malgré l'identification des éléments importants participant à la réponse immunitaire protectrice due à un anticorps anti-idiotypique non-image interne de type  $\gamma$ , d'autres études sur ces anticorps protecteurs seraient requises afin d'appuyer et de confirmer nos résultats. Pour ce faire, plusieurs anticorps anti-idiotypiques monoclonaux et polyclonaux ont été produits: des AcMo2 spécifiques à l'AcMo1 7-10A, qui avait précédemment généré l'Ac2 $\gamma$  protecteur, ainsi que d'autres anticorps anti-idiotypiques monoclonaux et polyclonaux contre deux autres AcMo1.

## 2.1- Production et caractérisation d'AcMo anti-7-10A

Afin de définir plus précisément les mécanismes de protection d'une population unique d'anticorps anti-idiotypiques, des AcMo2 anti-7-10A ont été générés en immunisant des souris BALB/c avec l'AcMo 7-10A couplé à l'hémocyanine de patelle (KLH). Les rates ont ensuite été prélevées et les splénocytes fusionnés à des cellules myélomateuses non sécrétrices P3-X63-Ag8.653 selon la technique de production d'anticorps monoclonaux de Köhler et Milstein (1975). La spécificité des AcMo2 a été vérifiée par ELISA. Une forte reconnaissance de l'AcMo1 (7-10A) a été observée par les AcMo2, alors qu'aucune réactivité n'a été observée avec le KLH utilisé comme molécule porteuse ou avec un anticorps témoin de même isotype (Figure 1 de l'article III). Par la suite, les AcMo2 de classe  $\beta/\gamma$  sont différenciés de ceux de classe  $\alpha$  par leur capacité d'entrer en compétition avec l'antigène pour la liaison avec l'AcMo1. Plusieurs AcMo2 avaient la capacité d'inhiber l'attachement de l'AcMo1 7-10A à l'antigène viral (Figure 2 de l'article III), de même que son pouvoir neutralisant (Tableau 1 de l'article III). Les AcMo ne répondant pas à ces critères reconnaissent des idiotopes éloignés du paratope et appartiennent donc à la catégorie des anticorps de type  $\alpha$ , tandis que ceux qui reconnaissent des idiotopes localisés à proximité ou à l'intérieur du paratope, appartiennent aux catégories des anticorps de type  $\gamma$  ou  $\beta$ . La capacité des anticorps de type  $\beta$  et  $\gamma$  à induire une réponse immunitaire antivirale a ensuite été analysée. Ainsi, des AcMo2 en entrant en compétition avec l'antigène viral pour la liaison avec l'AcMo1 7-10A ont été couplés au KLH puis injectés à des souris BALB/c. Aucune des souris immunisées n'a survécu à l'épreuve virale, ni n'a généré d'Ac3 spécifiques au coronavirus, indiquant que les AcMo2 injectés n'étaient vraisemblablement pas de type  $\beta$ . Ainsi, aucun des AcMo2 $\gamma$  testés n'a conféré la protection, contrairement à l'Ac2 $\gamma$  polyclonal généré à partir du même AcMo1 7-10A.

La fréquence très faible d'anticorps anti-idiotypiques présents dans le répertoire de la souris pourrait expliquer notre difficulté à isoler des AcMo2 anti-7-10A protecteurs. D'ailleurs, dans une étude précédente utilisant une approche de génie génétique, des anticorps anti-idiotypiques scFv, sélectionnés d'une banque de phages contre l'AcMo1 7-10A, n'ont pas été en

mesure d'induire une réponse immunitaire protectrice (Lamarre et Talbot, 1997). Puisqu'aucun AcMo2 protecteur n'a été obtenu à partir de l'AcMo1 7-10A, contrairement à l'Ac2 $\gamma$  polyclonal produit chez le lapin, la possibilité que des d'Ac2 $\beta$  soient présents à l'état de trace dans cet Ac2 $\gamma$  polyclonal ne peut être éliminée. Cependant, les AcMo2 générés chez la souris ne représentent probablement pas le même répertoire d'anticorps que le lapin. Les idiotopes de l'AcMo1 7-10A responsables de la production d'Ac2 protecteurs pourraient être reconnus chez le lapin et non chez la souris. Ces résultats témoignent de la complexité du réseau idiotypique et seules des études plus approfondies des mécanismes d'induction d'une réponse immunitaire par les anticorps anti-idiotypiques permettraient de clarifier ces interactions complexes.

## 2.2- Induction d'une réponse immunitaire protectrice contre l'infection coronavirale à l'aide d'un Ac2 $\alpha$

Devant la difficulté d'obtenir des AcMo2 à partir de l'AcMo1 7-10A, deux autres AcMo1 ont été choisis pour produire des anticorps anti-idiotypiques polyclonaux et monoclonaux. L'AcMo 4-11G reconnaît un épitope discontinu tandis que l'AcMo 5B170 reconnaît un épitope continu. Ces deux anticorps neutralisent le virus *in vitro* et protègent les souris contre l'infection létale *in vivo*. Les AcMo2 anti-4-11G générés étaient de type  $\alpha$  puisqu'ils n'ont pas compétitionné avec l'antigène viral pour la liaison à l'AcMo1 4-11G. De plus, ces AcMo2 $\alpha$  n'ont pas induit de réponse immunitaire spécifique contre le coronavirus murin. Un Ac2 $\gamma$  polyclonal spécifique à l'AcMo1 4-11G, produit chez le lapin, n'a également pu induire de réponse immunitaire spécifique contre le coronavirus murin. Par contre, l'anticorps anti-idiotypique polyclonal spécifique à l'AcMo1 5B170.11, caractérisé comme étant de type  $\alpha$ , a pu induire une protection partielle contre l'infection virale lorsqu'injecté à des souris BALB/c. Afin de confirmer cette protection partielle par un Ac2 $\alpha$ , nous avons évalué la diminution du titre viral dans les cerveaux de souris vaccinées, cinq jours suivant l'épreuve virale. La diminution significative du titre viral dans les cerveaux de souris immunisées avec l'Ac2 $\alpha$  pourrait expliquer la protection partielle observée. De plus, un faible taux d'Ac3 antiviraux a été détecté par ELISA, mais ceux-ci n'ont pas pu neutraliser le virus *in vitro*. La protection partielle obtenue avec l'Ac2 $\alpha$  suggère la nécessité d'optimiser les conditions

pour générer une réponse antivirale, en variant par exemple les doses vaccinales et le nombre de rappel.

Ces résultats démontrent encore une fois la capacité des anticorps anti-idiotypiques non-image interne d'induire une réponse immunitaire protectrice par altération du réseau idiotypique. Cette induction spécifique par les Ac $2\alpha$  est d'ailleurs en accord avec plusieurs autres études (Francotte et Urbain, 1984; Schick *et al.*, 1987; Zhou *et al.*, 1990).

Les résultats obtenus dans cette partie, ainsi que dans la partie précédente, indiquent que dans notre modèle utilisant le coronavirus murin, la production d'anticorps monoclonaux anti-idiotypiques protecteurs est difficile par la technique classique de production d'hybridomes (Kohler and Milstein, 1975).

### **3- REPOSE IMMUNITAIRE PROTECTRICE CONTRE L'INFECTION CORONAVIRALE PAR DES PHAGES SELECTIONNES PAR DES ANTICORPS NEUTRALISANTS A PARTIR DE BANQUES PEPTIDIQUES**

Dans le but de mieux définir les mécanismes de protection contre l'infection coronavirale, il a été important de caractériser les épitopes qui ont participé à la production des anticorps anti-idiotypiques protecteurs. Afin d'atteindre cet objectif, plusieurs banques peptidiques linéaires et circulaires ont été utilisées pour identifier les épitopes continus et discontinus reconnu par trois AcMo anti-coronavirus neutralisants et protecteurs. Ensuite, les propriétés immunogéniques des peptides sélectionnées ont aussi été étudiées.

Afin d'éviter les problèmes possibles d'encombrement stérique causés par le nombre important de protéines pVIII à la surface du phage, la longueur des peptides fusionnés avec la protéine pVIII ne peut généralement pas dépasser la longueur de huit acides aminés. Cependant, les banques de phages utilisées dans cette étude permettent l'expression de peptides de longueurs supérieures aux huit acides aminés; la présence d'un deuxième gène codant pour la protéine pVIII dans le génome du phage permet une dilution des protéines

fusionnées par des protéines sauvages issues du deuxième gène.

Les phages ont été sélectionnés pour leur capacité de liaison aux trois AcMo 7-10A, 5B19 et 5B170 spécifiques au coronavirus murin. Après plusieurs cycles de lavages, d'élutions et d'amplifications, les phages sélectionnés ont été analysés par des tests fonctionnels et la région recombinante séquencée. Parmi les différentes banques peptidiques linéaires et circulaires utilisées, nos trois AcMo ont sélectionné des phages provenant uniquement des banques peptidiques circulaires, indiquant que les peptides contraints, c'est-à-dire les peptides présentés dans une conformation qui accepte peu de degrés de liberté, permettent des affinités et des spécificités de liaisons supérieures aux peptides linéaires et sont éventuellement plus informatifs sur les sites de liaison.

Les phages sélectionnés par l'AcMo 7-10A n'ont pas démontré de séquences consensus évidentes, un résultat peu surprenant puisque cet AcMo reconnaît un épitope discontinu de la sous-unité S1 de la glycoprotéine S du coronavirus murin (Daniel et Talbot, 1990). Lorsque l'épitope recherché est discontinu, les séquences identifiées miment généralement le ligand naturel (Zhong *et al.*, 1994). Cependant, parmi les clones sélectionnés, le clone 12.9, réagissant fortement en ELISA, partage 5 à 6 acides aminés avec la région linéaire de la sous-unité S1 entre les acides aminés 153 à 161 (Figure 2 de l'article V), localisant ainsi l'épitope reconnu par l'AcMo 7-10A dans la région du domaine globulaire de la glycoprotéine S, région qui est impliquée dans la liaison avec la cellule (Kubo *et al.*, 1994). Toutefois, l'incapacité de ce clone 12.9 à inhiber l'attachement du MHV-A59 aux cellules DBT, suggère que cet épitope n'est probablement pas impliqué dans la liaison au récepteur cellulaire, ou que son affinité pour celui-ci est trop faible. De plus, une étude récente a montré que les acides aminés 62 à 65 de la sous-unité S1 seraient impliqués dans la liaison au récepteur cellulaire (Saeki *et al.*, 1997), alors que l'épitope reconnu par 7-10A ne semble pas être localisé dans cette région. Cependant, les acides aminés partagés entre le phage 12.9 et la sous-unité S1 ne représentent que l'épitope partiel reconnu par l'AcMo 7-10A. On ne peut donc pas exclure la possibilité que les acides aminés correspondant à l'autre partie de l'épitope pourraient se situer dans la région 62 à 65 de la sous-unité S1.

Des séquences consensus ont été obtenus avec les phages sélectionnés par les AcMo 5B19 et 5B170 reconnaissant des épitopes continus dans la région immunodominante de la sous-unité S2 du coronavirus murin (Luytjes *et al.*, 1989; Daniel *et al.*, 1993). Le motif C(I/V)GSXC a été sélectionné par ces deux AcMo à partir de différentes banques peptidiques soulignant l'importance de ces résidus dans la liaison à l'anticorps. De plus, les deux cystéines séparées par quatre acides aminés retrouvées dans toutes les séquences de phages sélectionnés, incluant les phages sélectionnés des banques où seulement une cystéine était déterminée à l'avance, indique l'importance des deux cystéines dans l'organisation de l'épitope. Cependant, la formation d'un pont disulfure ne semble pas nécessaire pour la liaison du peptide à l'anticorps puisque cette dernière n'a été que faiblement affectée en condition réductrice (Figure 3 de l'article V). Par contre, ces résidus cystéines semblent importants dans l'interaction directe avec le site de liaison de l'anticorps. Nos résultats sont en accord avec la séquence identifiée par Luytjes *et al.* (1989) puisque les séquences des peptides sélectionnés sont similaires à une partie de la séquence identifiée par ces auteurs. Néanmoins, la possibilité de remplacement de la valine par l'isoleucine est en désaccord avec l'étude de Luytjes *et al.* qui a montré que seul les peptides contenant la cystéine en position 851 et l'isoleucine en position 852 avaient la capacité de lier l'AcMo5B19. Cette divergence de résultats pourrait être expliquée par un effet compensatoire des autres résidus du peptide phagique. Cet effet compensatoire permettrait la substitution de l'isoleucine pour la valine sans empêcher sa liaison à l'AcMo.

Les phages pour lesquels les AcMo 7-10A, 5B170 et 5B19 présentaient la plus forte liaison en ELISA, ont pu servir directement d'immunogène chez des souris puisque les peptides sont exprimés en N-terminal de la protéine pVIII. Une étude de Greenwood *et al.* (1991) avait montré que les peptides exprimés sur la protéine pVIII étaient plus immunogènes que ceux exprimés sur la protéine pIII, un phénomène qui est probablement dû au nombre supérieur de copie de peptides présentés sur la protéine pVIII. Les souris BALB/c ont été choisies car nous avons démontré qu'elles pouvaient être protégées contre l'infection par le MHV-A59. Quant au choix des souris C57BL/6, il a été basé sur l'étude de De la Cruz *et al.* (1988) qui suggère que les souris d'haplotype H-2<sup>b</sup> répondent aux épitopes T présents sur le phage filamenteux, contrairement aux



souris BALB/c d'haplotype H-2<sup>d</sup>. De tous les phages testés, seul le phage 9.1 sélectionné par l'AcMo 5B170 a induit une réponse immunitaire protectrice chez les souris C57BL/6. Des anticorps antiviraux ont aussi été détectés à un taux relativement élevé, indiquant que le peptide mimant l'épitope de la glycoprotéine est immunogénique chez la souris. Par contre, nous n'avons détecté, chez ces anticorps, aucune activité biologique normalement liée à la protection telles que la neutralisation virale, une activité de lyse cellulaire ou de lyse par le complément en faisant intervenir les anticorps antiviraux. Cependant, la présence des anticorps spécifiques à la région immunodominante de S2 est en corrélation avec la protection observée (Figure 5 de l'article V). Ainsi, la réponse immunitaire humorale semble jouer un rôle important dans la protection par le clone 9.1. Par ailleurs, des études de compétition entre les anticorps anti-phage 9.1 des sérums de souris et les AcMo antiviraux de notre laboratoire spécifiques à la région immunodominante, permettraient d'expliquer les activités protectrices et/ou neutralisantes de ces AcMo par rapport aux épitopes reconnus.

Nous émettons l'hypothèse que les anticorps antiviraux générés seraient impliqués dans les mécanismes de protection, mais que leur concentration serait probablement trop faible pour protéger les souris BALB/c immunisées avec le phage 9.1 contre l'infection létale. D'ailleurs, une étude récente a suggéré qu'une concentration minimale d'anticorps dans le sérum serait nécessaire pour obtenir une protection contre l'infection par le virus de la stomatite vésiculaire. De plus, la protection serait indépendante des isotypes des anticorps, de leur avidité et de leur activité neutralisante *in vitro* (Bachmann *et al.*, 1997). Des études de protection anticoronavirale dans le modèle murin renforcent cette hypothèse. Ainsi, des AcMo ne possédant pas d'activité de neutralisation *in vitro* ont été capables de protéger passivement des souris contre l'infection létale (Nakanaga *et al.*, 1986).

Malgré le potentiel de mimétisme conformationnel du clone 12.9 sélectionné par l'AcMo 7-10A, les souris immunisées n'ont pas survécu à l'épreuve virale. Le mimétisme conformationnel a probablement été insuffisant pour générer une réponse immunitaire protectrice. Toutefois, ce peptide pourrait aussi être moins immunogène que l'épitope original. De plus, il est probable que les acides aminés bordant la séquence consensus des peptides

sélectionnés par les AcMo 5B19 et 5B170 pourraient jouer un rôle dans l'immunogénicité de celle-ci, ce qui expliquerait la protection observée avec le clone 9.1. D'autre part, des études sont présentement en cours avec des peptides synthétiques correspondant aux séquences consensus des phages 9.1 et 7.2 pour confirmer leur liaison aux AcMo.

**CONCLUSION**

Les résultats obtenus au cours de ce travail ont permis d'élucider les propriétés de modulation du système immunitaire par un anticorps non-image interne de type  $\gamma$ . Nous avons démontré que cet anticorps anti-idiotypique, contrairement à d'autres anticorps anti-idiotypiques non-image interne, possède la capacité d'immuniser des souris génétiquement différentes. Nous avons aussi déterminé, selon les profils de vaccination de souris consanguines et congéniques, la nécessité d'une coopération entre les gènes du fond génétique de la souris BALB/c et l'haplotype H-2<sup>d</sup> pour générer une réponse immunitaire protectrice optimale. Nous n'avons pas identifié l'élément principal contrôlant la réponse antivirale par cet Ac2 $\gamma$ , mais nos résultats indiquent que le ou les gène(s) principalement responsable(s) de la protection observée sont localisé(s) à l'extérieur du complexe majeur d'histocompatibilité. De plus, nous avons montré que les anticorps antiviraux neutralisants, induits par la vaccination avec l'Ac2 $\gamma$ , constituaient la principale composante de la réponse antivirale protectrice contre l'infection létale par le coronavirus murin. Par ailleurs, la reconnaissance croisée des lymphocytes T provenant de souris immunisées avec l'Ac2 $\gamma$  ou avec l'antigène coronaviral, de même que l'absence de protection conférée par le transfert adoptif de splénocytes, ont suggéré la participation des cellules T auxiliaires dans l'induction d'anticorps antiviraux neutralisants.

Nous avons aussi démontré qu'un autre anticorps anti-idiotypique non-image interne mais de type  $\alpha$ , avait aussi la capacité d'induire une réponse immunitaire protectrice, confirmant le potentiel vaccinal encore sous-estimé des anticorps anti-idiotypiques non-image interne. L'ensemble des résultats obtenus de ces travaux contribuent donc à l'avancement des connaissances sur les mécanismes de protection contre des infections à l'aide d'anticorps anti-idiotypiques. Une meilleure compréhension des interactions entre les différents éléments du système immunitaire permettra éventuellement de manipuler de façon sécuritaire le réseau idiotypique pour moduler une infection virale. Des travaux supplémentaires sur l'élucidation des mécanismes de protection engendrés par d'autres anticorps anti-idiotypiques rendront éventuellement possible leur utilisation comme alternative de vaccination.

Nous avons également démontré le potentiel vaccinal de peptides présentés à la surface de phages filamenteux, isolés à partir de plusieurs banques peptidiques à l'aide d'AcMo ayant servi à produire les anticorps anti-idiotypiques. Des séquences consensus ont été identifiées et elles correspondent à de courtes séquences en acides aminés de la glycoprotéine S. Ainsi, les banques peptidiques ont permis de localiser, dans la région N-terminale de la sous-unité S1, l'épitope conformationnel reconnu par l'AcMo 7-10A qui avait précédemment généré l'Ac2 $\gamma$  protecteur. Étant donné les nombreuses études effectuées utilisant l'AcMo 7-10A et ses propriétés biologiques intéressantes, des études ultérieures seraient nécessaires afin d'en déterminer l'épitope exact. L'utilisation de différents peptides synthétiques basée sur la séquence du phage 12.9, mais substituée à différente position, constituerait une approche expérimentale intéressante. Les séquences des autres clones sélectionnés par l'AcMo 7-10A pourraient être incluses dans ces analyses. Par ailleurs, un phage portant à sa surface un peptide représentant l'épitope linéaire reconnu par les AcMo 5B19 et 5B170 a protégé les souris C57BL/6 contre l'infection létale par le coronavirus. De plus, des anticorps antiviraux reconnaissant la région immunodominante de la sous-unité S2 ont été produits et leur présence est en corrélation avec la protection observée. Ainsi, les résultats démontrent l'utilité et la performance des banques peptidiques pour la caractérisation d'épitopes. Par ailleurs, les peptides sélectionnés peuvent ensuite être directement utilisés comme immunogène pour induire une réponse immunitaire antivirale. Les phages recombinants utilisés pour identifier des ligands spécifiques pourraient aussi constituer une alternative intéressante en vaccinologie.

**REMERCIEMENTS**

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de thèse, le Dr Pierre Talbot pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour avoir supervisé mes travaux de maîtrise et de doctorat. Je lui suis reconnaissante pour sa grande disponibilité, pour sa célérité et pour m'avoir permis de participer à des congrès nationaux et internationaux.

Mes remerciements s'adressent aussi au Dr Suzanne Lemieux pour sa précieuse collaboration concernant la partie portant sur la génétique de la souris.

Je tiens à remercier le Dr Edouardo Franco et Madame Marie Désy pour leur travail professionnel sur les analyses statistiques nécessaires à ces travaux.

Je désire aussi remercier les membres du laboratoire du Dr Pierre Talbot pour leurs amitiés et discussions intéressantes, et plus particulièrement Mesdames Francine Lambert et Ginette Mercier pour leurs judicieux conseils ainsi que leur aide technique occasionnelle.

Je saisis l'occasion pour exprimer toute ma gratitude envers mes amis proches et ma famille, pour leurs nombreux encouragements et leur soutien tout au long de ces années d'études supérieures.

Pour terminer, je suis reconnaissante au fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche (FCAR) du Québec ainsi qu'à l'Institut Armand-Frappier pour leur support financier durant ces études de maîtrise et de doctorat.

**REFERENCES**



- BACHMANN, M. F., KALINKE, U., ALTHAGE, A., FREER, G., BURKHART, C., ROOST, H.P., AGUET, M., HENGARTNER, H., ZINKERNAGEL, R. M. 1997. The role of antibody concentration and avidity in antiviral protection. *Science* **276**: 2024-2027.
- BAILEY, O. T., PAPPENHEIMER, A. M., CHEEVER, F. S., DANIELS, J. B. 1949. A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. II. Pathology. *J. Exp. Med.* **90**: 195-212.
- BALASS, M., HELDMAN, Y., CABILLY, S., GIVOL, D., KATCHALSKI-KATZIR, E., FUCHS, S. 1993. Identification of a hexapeptide that mimics a conformation-dependent binding site of acetylcholine receptor by use of a phage-epitope library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 10638-10642.
- BONA, C. A. 1987. Les vaccins du futur. *La Recherche* **18**: 672-682.
- BONNYCASTLE, L. L. C., MEHROKE, J. S., RASHED, M., GONG, X., SCOTT, J. K. 1996. Probing the basis of antibody reactivity with a panel of constrained peptide libraries displayed by filamentous phage. *J. Mol. Biol.* **258**: 747-762.
- BRONSHTEIN, I. B., SHUSTER, A. M., GOLOLOBOV, G. V., GROMOVA, I. I., KVASHUK, O. A., BELOSTOTSKAYA, K. M., ALEKBEROVA, Z. S., PROKAEVA, T. B., GABIBOV, A. G. 1992. DNA-specific anti-idiotypic antibodies in the sera of patients with autoimmune diseases. *FEBS* **314**: 259-263.
- BRUCK, C., CO, M. S., SLAOU, M., GAULTON, G. N., SMITH, T., FIELDS, B. N., MULLINS, J. I., GREENE, M. I. 1986. Nucleic acid sequence of an internal image-bearing monoclonal anti-idiotypic and its comparison to the sequence of the external antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 6578-6582.
- BUCHMEIER, M. J., LEWICKI, H. A., TALBOT, P. J., KNOBLER, R. L. 1984. Murine hepatitis virus-4 (strain JHM)-induced neurologic disease is modulated *in vivo* by monoclonal antibody. *Virology* **132**: 261-270.
- BUKOWSKI, J. F., WODA, B. A., HABU, S., OKUMURA, K., WELSH, R. M. 1983. Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis *in vivo*. *J. Immunol.* **131**: 1531-1538.
- CAVANAGH, D. 1983. Coronavirus IBV: structural characterization of the spike protein. *J. Gen. Virol.* **64**: 2577-2583.

- CAVANAGH, D., BRIAN, D. A., BRINTON, M. A., ENJUANES, L., HOLMES, K. V., HORZINEK, M. C., LAI, M. M. C., LAUDE, H., PLAGEMANN, P. G. W., SIDDELL, S. G., SPAAN, W. J. M., TAGUCHI, F., TALBOT, P. J. 1995. *Coronaviridae*. In: "Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses. 6th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses". F. A. Murphy, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P., Marteli, M. A. Mayo et M. D. Summers (éds.). Springer-Verlag, New York, p. 407-411.
- CHEEVER, F. S., DANIELS, J. B., PAPPENHEIMER, A. M., BAILEY, O.T. 1949. A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. I. Isolation and biologic properties of the virus. *J. Exp. Med.* **90**: 181-194.
- CHEN, D. S., ASANAKA, M., YOKOMORI, K., WANG, F.-I., HWANG, S. B., LI, H.-P., LAI, M. M. 1995. A pregnancy-specific glycoprotein is expressed in the brain and serves as a receptor for mouse hepatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 12095-12099.
- COHEN, I. R. 1992. The cognitive paradigm and the immunological humunculus. *Immunol. Today* **13**: 490-494.
- COLLINS, A. R., KNOBLER, R. L., POWELL, H., BUCHMEIER, M. J. 1982. Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for attachment and cell-cell fusion. *Virology* **119**: 358-371.
- CORTESE, R., MONACI, P., LUZZAGO, A., SANTINI, C., BARTOLI, F., CORTESE, I., FORTUGNO, P., GALFRE, G., NICOSIA, A. FELICI, F. 1996. Selection of biologically active peptides by phage display of random peptide libraries. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**: 616-621.
- CWIRLA, S. E., PETERS, E. A., BARRETT, R. W., DOWER, W. J. 1990. Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 6378-6382.
- CZOP, J. K., GURISH, M. F., KADISH, J. L. 1990. Production and isolation of rabbit antiidiotypic antibodies directed against the human monocyte receptor for yeast  $\beta$ -glucans. *J. Immunol.* **145**: 995-1001.
- DALES, S., ANDERSON, R. 1995. Pathogenesis and diseases of the central nervous system caused by murine coronaviruses. In: *The Coronaviridae*. S. G. Siddell, Ed. Plenum press, New York, p. 257-292.
- DANIEL, C., TALBOT, P. J. 1990. Protection from lethal coronavirus infection by affinity-purified spike glycoprotein of murine hepatitis virus, strain A59. *Virology* **174**: 87-94.

- DANIEL, C., ANDERSON, R., BUCHMEIER, M. J., FLEMING, J. O., SPAAN, W. J. M., WEGE, H., TALBOT, P. J. 1993. Identification of an immunodominant linear neutralization domain on the S2 portion of the murine coronavirus spike glycoprotein and evidence that it forms part of a complex tridimensional structure. *J. Virol.* **67**: 1185-1194.
- DANIEL, C., LACROIX, M., TALBOT, P. J. 1994. Mapping of linear antigenic sites on the S glycoprotein of a neurotropic murine coronavirus with synthetic peptides: A combination of nine prediction algorithms fails to identify relevant epitopes and peptide immunogenicity is drastically influenced by the nature of the protein carrier. *Virology* **202**: 540-549.
- DE GROOT, R. J., LUYTJES, W., HORZINEK, M. C., VAN DER ZEIJST, B. A. M., SPAAN, W. J. M., LENSTRA, J. A. 1987. Evidence for a coiled-coil structure in the spike proteins of coronaviruses. *J. Mol. Biol.* **196**: 963-966.
- DE LA CRUZ, V. F., LAL, A. A., MCCUTCHAN, T. F. 1988. Antigenicity and epitope mapping of foreign sequences via genetically engineered filamentous phage. *J. Biol. Chem.* **263**: 4318-4322.
- DELMAS, B., RASSCHAERT, D., GODET, M., GELFI, J., LAUDE, H. 1990. Four major antigenic sites of the coronavirus transmissible gastroenteritis virus are located on the amino-terminal half of spike glycoprotein S. *J. Gen. Virol.* **71**: 1313-1323.
- DEVLIN, J. J., PANGANIBAN, L. C., DEVLIN, P. E. 1990. Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. *Science* **249**: 404-406.
- DURRANT, L. G., DORAN, M., AUSTIN, E. B., ROBINS, R. A. 1995. Induction of cellular immune responses by a murine monoclonal anti-idiotypic antibody recognizing the 791Tgp72 antigen expressed on colorectal, gastric and ovarian human tumours. *Int. J. Cancer* **6**: 62-66.
- DVEKSLER, G. S., PENSIERO, M. N., CARDELLICHIO, C. B., WILLIAMS, R. K., JIANG, G. S., HOLMES, K. V., DIEFFENBACH, C. W. 1991. Cloning of the mouse hepatitis virus (MHV) receptor: expression in human and hamster cell lines confers susceptibility to MHV. *J. Virol.* **65**: 6881-6891.
- DVEKSLER, G. S., DIEFFENBACH, C. W., CARDELLICHIO, C. B., McCUAIG, K., PENSIERO, M. N., JIANG, G.-S., BEAUCHEMIN, N., HOLMES K. V. 1993. Several members of the mouse carcinoembryonic antigen-related glycoprotein family are functional receptors for the coronavirus mouse hepatitis virus-A59. *J. Virol.* **67**: 1-8.
- DYBWAD, A., BOGEN, B., NATVIG, J. B., FØRRE, Ø., SIOUD, M. 1995. Peptide phage libraries can be an efficient tool for identifying antibody ligands for polyclonal antisera. *Clin. Exp. Immunol.* **102**: 438-442.

- FAGERBERG, J., STEINITZ, M., WIGZELL, H., ASKELÖF, P., MELLSTEDT, H. 1995. Human anti-idiotypic antibodies induced a humoral and cellular immune response against a colorectal carcinoma-associated antigen in patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 4773-4777.
- FELICI, F., CASTAGNOLI, L., MUSACCHIO, A., JAPPELLI, R., CESARENI, G. 1991. Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. *J. Mol. Biol.* **222**: 301-310.
- FELICI, F., LUZZAGO, A., FOLGORI, A., CORTESE, R. 1993. Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides. II. Selection of clones recognized by a protective monoclonal antibody against the *Bordetella pertussis* toxin from phage peptide libraries. *Gene* **128**: 21-27.
- FIELDS, B. A., GOLDBAUM, F. A., YSERN, X., POLJAK, R. J., MARIUZZA, R. A. 1995. Molecular basis of antigen mimicry by an anti-idiotope. *Nature* **374**: 739-742.
- FLEMING, J. O., SHUBIN, R. A., SUSSMAN, M. A., CASTEEL, N., STOHLMAN, S. A. 1989. Monoclonal antibodies to the matrix (E1) glycoprotein of mouse hepatitis virus protect mice from encephalitis. *Virology* **168**: 162-167.
- FLEURY, H. J. A., SHEPPARD, R. D., BORNSTEIN, M. B., RAINE, C. S. 1980. Further ultrastructural observations of virus morphogenesis and myelin pathology in JHM virus encephalomyelitis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **6**: 165-179.
- FOLGORI, A., TAFI, R., MEOLA, A., FELICI, F., GALFRE, G., CORTESE, R., MONACI, P., NICOSIA, A. 1994. A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera. *EMBO J.* **13**: 2236-2243.
- FONS, G. C., UYTDEHAAG, M., OSTERHAUS, A. D. M. E. 1985. Induction of neutralizing antibody in mice against poliovirus type II with monoclonal anti-idiotypic antibody. *J. Immunol.* **134**: 1225-1229
- FRANCOTTE, M., URBAIN, J. 1984. Induction of anti-tobacco mosaic virus antibodies in mice by rabbit antiidiotypic antibodies. *J. Exp. Med.* **160**: 1485-1494.
- GARCIA, K. C., DESIDERIO, S. V., RONCO, P. M., VERROUST, P. J., AMZEL, L. M. 1992. Recognition of angiotensin II: antibodies at different levels of an idiotypic network are superimposable. *Science* **257**: 528-531.
- GILMORE, W., FLEMING, J. O., STOHLMAN, S. A., WEINER, L. P. 1987. Characterization of the structural proteins of the murine coronavirus strain A59 using monoclonal antibodies. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **185**: 177-186.

- GODET, M., L'HARIDON, R., VAUTHEROT, J.-F., LAUDE, H. 1992. TGEV coronavirus ORF4 encodes a membrane protein that is incorporated into virions. *Virology* **188**: 666-675.
- GREENWOOD, J., WILLIS, A. E., PERHAM, R. N. 1991. Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage. Peptides from *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein as antigens. *J. Mol. Biol.* **220**: 821-827.
- HARIHARAN, K., SRIKUMARAN, S., MOXLEY, R. A., OSORIO, F. A., MORALES, A. A. 1989. Induction of neutralizing antibodies to transmissible gastroenteritis virus by anti-idiotypic antibodies. *Viral Immunol.* **2**: 133-142.
- HARRIS, S. L., CRAIG, L., MEHROKE, J. S., RASHED, M., ZWICK, M. B., KENAR, K., TOONE, E. J., GREENSPAN, N., AUZANNEAU, F.-I., MARINO-ALBERNAS, J.-R., PINTO, B. M., SCOTT, J. K. 1997. Exploring the basis of peptide-carbohydrate crossreactivity: Evidence for discrimination by peptides between closely related anti-carbohydrate antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 2454-2459.
- HASSEMANN, M., BUSCHKO, J., FAUSSNER, A., ROSCHER, A. A., HOEBEKE, J. BURCH, R. M., MULLER-ESTERL, W. 1991. Antiidiotypic antibodies bearing the internal image of a bradykinin epitope. Production, characterization, and interaction with the kinin receptor. *J. Immunol.* **147**: 3882-3892.
- HEEMSKERK, M. H. M., SCHOEMAKER, H. M., SPAAN, W. J. M., BOOG, C. J. P. 1995. Predominance of MHC class II-restricted CD4<sup>+</sup> cytotoxic T cells against mouse hepatitis virus A59. *Immunol.* **84**: 521-527.
- HEIN, A., SCHWENDER, S., IMRICH, H., SOPPER, S., CZUB, M., DORRIES, R. 1995. Phenotypic and functional characterization of CD8(+) T lymphocytes from the central nervous system of rats with coronavirus JHM induced demyelinating encephalomyelitis. *J. Neurovirol.* **1**: 340-348.
- HOLMES, K. V., WELSH, R. M., HASPEL, M. V. 1986. Natural cytotoxicity against mouse hepatitis virus infected target cells. I. Correlation of cytotoxicity with virus binding to leukocytes. *J. Immunol.* **136**: 1446-1453.
- HOUTMAN, J. J., FLEMING, J. O. 1996. Pathogenesis of mouse hepatitis virus-induced demyelination. *J. Neurovirol.* **2**: 361-376.
- HUANG, J.-H., WARD, R. E., KOHLER, H. 1986. Idiotope antigens (Ab2 $\alpha$  and Ab2 $\beta$ ) can induce *in vitro* B cell proliferation and antibody production. *J. Immunol.* **137**: 770-776.
- JERNE, N. K. 1974. Towards a network theory of the immune system. *Ann. Immunol.* **125C**: 373-389.

- KAUFFMAN, R. S., NOSEWORTHY, J. H., NEPOM, J. T., FINBERG, R., FIELDS, B. N. 1983. Cell receptors for the mammalian reovirus. II. Monoclonal anti-idiotypic antibody blocks viral binding to cells. *J. Immunol.* **131**: 2539-2541.
- KELLER, P. M., ARNOLD, B. A., SHAW, A. R., TOLMAN, R. L., VAN MIDDLESWORTH, F., BONDY, S., RUSIECKI, V. K., KOENIG, S., ZOLLA-PAZNER, S., CONARD, P., EMINI, E. A., CONLEY, A. J. 1993. Identification of HIV vaccine candidate peptides by screening random phage epitope libraries. *Virology* **193**: 709-716.
- KENNEDY, R. C., ADLER-STROTHZ, K., BURNS, J. W., SR., HENKEL, R. D., DREESMAN, G. R. 1984. Antiidiotypic modulation of herpes simplex virus infection leading to increased pathogenicity. *J. Virol.* **50**: 951-953.
- KENNEDY, R. C., EICHBERG, J. W., LANFORD, R. E., DREESMAN, G. R. 1986. Anti-idiotypic antibody vaccine for type B viral hepatitis in chimpanzees. *Science* **232**: 220-223.
- KÖHLER, G., MILSTEIN, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495-497.
- KÖRNER, H., SCHLIEPHAKE, A., WINTER, J., ZIMPRICH, F., LASSMANN, H., SEDGWICK, J., SIDDELL, S., WEGE, H. 1991. Nucleocapsid or spike protein-specific CD4+ T lymphocytes protect against coronavirus-induced encephalomyelitis in the absence of CD8+ T cells. *J. Immunol.* **147**: 2317-2323.
- KUBO, H., YAMADA, Y. K., TAGUCHI, F. 1994. Localization of neutralizing epitopes and the receptor-binding site within the amino-terminal 330 amino acids of the murine coronavirus spike protein. *J. Virol.* **68**: 5403-5410.
- KUNKEL, H. G., MANNICK, M., WILLIAMS, R. C. 1963. Individual antigenic specificities of isolated antibodies. *Science* **140**: 1218-1219.
- KYUWA, S., STOHLMAN, S. 1990. Background paper. Advances in the study of MHV infection of mice. *Adv. Exp. Med. Biol.* **276**: 555-556.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- LAMARRE, A., LECOMTE, J., TALBOT, P. J. 1991. Antiidiotypic vaccination against murine coronavirus infection. *J. Immunol.* **147**: 4256-4262.
- LAMARRE, A., TALBOT, P. J. 1995. Protection from lethal coronavirus infection by immunoglobulin fragments. *J. Immunol.* **154**: 3975-3984.

- LAMARRE, A., TALBOT, P. J. 1997. Characterization of phage-displayed recombinant anti-idiotypic antibody fragments against coronavirus-neutralizing monoclonal antibodies. *Viral Immunol.* **10**: 175-181.
- LAMPERT, P. W., SIMS, J. K., KNIASOFF, A. J. 1973. Mechanism of demyelination in JHM virus encephalomyelitis. *Acta Neuropathol.* **24**: 76-85.
- LASSOUED, K., DANON, F., BROUET, J.-C. 1991. Human autoantibodies to lamin B receptor are also anti-idiotypic to certain anti-lamin B antibodies. *Eur. J. Immunol.* **21**: 1959-1962.
- LECOMTE, J., CAINELLI-GEBARA, V., MERCIER, G., MANSOUR, S., TALBOT, P. J., LUSSIER, G., OTH, D. 1987. Protection from mouse hepatitis virus type 3-induced acute disease by an anti-nucleoprotein monoclonal antibody. *Arch. Virol.* **97**: 123-130.
- LENSTRA, J. A., ERKENS, J. H. F., LANGEVELD, J. G. A., POSTHUMUS, W. P. A., MELOEN, R. H., GEBAUER, F., CORREA, I., ENJUANES, L., STANLEY, K. K. 1992. Isolation of sequences from a random-sequence expression library that mimic viral epitopes. *J. Immunol. Methods* **152**: 149-157.
- LIU, D. X., INGLIS, S. C. 1991. Association of the infectious bronchitis virus 3c protein with the virion envelope. *Virology* **185**: 911-917.
- LUCAS, G. P., CAMBIASO, C. L., VAERMAN, J. P. 1993. An interspecies idiootype associated with the anti-cholera toxin response detected by a monoclonal auto-anti-idiotypic antibody. *Immunol.* **78**: 498-504.
- LUNDIN, K., SAMUELSSON, A., JANSSON, M., HINKULA, J., WAHREN, B., WIGZELL, H., PERSSON, M. A. A. 1996. Peptides isolated from random peptide libraries on phage elicit a neutralizing anti-HIV-1 response: analysis of immunological mimicry. *Immunol.* **89**: 579-586.
- LUYTJES, W., GEERTS, D., POSTHUMUS, W., MELOEN, R., SPAAN, W. 1989. Amino acid sequence of a conserved neutralizing epitope of murine coronaviruses. *J. Virol.* **63**: 1408-1412.
- LUZZAGO, A., FELICI, F., TRAMONTANO, A., PESSI, A., CORTESE, R. 1993. Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides. I. Epitope mapping of human H ferritin using a phage library of constrained peptides. *Gene* **128**: 51-57.
- MACKANESS, G. B. 1969. The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity *in vivo*. *J. Exp. Med.* **129**: 973-992.
- MARASCO, W. A., BECKER, E. L. 1982. Anti-idiotypic antibody against formyl peptide chemotaxis receptor of the neutrophil. *J. Immunol.* **128**: 963-969.

- MEOLA, A., DELMASTRO, P., MONACI, P., LUZZAGO, A., NICOSIA, A., FELICI, F., CORTESE, R., GALFRE, G. 1995. Derivation of vaccines from mimotopes. Immunologic properties of human hepatitis B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous phage. *J. Immunol.* **154**: 3162-3172.
- MYINT, S. H. 1994. Human coronaviruses- a brief review. *Rev. Med. Virol.* **4**: 35-46.
- NAKANAGA, K., ISHIDA, T., FUJIWARA, K. 1983. Differences in antibody production against mouse hepatitis virus (MHV) among mouse strains. *Lab. Animals* **17**: 90-94.
- NAKANAGA, K., YAMANOUCHI, K., FUJIWARA, K. 1986. Protective effect of monoclonal antibodies on lethal mouse hepatitis virus infections in mice. *J. Virol.* **59**: 168-171.
- NISONOFF, A. 1991. Idiotypes: concepts and applications. *J. Immunol.* **147**: 2429-2438.
- NOSEWORTHY, J. H., FIELDS, B. N., DICHTER, M. A., SOBOTKA, C., PIZER, E., PERRY, L. L., NEPOM, J. T., GREENE, M. I. 1983. Cell receptors for the mammalian reovirus. I. Syngeneic monoclonal anti-idiotypic antibody identifies a cell surface receptor for reovirus. *J. Immunol.* **131**: 2533-2538.
- OLDENBURG, K. R., LOGANATHAN, D., GOLDSTEIN, I. J., SCHULTZ, P. G., GALLOP, M. A. 1992. Peptide ligands for a sugar-binding protein isolated from a random peptide library. *Proc. Natl., Acad. Sci. USA* **89**: 5393-5397.
- LOUDIN, J., MICHEL, M. 1963. Une nouvelle forme d'allotypie des globulines g du sérum de lapin apparemment liée à la fonction et à la spécificité d'anticorps. *CR Hebd. Séances Acad. Sci.* **257**: 805-808.
- PARMLEY, S. F., SMITH, G. P. 1988. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* **73**: 305-318.
- PRIDE, M. W., SHI, H., ANCHIN, J. M., LINTHICUM, D. S., LO VERDE, P. T., THAKUR, A., THANAVALA, Y. 1992. Molecular mimicry of hepatitis B surface antigen by an anti-idiotypic-derived synthetic peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 11900-11904.
- PRIDE, M. W., THAKUR, A., THANAVALA, Y. 1993. Mimicry of the a determinant of hepatitis B surface antigen by an anti-idiotypic antibody. I. Evaluation in hepatitis B surface antigen responder and nonresponder strains. *J. Exp. Med.* **177**: 127-134.
- RAJEWSKY, K., TAKEMORI, T. 1983. Genetics, expression and function of idiotypes. *Ann. Rev. Immunol.* **1**: 569-607.



- RAYCHAUDHURY, S., SAEKI, Y., FUJI, H., KOHLER, H. 1986. Tumor-specific idiotype vaccines. I. Generation and characterization of internal image tumor antigen. *J. Immunol.* **137**: 1743-1749.
- RAYCHAUDHURY, S., SAEKI, Y., CHEN, J.-J., IRIBE, H., FUJI, H., KOHLER, H. 1987a. Tumor-specific idiotype vaccines. II. Analysis of the tumor-related response induced by the tumor and by internal image antigens (Ab<sub>2</sub> $\beta$ ). *J. Immunol.* **139**:271-278.
- RAYCHAUDHURY, S., SAEKI, Y., CHEN, J.-J., KOHLER, H. 1987b. Tumor-specific idiotype vaccines. III. Induction of T helper cells by anti-idiotype and tumor cells. *J. Immunol.* **139**: 2096-2102.
- REAGAN, K. J., WINNER, W. H., WIKTOR, T. J., KOPROWSKI, H. 1983. Anti-idiotypic antibodies induce neutralizing antibodies to rabies virus glycoprotein. *J. Virol.* **48**: 660-666.
- REES, D. M., PRAPUTPITTAYA, K., SCOGING, A., DOBSON, N., IVANYL, J., YOUNG, D., LAMB, J. R. 1987. T-cell activation by anti-idiotypic antibody: evidence for the internal image. *Immunol.* **60**: 389-393.
- RISKI, H., HOVI, T. 1980. Coronavirus infections of man associated with diseases other than the common cold. *J. Med. Virol.* **6**: 259-265.
- SACKS, D. L., ESSER, K., SHER, A. 1982. Immunization of mice against African trypanosomiasis using anti-idiotypic antibodies. *J. Exp. Med.* **115**: 1108-1119.
- SACKS, D. L., KIRCHHOFF, L. V., HIENY, S., SHER, A. 1985. Molecular mimicry of a carbohydrate epitope on a major surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi* by using anti-idiotypic antibodies. *J. Immunol.* **135**: 4155-4159.
- SAEKI, K., OHTSUKA, N., TAGUCHI, F. 1997. Identification of spike protein residues of murine coronavirus responsible for receptor-binding activity by use of soluble receptor-resistant mutants. *J. Virol.* **71**: 9024-9031.
- SCHICK, M. R., DREESMAN, G. R., KENNEDY, R. C. 1987. Induction of an anti-hepatitis B surface antigen response in mice by noninternal image (Ab<sub>2</sub> $\alpha$ ) anti-idiotypic antibodies. *J. Immunol.* **138**: 3419-3425.
- SCHREIBER, A. B., COURAND, P. O., ANDRE, C., VRAY, B., STROSSBERG, A. 1980. Anti-alprenolol anti-Id antibodies bind to  $\beta$ -adrenergic receptors and modulate catecholamine-sensitive adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 7385-7389.
- SCOTT, J. K., SMITH, G. P. 1990. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* **249**: 386-390.

- SCOTT, J. K., LOGANATHAN, D., EASLEY, R. B., GONG, X., GOLDSTEIN, I. J. 1992. A family of concanavalin A-binding peptides from a hexapeptide epitope library Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**: 5398-5402.
- SEGE, K., PETERSON, P. A. 1978. Use of anti-idiotypic antibodies as cell-surface receptor probes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**: 2443-2447.
- SIDDELL, S. G. 1995. The *Coronaviridae*. S. G. Siddell, Éd. Plenum press, New York, p. VII-VIII.
- SMITH, G. P. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science **228**: 1315-1317.
- STEPHEN, C. W., LANE, D. P. 1992. Mutant conformation of p53: precise epitope mapping using a filamentous phage epitope library. J. Mol. Biol. **225**: 577-583.
- STOHLMAN, S. A., MATSUSHIMA, G. R., CASTEEL, N., WEINER, L. P. 1986. *In vivo* effects of coronavirus-specific T cell clones: DTH inducer cells prevent a lethal infection but do not inhibit virus replication. J. Immunol. **136**: 3052-3056.
- STOUTE, J. A., BALLOU, W. R., KOLODNY, N., DEAL, C. D., WIRTZ, R. A., LINDLER, L. E. 1995. Induction of humoral immune response against *Plasmodium falciparum* sporozoites by immunization with a synthetic peptide mimotope whose sequence was derived from screening a filamentous phage epitope library. Infect. Immun. **63**: 934-939.
- STURMAN, L. S., RICARD, C. S., HOLMES, K. V. 1985. Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of mouse coronavirus activation of cell-fusing activity of virions by trypsin and separation of two different 90K cleavage fragments. J. Virol. **56**: 904-911.
- SUÑÉ, C., SMERDOU, C., ANTÓN, I. M., ABRIL, P., PLANA, J., ENJUANES, L. 1991. A conserved coronavirus epitope, critical in virus neutralization, mimicked by internal-image monoclonal anti-idiotypic antibodies. J. Virol. **65**: 6979-6984.
- TAGUCHI, F. 1995. The S2 subunit of the murine coronavirus spike protein is not involved in receptor binding. J. Virol. **69**: 7260-7263.
- TALBOT, P. J., SALMI, A. A., KNOBLER, R. L., BUCHMEIER, M. J. 1984. Topographical mapping of epitopes on the glycoproteins of murine hepatitis virus-4 (strain JHM): correlation with biological activities. Virology **132**: 250-260.
- WANG, F.I., STOHLMAN, S.A., FLEMING, J.O. 1990. Demyelination induced by murine hepatitis virus JHM strain (MHV-4) is immunologically mediated. J. Neuroimmunol. **30**: 31-41.

- WANG, K.-S., SCHMALJOHN, A. L., KUHN, R. J., STRAUSS, J. H. 1991. Antiidiotypic antibodies as probes for the Sindbis virus receptor. *Virology* **181**: 694-702.
- WASSERMANN, N. H., PENN, A. S., FREIMUTH, P. I., TREPTOW, N., WENTZEL, S., CLEVELAND, W. L., ERLANGER, B. F. 1982. Antiidiotypic route to anti-acetylcholine receptor antibodies and experimental myasthenia gravis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 4810-4814.
- WATANABE, R., WEGE, H., TER MEULEN, V. 1983. Adoptive transfer of EAE-like lesions from rats with coronavirus-induced demyelinating encephalomyelitis. *Nature* **305**: 150-153.
- WEGE, H., SIDDELL, S. H., TER MEULEN, V. 1982. The biology and pathogenesis of coronaviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **99**: 165-200.
- WEINER, L. P. 1973. Pathogenesis of demyelination induced by a mouse hepatitis virus (JHM). *Arch. Neurol.* **28**: 298-303.
- WELSH, R. M., HASPEL, M. V., PARKER, D. C., HOLMES, K. V. 1986. Natural cytotoxicity against mouse hepatitis virus-infected cells. II. A cytotoxic effector cell with a B lymphocyte phenotype. *J. Immunol.* **136**: 1454-1460.
- WILLIAMS, R. K., JIANG, G.-S., SNYDER, S. W., FRANA, M. F., HOLMES, K. V. 1990. Purification of the 110-kilodalton glycoprotein receptor for mouse hepatitis virus (MHV)-A59 from mouse liver and identification of a nonfunctional, homologous protein in MHV-resistant SJL/J mice. *J. Virol.* **64**: 3817-3823.
- WILLIAMS, R. K., JIANG, G.-S., HOLMES, K. V. 1991. Receptor for mouse hepatitis virus is a member of the carcinoembryonic antigen family of glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 5533-5536.
- WILLIAMSON, J. S. P., STOHLMAN, S. A. 1990. Effective clearance of mouse hepatitis virus from the central nervous system requires both CD4+ and CD8+ T-cells. *J. Virol.* **64**: 4589-4592.
- WINTER, G., GRIFFITHS, A. D., HAWKINS, R. E., HOOGENBOOM, H. R. 1994. Making antibodies by phage display technology. *Annu. Rev. Immunol.* **12**: 433-455.
- YANG, Y.-F., THANAVALA, Y. 1995 A comparison of the antibody and T cell response elicited by internal image and noninternal image anti-idiotypes. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **75**: 154-158.
- YOKOMORI, K., BAKER, S. C., STOHLMAN, S. A., LAI, M. M. C. 1992. Hemagglutinin-esterase-specific monoclonal antibodies alter the neuropathogenicity of mouse hepatitis virus. *J. Virol.* **66**: 2865-2874.

- YU, X., BI, W., WEISS, S. R., LEIBOWITZ, J. L. 1994. Mouse hepatitis virus gene 5b is a new virion envelope protein. *Virology* **202**: 1018-1023.
- ZHONG, G., SMITH, G. P., BERRY, J., BRUNHAM, R. C. 1994. Conformational mimicry of a chlamydial neutralization epitope on filamentous phage. *J. Biol. Chem.* **269**: 24183-24188.
- ZHOU, E.-M., LOHMAN, K. L., KENNEDY, R. C. 1990. Administration of noninternal image monoclonal anti-idiotypic antibodies induces idio-  
type-restricted responses specific for human immunodeficiency virus envelope glycoprotein epitopes. *Virology* **174**: 9-17.

**ANNEXE I**

**LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS**

**PUBLICATIONS**

**Yu, M. W. N.** and P. J. Talbot. Production and characterization of monoclonal anti-idiotypic antibodies against a neutralizing and protective monoclonal antibody specific to a neurotropic coronavirus. (manuscript en préparation)

**Yu, M. W. N.** and P. J. Talbot. Characterization of protection against coronavirus infection by polyclonal non-internal image anti-idiotypic antibody. (Manuscript soumis pour publication)

**Yu, M. W. N.**, Scott, J. K. and P. J. Talbot. Protective vaccination against coronavirus using phage-displayed peptides selected by neutralizing antibodies. (Manuscript soumis pour publication)

Sizun J., **Yu, M. W. N.** and P. J. Talbot. Survival of human coronaviruses 229E and OC43 in suspension and after drying on surfaces: a possible source of nosocomial infections. (Manuscript soumis pour publication)

Lamarre, A., **Yu, M. W. N.**, Chagnon, F. and P. J. Talbot. 1997. A recombinant single chain antibody efficiently neutralizes coronavirus infectivity but only slightly delays lethal infection of mice. *Eur. J. Immunol.* **27**: 3447-3455.

**Yu, M. W. N.**, Lemieux, S. and P. J. Talbot. 1996. Genetic control of anti-idiotypic vaccination against coronavirus infection. *Eur. J. Immunol.* **26**: 3230-3233.

**Yu, M.** and P. J. Talbot. 1995. Induction of a protective immune response to murine coronavirus with non-internal image anti-idiotypic antibodies. *Adv. Exp. Med. Biol.* **380**, 165-172.

## COMMUNICATIONS

**Yu, M. W. N., Scott, J. K. and P. J. Talbot.** Coronavirus vaccination and epitope mapping with phage-displayed peptides. American Society for Virology (ASV). 17th Annual Meeting, Vancouver, Canada, juillet 1998.

**Yu, M. W. N., Scott, J. K. and P. J. Talbot.** Induction of a protective immune response against coronavirus infection by immunization with phage-displayed peptides. 47ième réunion annuelle de la Société Canadienne des Microbiologistes (CSM), Québec, Canada, juin 1997.

**Yu, M. , Lamarre, A. and P.J. Talbot.** Vaccination against coronavirus infection in different strains of mice by non-internal image anti-idiotypic antibody. 9th International Congress of Immunology, San Francisco, USA, juillet 1995.

**Talbot, P. J., Chagnon, F., Côté, G., Daniel, C., Ekandé, S., Lamarre, A., Mounir, S., Ouellet, F., Stewart, J. N. and M. Yu.** Neurotropism of coronaviruses in humans and protective immunity in the mouse. VIth International Conference on Comparative and Applied Virology, Montréal, Canada, octobre 1994.

**Yu, M., Lamarre, A. and P. J. Talbot.** Partial lack of genetic restriction for anti-coronaviral protection by a polyclonal anti-idiotypic antibody of the gamma type. Sixth International Symposium on Corona and Related Viruses, Québec, Canada, août 1994.

**Yu M. and P. J. Talbot.** Characterization of monoclonal and polyclonal anti-idiotypic antibodies against a neutralizing and protective monoclonal antibody specific to a neurotropic murine coronavirus. Canadian Society For Immunology (CSI), Lake Louise, Canada, mars 1993.

**Yu, M. ,Lamarre, A. et P.J. Talbot.** Production d'anticorps anti-idiotypiques monoclonaux contre un anticorps monoclonal spécifique au coronavirus murin. Association canadienne-française pour l'avancement des sciences (ACFAS), Montréal, Canada, mai 1992.

**ANNEXE II**

**COPIE DES ARTICLES PUBLIES**



A recombinant single chain antibody neutralizes coronavirus infectivity but only slightly delays lethal infection of mice.

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur. Il est néanmoins disponible sur le site de l'éditeur sous le DOI: [10.1002/eji.1830271245](https://doi.org/10.1002/eji.1830271245)



















Genetic control of anti-idiotypic vaccination against coronavirus infection

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur. Il est néanmoins disponible sur le site de l'éditeur sous le DOI: [10.1002/eji.1830261258](https://doi.org/10.1002/eji.1830261258)





