



UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

THÈSE PRÉSENTÉE À  
L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DU DOCTORAT EN VIROLOGIE

PAR

CLAUDE DANIEL

IMMUNOGÉNÉICITÉ ET STRUCTURE ANTIGÉNIQUE  
DE LA PROTÉINE DE SURFACE  
DU CORONAVIRUS MURIN

OCTOBRE 1993

---



À Sylvie

---

## TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	II
TABLE DES MATIÈRES.....	III
LISTE DES TABLEAUX.....	VII
LISTE DES FIGURES.....	VIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XI
SOMMAIRE.....	XIV
INTRODUCTION.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
1. TAXONOMIE DES CORONAVIRIDAE.....	5
2. COMPOSITION ET STRUCTURE DU VIRUS.....	6
2.1 Morphologie.....	6
2.2 Protéines structurales.....	10
2.3 Génome.....	11
2.4 Lipides.....	11
2.5 Données physico-chimiques.....	14
3. RÉPLICATION.....	14
3.1 Attachement et pénétration.....	14
3.2 Transcription.....	16
3.3 Synthèses protéiques.....	20
3.4 Assemblage et bourgeonnement des virions.....	21
3.5 Recombinaison génétique et variants.....	21
4. PATHOGÉNICITÉ.....	22
4.1 Pathogénicité du virus de l'hépatite murine.....	24
4.2 Immunité induite par le virus de l'hépatite murine.....	26
4.3 Sclérose en plaques et coronavirus.....	27
5. FONCTIONS, STRUCTURE ET IMMUNOGÉNICITÉ DES PROTÉINES.....	28
5.1 La nucléoprotéine N.....	28
5.2 La protéine de membrane M.....	29
5.3 L'hémagglutinine-estérase HE.....	31
5.4 La glycoprotéine de surface S.....	31
5.4.1 Variabilité nucléotidique du gène de la glycoprotéine S du MHV.....	39
5.5 Autres protéines.....	39
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	43
1. CELLULES.....	44
1.1 Lignées cellulaires.....	44
1.2 Culture cellulaire.....	44
2. VIRUS.....	44

2.1	Souches virales.....	44
2.2	Productions virales.....	45
2.3	Marquage métabolique du virus.....	45
2.4	Test de plages.....	46
2.5	Dose infectieuse en culture de tissu.....	46
3.	PRODUCTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX.....	47
3.1	Immunisations.....	47
3.2	Fusion cellulaire.....	47
3.3	Criblage et clonage des hybridomes.....	48
3.4	Isotypie et dosage des anticorps.....	48
3.5	Production des liquides d'ascites .....	49
4.	ELISA .....	50
4.1	Préparation de l'antigène .....	50
4.2	Marquage à la biotine .....	51
4.3	Immunodétection directe.....	51
4.4	Test de compétition .....	53
4.5	Quantification de la glycoprotéine S.....	54
5.	IMMUNOPRÉCIPITATION.....	54
5.1	Préparation de l'antigène .....	54
5.2	Précipitation .....	55
6.	ÉLECTROPHORÈSES ET IMMUNOEMPRESSES.....	56
6.1	Électrophorèse de protéines (SDS-PAGE) .....	56
6.2	Immunoempreinte de type "Western".....	58
6.3	Immunoempreinte ponctuelle.....	59
7.	NEUTRALISATION ET INHIBITION DE FUSION.....	59
7.1	Neutralisation de plages.....	59
7.2	Neutralisation d'effet cytopathique .....	60
7.3	Inhibition de fusion.....	60
8.	EXPÉRIMENTATION CHEZ LA SOURIS .....	60
8.1	Souris.....	60
8.2	Immunisations.....	61
8.3	Épreuves virales.....	61
9.	CHROMATOGRAPHIES D'AFFINITÉ .....	62
9.1	Purification des anticorps monoclonaux.....	62
9.2	Préparation de l'immunoabsorbant .....	63
9.3	Solubilisation de l'antigène.....	63
9.4	Immunoabsorption en tube .....	63
9.5	Chromatographie en colonne .....	64
10.	PEPTIDES SYNTHÉTIQUES .....	65
10.1	Algorithmes de prédiction.....	65
10.2	Analyses et sélection des peptides .....	66
10.3	Couplages.....	66
11.	CLONAGE ET EXPRESSION DE LA RÉGION IMMUNODOMINANTE.....	67

11.1	Extraction des ARN viraux.....	67
11.2	Amplification de la région immunodominante.....	68
11.2.1	Électrophorèse d'ADN.....	69
11.3	Préparation des bactéries compétentes et transformations.....	70
11.3.1	Préparation des bactéries compétentes.....	70
11.3.2	Transformations bactériennes.....	70
11.4	Clonage.....	71
11.5	Expression.....	72
	RÉSULTATS.....	74
1.	CARACTÉRISATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX.....	75
2.	OPTIMISATION DE LA PRODUCTION VIRALE ET DE L'ANTIGÉNICITÉ DE LA GLYCOPROTÉINE S.....	79
2.1	Effet du pH sur la production du MHV-A59.....	79
2.2	Effet du pH sur l'antigénicité de la glycoprotéine S.....	82
3.	PURIFICATION DE LA GLYCOPROTÉINE S.....	92
3.1	Caractérisation d'épitopes de la glycoprotéine S.....	92
3.2	Efficacité de la méthodologie employée.....	97
3.3	Immunogénicité de la protéine purifiée.....	105
4.	IDENTIFICATION DE SITES ANTIGÉNIQUES SUR LA GLYCOPROTÉINE S.....	113
4.1	Analyse de séquence et sélection de peptides.....	113
4.2	Immunogénicité des peptides synthétiques.....	119
4.3	Antigénicité des peptides synthétiques.....	121
5.	LOCALISATION D'ÉPITOPES SUR LA STRUCTURE PRIMAIRE DE LA GLYCOPROTÉINE S.....	133
5.1	Réactivité d'anticorps monoclonaux contre la banque d'expression.....	133
5.2	Expression de la région immunodominante dans le vecteur pET3xa.....	147
5.3	Réactivité d'anticorps monoclonaux contre l'épitope A.....	148
	DISCUSSION.....	162
1.	ANTIGÉNICITÉ COMPARÉE DE LA GLYCOPROTÉINE S À pH6/pH7.....	163
2.	IMMUNOGÉNICITÉ DE LA PROTÉINE S PURIFIÉE.....	166
3.	IDENTIFICATION DE SITES ANTIGÉNIQUES À L'AIDE DE PEPTIDES SYNTHÉTIQUES.....	169
4.	LOCALISATION D'ÉPITOPES SUR LA STRUCTURE PRIMAIRE DE LA PROTÉINE S.....	175
5.	MODÈLE RELATIONNEL DE LA STRUCTURE ANTIGÉNIQUE DE LA GLYCOPROTÉINE S.....	178
	CONCLUSION.....	187
	REMERCIEMENTS.....	189
	BIBLIOGRAPHIE.....	191

- ANNEXE I : Liste des communications
- ANNEXE II : Physico-chemical properties of murine hepatitis virus, strain A59
- ANNEXE III : Protection from lethal coronavirus infection by affinity-purified spike glycoprotein of murine hepatitis virus, strain A59
- ANNEXE IV : 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
- ANNEXE V : 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
- ANNEXE VI : Influence of the cell cycle on the infectious titer of murine hepatitis virus, strain A59

**LISTE DES TABLEAUX**

- TABLEAU I** : Pathogénie des coronavirus
- TABLEAU II** : Propriétés biologiques d'AcMo spécifiques à la glycoprotéine S
- TABLEAU III** : Propriétés biologiques des plasmas de souris immunisées avec la glycoprotéine S purifiée (expérience 2)
- TABLEAU IV** : Propriétés biologiques des plasmas de souris immunisées avec la glycoprotéine S purifiée (expérience 3)
- TABLEAU V** : Peptides synthétiques sélectionnés
- TABLEAU VI** : Immunogénicité des peptides synthétiques
- TABLEAU VII** : Immunogénicité des peptides "peptide A" et "MHV2" couplés au BSA ou au KLH
- TABLEAU VIII** : Banque d'AcMo disponibles
- TABLEAU IX** : Résumé des compétitions observées entre des AcMo spécifiques au MHV

## LISTE DES FIGURES

- FIGURE 1** : Structure du coronavirus
- FIGURE 2** : Organisation génomique des coronavirus
- FIGURE 3** : Modèle structural des péplomères du coronavirus
- FIGURE 4** : Comparaison des régions hypervariables du MHV-4, MHV-A59 et MHV-JHM
- FIGURE 5** : Protection passive de souris par des anticorps monoclonaux contre une épreuve létale avec le virus MHV-A59
- FIGURE 6** : Cinétique de réplication du virus MHV-A59 cultivé à pH 6,0 ou 7,0
- FIGURE 7** : Immunoempreinte des protéines virales du MHV-A59 produit à pH 6,0 ou 7,0
- FIGURE 8** : Comparaison du profil électrophorétique des virus MHV-A59 produits à pH 6,0 ou 7,0
- FIGURE 9** : Immunoprécipitation d'antigènes viraux produits à pH 6,0 ou 7,0
- FIGURE 10** : Réactivité d'anticorps spécifiques au MHV contre l'antigène viral produit à pH 6,0 ou 7,0
- FIGURE 11** : Compétition réciproque des AcMo 7-10A.13 et 4-11G.6
- FIGURE 12** : Sensibilité de la glycoprotéine S à la dénaturation
- FIGURE 13** : Dosage semi-quantitatif de la glycoprotéine S
- FIGURE 14** : Immunoabsorption de l'antigène viral marqué à la méthionine [<sup>35</sup>S] au gel de Sepharose-7-10A.13
- FIGURE 15** : Analyse par SDS-PAGE et coloration à l'argent de la purification de la glycoprotéine S par chromatographie d'immunoaffinité en colonne

- FIGURE 16** : Protection de souris BALB/c par vaccination avec la glycoprotéine S purifiée
- FIGURE 17** : Inhibition de fixation de l'AcMo 4-11G.6 par le plasma anti-S
- FIGURE 18** : Analyse de la séquence nucléotidique de la glycoprotéine S du MHV-A59 à l'aide d'algorithmes de prédiction d'épitopes
- FIGURE 19** : Immunoempreinte du virus MHV-A59 avec les plasmas anti-peptides
- FIGURE 20** : Immunoempreinte comparée du virus MHV-A59 avec les plasmas anti-peptides MHV2 et peptide A couplés au BSA ou au KLH
- FIGURE 21** : Inhibition de fixation des AcMo 5B19.2 et E17 par les plasmas anti-peptides A couplés au BSA ou au KLH
- FIGURE 22** : Réactivité de l'AcMo 5B19.2 contre le peptide A couplé au BSA ou au KLH
- FIGURE 23** : Représentation schématique du vecteur pEX et de la banque des fragments de la protéine S exprimés chez *E. coli*
- FIGURE 24** : Immunoempreintes de la banque des fragments de la protéine S exprimés dans le vecteur pEX avec les AcMo E17 et J.2.2
- FIGURE 25** : Immunoempreintes de la banque des fragments de la protéine S exprimés dans le vecteur pEX avec les AcMo 1-9F.18, D14, E16 et F18
- FIGURE 26** : Immunoempreintes de la banque des fragments de la protéine S exprimés dans le vecteur pEX avec les AcMo 5B170.3, 5B207.5, H6A et 2E10.3
- FIGURE 27** : Immunoempreintes de la banque des fragments de la protéine S exprimés dans le vecteur pEX avec les AcMo 5B93.9 et D12
- FIGURE 28** : Localisation d'épitopes linéaires sur la structure primaire de la glycoprotéine S de MHV-A59
- FIGURE 29** : Amplification par transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne de la région immunodominante du gène de la protéine S de MHV-A59



- FIGURE 30** : Représentation schématique du vecteur d'expression procaryotique pET-3xa et de la région de contrôle de la transcription
- FIGURE 31** : Immunoempreinte du domaine immunodominant avec les AcMo dont le site de liaison a été localisé
- FIGURE 32** : Immunoempreinte du domaine immunodominant avec différents antisérums contre le MHV-A59
- FIGURE 33** : Immunoempreinte du virus MHV-A59 avec les plasmas de souris immunisées avec le domaine immunodominant
- FIGURE 34** : Réactivité d'AcMo spécifiques à la glycoprotéine S contre le peptide A
- FIGURE 35** : Modèle relationnel topographique d'épitopes continus et discontinus de la glycoprotéine S

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>ACF</b>	: adjuvant complet de Freund
<b>AcMo</b>	: anticorps monoclonal (monoclonaux)
<b>ADN</b>	: acide désoxyribonucléique complémentaire
<b>AIF</b>	: adjuvant incomplet de Freund
<b>ARN<sub>m</sub></b>	: acide ribonucléique messenger
<b>ATCC</b>	: American Type Culture Collection
<b>BAP</b>	: phosphatase alcaline bovine
<b>BCV</b>	: coronavirus bovin
<b>BSA</b>	: albumine sérique bovine
<b>CCV</b>	: coronavirus canin
<b>DICT</b>	: dose infectieuse en culture de tissu
<b>DL50</b>	: dose létale à 50%
<b>DVIM</b>	: virus de la diarrhée infantile de la souris
<b>FECV</b>	: coronavirus entérique félin
<b>FIPV</b>	: virus de la péritonite infectieuse féline
<b>h</b>	: heure(s)
<b>HCV</b>	: coronavirus humain
<b>HECV</b>	: coronavirus humain entérique
<b>HEV</b>	: virus de l'encéphalomyélite hémagglutinante du porc
<b>i.c.</b>	: intra-cérébrale
<b>i.p.</b>	: intra-péritonéale
<b>IBV</b>	: virus de la bronchite infectieuse aviaire
<b>IPTG</b>	: isopropylthiogalactopyranoside
<b>kb</b>	: kilobase

<b>kDa</b>	:	kiloDalton
<b>KLH</b>	:	hémocyanine de patelle
<b>MHV</b>	:	virus de l'hépatite murine
<b>MHV2/BSA</b>	:	peptide MHV2 couplé au BSA
<b>MHV2/KLH</b>	:	peptide MHV2 couplé au KLH
<b>MOI</b>	:	multiplicité d'infection
<b>NHS</b>	:	N-hydroxysuccinimidobiotine
<b>NP-40</b>	:	Nonidet P-40
<b>p.i.</b>	:	post-infection
<b>PCR</b>	:	réaction de polymérisation en chaîne
<b>PEG</b>	:	polyéthylène glycol
<b>peptide A/BSA</b>	:	peptide A couplé au BSA
<b>peptide A/HA</b>	:	peptide A couplé à un épitope T de l'hémagglutinine du virus influenza
<b>peptide A/KLH</b>	:	peptide A couplé au KLH
<b>PRCV</b>	:	coronavirus respiratoire du porc
<b>RbCV</b>	:	coronavirus du lapin
<b>RCV</b>	:	coronavirus du rat
<b>RER</b>	:	réticulum endoplasmique rugueux
<b>SDS</b>	:	docécyll sulfate de sodium
<b>SFB</b>	:	sérum foetal bovin
<b>SMPB</b>	:	succinimidyl 4-( <i>p</i> -maleimidophenyl) butyrate
<b>SNC</b>	:	système nerveux central
<b>SP</b>	:	sclérose en plaques
<b>Sulfo-SMCC</b>	:	sulfosuccinimidyl 4-(N-maléimidométhyl)-cyclohexane-1-carboxylate
<b>TCV</b>	:	coronavirus de dinde

- TGEV** : virus de la gastroentérite transmissible du porc
- UFP** : unité formatrice de plages

## SOMMAIRE

Dans le but d'identifier les déterminants moléculaires responsables de la pathogénie du coronavirus murin MHV-A59, nous avons étudié l'importance de la glycoprotéine de surface S dans la réponse immunitaire contre le coronavirus. Nous avons purifié la glycoprotéine par chromatographie d'immunoaffinité et analysé son immunogénicité chez la souris BALB/c. Nous avons démontré que la glycoprotéine S purifiée pouvait induire la synthèse d'anticorps neutralisants et protéger les souris contre une épreuve létale avec le MHV-A59. La structure antigénique de la glycoprotéine S a par la suite été étudiée. Nous avons analysé, avec des algorithmes de prédiction d'épitopes, la séquence déduite en acides aminés de la glycoprotéine S. Des peptides synthétiques ont été sélectionnés et leur immunogénicité vérifiée chez la souris BALB/c. Aucun nouveau site antigénique biologiquement important n'a été identifié. Cependant, une grande différence d'immunogénicité a été mise en évidence entre les peptides couplés à l'albumine sérique bovine et les peptides couplés à l'hémocyanine de patelle. Finalement, une banque de fragments de la glycoprotéine S exprimés dans les vecteurs pEX et pET a permis de localiser les sites de liaison d'anticorps monoclonaux sur la structure primaire de la protéine S. Un site immunodominant associé à la neutralisation formé d'épitopes continus a été identifié près de l'extrémité N-terminale de la sous-unité S2. De plus, nos résultats suggèrent un mécanisme de neutralisation impliquant l'induction d'un changement conformationnel. Finalement, nous avons proposé un modèle reliant topographiquement des sites antigéniques discontinus aux sites linéaires identifiés dans notre étude.

## INTRODUCTION

Les coronavirus sont responsables de nombreuses maladies, principalement des systèmes respiratoire, gastrointestinal et nerveux, et ce tant chez l'homme que chez les animaux. En plus d'infections aiguës, les coronavirus peuvent également établir des infections asymptomatiques et chroniques. Quelques observations expérimentales ont amené des chercheurs à suspecter le coronavirus humain comme agent étiologique de maladies neurologiques chez l'homme. Ces hypothèses ont récemment été ravivées par la détection du génome du coronavirus humain dans le cerveau d'individus atteints de sclérose en plaques.

Le coronavirus murin constitue un excellent modèle animal pour l'étude de maladies neurologiques d'étiologie virale. Les souches A59 et JHM du virus de l'hépatite murine peuvent infecter le système nerveux central de souris et causer une infection chronique. Les mécanismes responsables de la pathogénie de ces virus demeurent cependant indéterminés. Plusieurs observations suggèrent que la glycoprotéine S, impliquée dans l'attachement au récepteur cellulaire et la pénétration du virion dans la cellule cible, porterait les déterminants moléculaires de la pathogénie du coronavirus. Les buts de la recherche présentée dans cette thèse sont de démontrer directement l'importance de cette glycoprotéine S dans la pathogénie du MHV-A59 et d'en identifier et caractériser les déterminants importants. L'étude des interactions du virus avec le système immunitaire de la souris a été choisie comme moyen indirect pour mener à bien cette recherche. L'approche expérimentale considérée pour atteindre le premier but fixé a été la purification de la protéine S par chromatographie d'immunoaffinité et l'évaluation de l'immunogénicité de la protéine purifiée. La prédiction de sites antigéniques et l'étude de

l'immunogénicité de peptides synthétiques sélectionnés, de même que la localisation d'épitopes reconnus par des anticorps monoclonaux, ont été considérées pour atteindre le second but.



**REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

## 1. TAXONOMIE DES CORONAVIRIDAE

Les premières observations de maladie d'étiologie coronavirale ont été décrites chez la volaille (Schalk et Hawn 1931), le porc (Doyle et Hutchings 1946), et la souris (Cheever *et al.* 1949). Ce n'est qu'en 1965 que l'on identifia et isola un coronavirus humain à partir de sujets atteints de rhumes (Tyrrell et Bynoe 1965). L'examen en microscopie électronique de ce virus, de même que des virus de la bronchite aviaire (IBV), de la gastro-entérite transmissible du porc (TGEV), et du virus de l'hépatite murine (MHV) révéla qu'ils avaient une morphologie commune, soit celle d'un virus enveloppé présentant une couronne de projections de surface, ou péplomères. Des travaux ultérieurs de caractérisation confirmèrent leur ressemblance et menèrent à la suggestion qu'une nouvelle famille de virus devait être formée (Tyrrell *et al.* 1968). Ce n'est cependant qu'en 1975 que la création de cette nouvelle famille de virus, les *Coronaviridae*, fut acceptée par le comité international de taxonomie virale (Tyrrell *et al.* 1975). Leurs principales distinctions taxonomiques sont, en plus de leur morphologie particulière, leur génome d'ARN monocaténaire de polarité positive de plus de 30 kilobases, et leur stratégie de réplication impliquant la synthèse d'ARN messagers (ARNm) sous-génomiques co-terminaux en 3' ("nested set") et la présence de séquences de tête ("leader sequence") communes à l'extrémité 5' de chaque ARNm (Spaan *et al.* 1990). Cette famille ne possédait qu'un genre, les coronavirus, jusqu'à ce que le genre torovirus soit récemment ajouté (Cavanagh et Horzinek 1993).

Plus de 14 virus ont été à ce jour identifiés comme appartenant au genre coronavirus, lequel est divisé en quatre groupes antigéniques selon l'analyse

sérologique de ces virus (Tableau 1, Holmes 1990; Spaan *et al.* 1990). Les virus appartenant au groupe antigénique 1 sont le TGEV, la souche 229E du coronavirus humain (HCV), le virus de la péritonite infectieuse féline (FIPV), le coronavirus entérique félin (FECV), le coronavirus canin (CCV), et le coronavirus respiratoire du porc (PRCV, Callebaut *et al.* 1988). Le groupe II comprend le MHV, la souche OC43 du coronavirus humain, le coronavirus bovin (BCV), le coronavirus du rat (RCV), le coronavirus du lapin (RbCV), et le virus de l'encéphalomyélite hémagglutinante du porc (HEV). Finalement, le virus IBV et le coronavirus de la dinde (TCV) sont les uniques membres des groupes antigéniques III et IV, respectivement. D'autres virus demeurent non-classifiés, tel le coronavirus humain entérique (HECV). Cette taxonomie fut en majeure partie confirmée par l'analyse nucléotidique (hybridation, séquençage) des génomes de ces virus. Cependant, deux études suggèrent l'appartenance des souches HECV et TCV au groupe antigénique II (Gerna *et al.* 1985; Dea *et al.* 1990).

## 2. COMPOSITION ET STRUCTURE DU VIRUS

### 2.1 Morphologie

Les coronavirus sont des particules sphériques et pléomorphes, d'un diamètre variant de 80 à 160 nm, pourvus d'une enveloppe présentant à sa surface des péplomères donnant au virus l'aspect caractéristique d'une couronne (Figure 1). La longueur moyenne de ces péplomères est de 20 nm (Siddell *et al.* 1983). Quelques coronavirus hémagglutinants, dont le TCV (Dea et Tijssen 1988), le BCV (King *et al.* 1985) et le virus de la diarrhée infantile de la souris (DVIM; Sugiyama *et al.* 1986), possèdent une seconde rangée de

## TABLEAU I

### Pathogénie des coronavirus

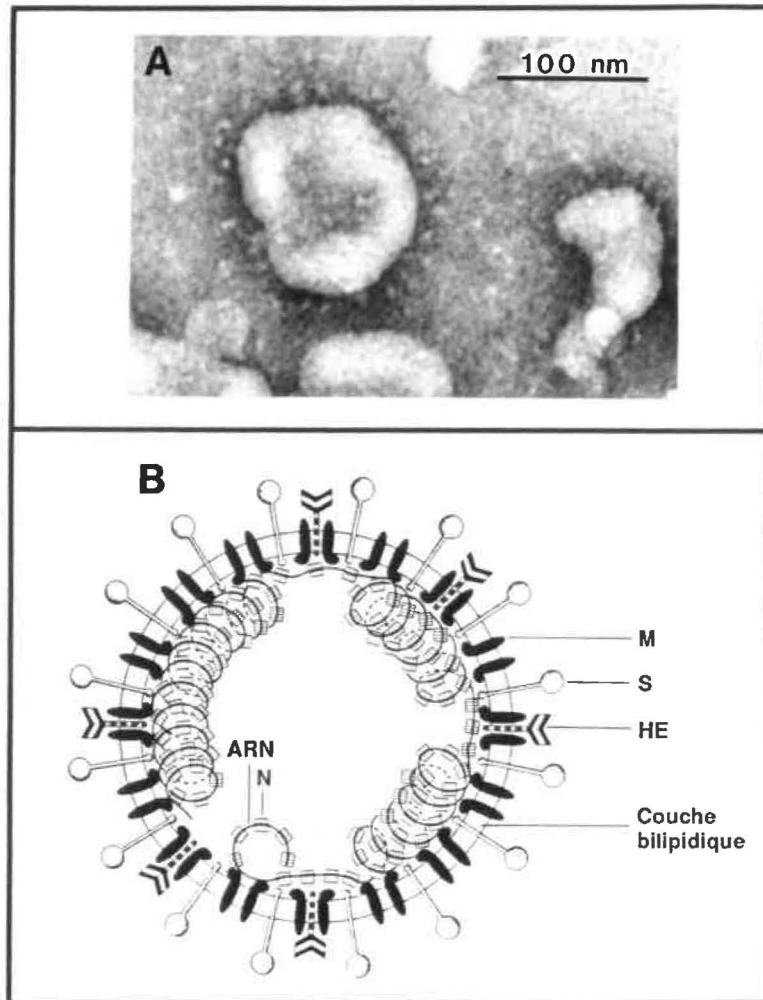
Systeme infecté	Hôte	Symptômes	Virus	Groupe antigénique	Abbréviation
Entérique	Homme	diarrhée	coronavirus entérique humain	II <sup>1</sup>	HECV
	Chien	diarrhée	coronavirus canin	I	CCV
	Chat	diarrhée	coronavirus entérique félin	I	FECV
	Boeuf	diarrhée	coronavirus bovin	II	BCV
	Porc	diarrhée	gastroentérite transmissible	I	TGEV
	Souris	diarrhée hépatite encéphalite	hépatite murine	II	MHV
	Dinde	diarrhée	coronavirus entérique de la dinde	II <sup>2</sup>	TCV
Respiratoire	Homme	rhume	coronavirus humain		HCV
			OC43 229E	II I	
	Rat	pneumonie	coronavirus du rat	II	RCV
	Poulet	bronchite	bronchite infectieuse	III	IBV
Nerveux	Porc	encéphalo-myélite	encéphalite hémagglutinante	II	HEV
Immunitaire	Chat	granulome polysérosite	péritonite infectieuse	I	FIPV

<sup>1</sup>Classification suggérée par Gerna *et al.* 1985

<sup>2</sup>Classification suggérée par Dea *et al.* 1990

**Figure 1: Structure du coronavirus. (A) Observation en microscopie électronique du coronavirus humain 229E après coloration négative. (B) Modèle structural des coronavirus. (D'après Talbot et Jouvenne 1992).**

# CORONAVIRUS



projections de surface plus courtes (Holmes 1990). Une nucléocapside de symétrie hélicoïdale d'un diamètre variant de 6 à 8 nm réside à l'intérieur de l'enveloppe (Lai 1990). L'acquisition de données sur la morphologie et la structure du virus a permis d'établir le modèle présenté à la Figure 1, auquel les sections suivantes feront référence.

## 2.2 Protéines structurales

Trois à quatre protéines structurales ont été identifiées chez le coronavirus (Holmes 1990; Spaan *et al.* 1990). La nucléoprotéine N, d'une masse moléculaire variant entre 50 et 60 kilodaltons (kDa), est associée au génome viral pour former la nucléocapside. La glycoprotéine membranaire M (20 à 30 kDa), comme son nom l'indique, réside presque entièrement dans l'enveloppe virale. Seule la portion amino-terminale de la protéine, portant les chaînes d'oligosaccharides, est exposée à la surface du virion. La glycoprotéine de surface S (180 à 200 kDa) forme les péplomères caractéristiques des coronavirus. Chez la plupart des coronavirus, dont le MHV (Sturman *et al.* 1985), la protéine S est clivée en deux polypeptides de masses moléculaires comparables, soit S1 (portion amino-terminale) et S2 (portion carboxy-terminale). Finalement, la seconde frange de projections de surface retrouvée chez certains coronavirus serait formée par la glycoprotéine HE (65 kDa), qui est présente sous forme de dimères de 130 à 140 kDa sur le virion (Lai 1990). Très récemment, une cinquième protéine structurale, nommée sM ("small membrane"), de masse moléculaire variant entre 10 et 12.4 kDa a été identifiée chez les virus IBV et TGEV (Liu et Inglis 1991; Godet *et al.* 1992).

### 2.3 Génome

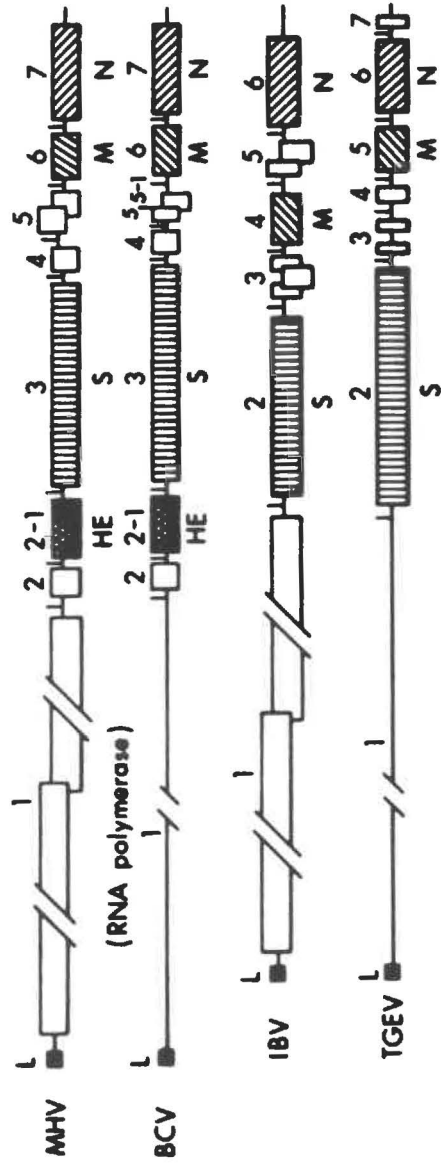
Le génome du coronavirus est un ARN monocaténaire, non-segmenté d'une masse moléculaire comprise entre 6 000 et 8 000 kDa. Il est de polarité positive, i.e. infectieux et directement traduit pour la synthèse de protéines virales (Lai 1990). Cet ARN possède une coiffe méthylée à son extrémité 5' et une queue polyadénylée à l'extrémité 3' (Lai et Stohlman 1981). La séquence complète du génome du MHV a été récemment déterminée (Lee *et al.* 1991) et révéla que cet ARN de 31 kilobases (kb) constitue le plus grand ARN viral connu. L'organisation des portions codantes du génome des coronavirus est représentée à la Figure 2. On y retrouve jusqu'à dix cadres de lecture ouverts, transcrits sur sept à neuf ARNm. Bien qu'il n'y ait qu'un cadre de lecture potentiel sur la plupart des ARNm, certains en possèdent deux ou trois. La localisation sur le génome des gènes des protéines non-structurales diffère entre les coronavirus. Cependant, un ordre génomique commun, 5'-Polymérase-(HE)-S-M-N-3', est présent chez tous les coronavirus. De plus, une séquence de 60 à 70 nucléotides, appelée séquence de tête ("leader sequence"), est présente à l'extrémité 5' du génome de chaque coronavirus.

### 2.4 Lipides

La composition en lipides et la structure de l'enveloppe du coronavirus reflète celle de la membrane de laquelle il bourgeonne (Pike et Garwes 1977). On peut donc y retrouver dans différentes proportions des phospholipides, glycolipides, cholestérol, di- et triglycérides et acides gras. Il semble cependant que les esters de cholestérol et d'acides gras soient sélectivement omis de l'enveloppe virale.



**Figure 2:** Organisation génomique des coronavirus. Chacun des cadres de lecture potentiels jusqu'à maintenant identifiés est indiqué par une boîte. Les lettres majuscules en dessous indiquent les gènes des protéines structurales tandis que les chiffres au-dessus désignent les ARNm transcrits pour chaque gène. Le caractère "L" indique la séquence de tête présente à l'extrémité 5' du génome des coronavirus. (D'après Lai 1990).



## 2.5 Données physico-chimiques

De par leur composition, les coronavirus sont sensibles aux solvants des lipides, tel l'éther et le chloroforme, de même qu'aux détergents (McIntosh 1974). Ils sont généralement plus stables en milieu acide qu'en milieu alcalin, leur pH optimum étant environ de 6,0 (Daniel et Talbot 1987; Lamarre et Talbot 1989). L'aggrégation de la glycoprotéine S serait responsable de l'instabilité du virus aux pH supérieurs à 8,0 (Sturman *et al.* 1990). Les coronavirus sont également sensibles à la chaleur. Le MHV, entre autres, est inactivé en moins de 30 minutes à 56°C. Il est toutefois protégé de cette inactivation par les ions magnésiums (Daniel et Talbot 1987). Finalement, les coronavirus murins peuvent être décongelés et recongelés jusqu'à 15 fois sans diminution du titre viral (Daniel et Talbot 1987).

## 3. RÉPLICATION

### 3.1 Attachement et pénétration

Les premières étapes de l'infection cellulaire par le coronavirus ont été peu étudiées. La reconnaissance du récepteur cellulaire est médiée par la glycoprotéine S chez les coronavirus ne possédant pas la glycoprotéine HE (Collins *et al.* 1982; Cavanagh et Davis 1986). Les récepteurs cellulaires du coronavirus humain HCV-229E, du TGEV et du MHV ont récemment été identifiés. Le récepteur des virus HCV-229E et TGEV serait l'aminopeptidase N, une enzyme présente au niveau de la membrane des cellules épithéliales des systèmes respiratoire et gastro-intestinal (Delmas *et al.* 1992; Yeager *et al.* 1992). Cette enzyme serait également présente au niveau des synapses neuronales, et

elle est identique au CD13, un antigène présent sur plusieurs cellules myéloïdes. Le récepteur du coronavirus murin est une glycoprotéine (110-120 kDa) présente à la surface de la membrane des macrophages, des épithéliums intestinaux et des hépatocytes (Boyle *et al.* 1987), et ferait partie de la famille des antigènes carcino-embryonnaires (Williams *et al.* 1991). Quant aux coronavirus possédant la glycoprotéine HE, leur attachement aux cellules cibles pourrait être médié par cette dernière ou par la glycoprotéine S. Il fut d'ailleurs démontré que la glycoprotéine HE des coronavirus BCoV et HCoV-OC43 se lie à l'acide acétyl-neuraminique à la surface d'érythrocytes et que l'activité neuraminidase de la protéine permet aux virions d'être libérés des cellules (Vlasak *et al.* 1988b). Des travaux récents démontrent toutefois que la glycoprotéine S serait une meilleure hémagglutinine que la protéine HE chez les coronavirus possédant les deux glycoprotéines (Schultze *et al.* 1991a). Pour ces virus, la reconnaissance du récepteur cellulaire contenant l'acide acétylneuraminique serait médiée par la glycoprotéine S et l'activité estérase de la HE permettrait de contrôler l'adsorption du virus aux récepteurs, fonctions similaires à celles des glycoprotéines HE et NA du virus influenza A (Schultze *et al.* 1991a). La diminution de l'infectivité virale après traitement au diisopropyl fluorophosphate, un inhibiteur d'estérase, suggère que cette activité enzymatique aurait un rôle biologique important (Vlasak *et al.* 1988a).

Deux mécanismes de pénétration des virus enveloppés dans la cellule cible ont été démontrés, soit la fusion directe à la membrane cellulaire ou l'endocytose du virion et fusion à l'intérieur d'une vésicule (White 1990). Le premier mécanisme est généralement indépendant du pH du milieu environnant, tandis que le second nécessite pour plusieurs virus une

acidification de la vésicule et un changement conformationnel de la protéine impliquée dans la pénétration. Les travaux de Kooi *et al.* (1991) démontrent que le MHV pénètre préférentiellement la cellule cible par fusion à la membrane plasmique, bien que les deux mécanismes soient utilisés. La glycoprotéine S possède l'activité biologique permettant la fusion de l'enveloppe virale à celle de la cellule cible. La pénétration par endocytose a également été démontrée pour le MHV (Krystyniak et Dupuy 1981). Plus récemment, des variants du MHV incapables de fusionner à la membrane plasmique, infectant la cellule par endocytose et fusion dans des vésicules acides, ont été isolés et caractérisés (Gallagher *et al.* 1991). Des mutations ponctuelles dans la portion S2 de la glycoprotéine S suggèrent l'importance de cette région dans l'activité fusiogénique de la protéine.

### 3.2 Transcription

Après pénétration, la nucléocapside est libérée dans le cytoplasme où s'effectue la réplication du virus (Lai 1990). La réplication du coronavirus est fortement dépendante du métabolisme cellulaire. Il a d'ailleurs été démontré que le titre du MHV-A59 pouvait être augmenté de 6 à 12 fois lorsque les cellules sont infectées en phase de synthèse (Talbot et Daniel 1987). La première étape du cycle de réplication est la synthèse d'une polymérase d'ARN dépendante de l'ARN nécessaire à la transcription du brin négatif du génome. Cette polymérase serait encodée par le gène 1, dont la séquence complète fut déterminée pour les virus IBV et MHV (Bournsnell *et al.* 1987; Lee *et al.* 1991). Ce gène serait traduit en un polypeptide de masse moléculaire supérieure à 800 kDa, pour être ensuite clivé enzymatiquement en plusieurs polypeptides ayant chacun une activité propre. La traduction *in vitro* de l'ARN génomique a mis

en évidence un polypeptide de 250 kDa, qui est ensuite clivé en deux protéines de 28 (p28) et 220 kDa (Denison et Perlman 1986). La protéine de 28 kDa a également été détectée dans les cellules infectées (Denison et Perlman 1987). L'étude de mutants viraux et de leurs groupes de complémentation a permis de définir et de localiser au moins quatre activités enzymatiques nécessaires à la réplication, soit la synthèse de la séquence de tête, de l'ARN génomique, d'ARN négatifs, et d'ARN messagers (Baric *et al.* 1990). Ces différentes activités enzymatiques sont dictées par le mode de réplication complexe des coronavirus.

Le brin négatif du génome est utilisé pour la transcription d'ARNm sous-génomiques, dont le nombre varie entre six à huit selon le coronavirus étudié. Ces ARNm sous-génomiques sont co-terminaux en 3', i.e. que la séquence nucléotidique de chaque ARN est incluse dans celui qui le précède. Pour le coronavirus murin, la séquence de l'ARNm 7, codant pour la nucléoprotéine, est incluse dans celle de l'ARNm 6, qui est elle-même incluse dans celle de l'ARNm 5, et ainsi de suite jusqu'à l'ARNm 1, équivalent à l'ARN génomique. A l'exception du plus petit ARN, ces ARNm sont donc tous potentiellement polycistroniques. Toutefois, seule la portion unique de chaque ARNm est traduite. Il a cependant été démontré que l'ARNm 3 du IBV (Liu *et al.* 1991) et l'ARNm 5 du MHV (Leibowitz *et al.* 1988) possèdent plus d'un cadre de lecture potentiel dans leur portion unique et sont fonctionnellement polycistroniques. De plus, ces ARNm contiennent tous à leur extrémité 5' une séquence de tête identique à celle retrouvée dans le génome viral (Lai *et al.* 1983).

Le mode de synthèse des ARNm sous-génomiques est particulier aux coronavirus et plusieurs modèles ont tenté d'en expliquer le mécanisme. Le

modèle généralement accepté est celui de la transcription initiée par amorce d'ARN ("leader RNA-primed transcription") décrit par Lai (1986). D'après ce modèle, il y aurait d'abord transcription des séquences de têtes à l'extrémité 3' du gabarit d'ARN négatif. Le complexe séquence de tête-polymérase se dissocierait du gabarit pour se réassocier aux séquences intergéniques, en amont de chaque gène, et compléter la synthèse de l'ARNm correspondant. Une homologie de 7 à 18 nucléotides fut d'ailleurs déterminée entre la portion 3' des séquences de tête et ces séquences intergéniques, présentes en amont de tous les gènes pour lesquels un ARNm a été identifié. Ce modèle est appuyé par plusieurs observations expérimentales; (1) des fragments d'ARN de 50 à 90 nucléotides, similaires à la séquence de tête, ont été détectés sous forme libre dans le cytoplasme de cellules infectées par le MHV (Baric *et al.* 1985); (2) Baric *et al.* (1985) ont isolé des variants viraux thermosensibles pouvant synthétiser ces fragments d'ARN, mais incapables de synthétiser d'ARNm, démontrant ainsi que ces deux processus étaient discontinus et nécessitaient des enzymes ou fonctions virales différentes; (3) ces amorces d'ARN peuvent être interchangeables entre deux coronavirus lors d'infections mixtes (Makino *et al.* 1986); (4) ces amorces d'ARN peuvent initier la synthèse d'ARNm *in vitro*, et une enzyme du coronavirus possède l'activité de correction ("proofreading") permettant de reconnaître et de corriger les erreurs d'appariement entre l'amorce et la séquence intergénique (Baker et Lai 1990).

Ce modèle de transcription fut récemment mis en doute par Sawicki et Sawicki (1990) en démontrant que l'intermédiaire de répllication génomique ne pouvait produire chacune des formes répllicatives sous-génomiques. Ce résultat ne peut être expliqué par le modèle proposant la dissociation et la réassociation

du complexe séquence de tête-polymérase aux séquences intergéniques. Le modèle proposé par Sawicki et Sawicki implique plutôt la synthèse d'ARN sous-génomiques négatifs par arrêt prématuré de la transcription aux régions intergéniques. Le complexe séquence de tête-polymérase se fixerait aux séquences intergéniques terminales des ARN sous-génomiques négatifs et permettrait ainsi la synthèse d'ARNm. Les ARNm sous-génomiques et l'ARN génomique possèdent des séquences identiques à leurs extrémités 5' et 3'. Conséquemment, il fut postulé que les ARN sous-génomiques peuvent se répliquer indépendamment du génome viral. L'existence de ces formes répliquatives sous-génomiques a été démontré chez le MHV (Sawicki et Sawicki 1990), le TGEV (Sethna *et al.* 1989) et le BCV (Hofmann *et al.* 1990). Ces derniers auteurs rapportent que des ARNm sous-génomiques sont encapsidés avec le génome viral. Ces ARNm peuvent se répliquer et rapidement amplifier la quantité de gabarits disponibles pour la synthèse de protéines virales. Une compétition entre les formes répliquatives sous-génomiques et génomiques contribuerait d'ailleurs à l'établissement de la persistance (Hofmann *et al.* 1990).

La répllication du génome viral s'effectuerait vers la fin du cycle d'infection (Lai 1990). L'accumulation des protéines structurales, en particulier la nucléoprotéine, permettrait de réorienter la synthèse des ARNm vers celle du génome. A la fin du cycle de répllication du virus, la majeure partie (95%) de l'ARN génomique est associé aux nucléoprotéines, l'autre partie étant associé aux polysomes. La possibilité d'interchanger la séquence de tête de différents virus lors de co-infection et l'hétérogénéité de ces séquences dans une même population virale suggèrent que la répllication de l'ARN génomique serait également discontinue (Lai 1990).



### 3.3 Synthèses protéiques

La synthèse de la nucléoprotéine et des protéines non-structurales, dont la plupart des fonctions reste indéterminée, s'effectue par l'intermédiaire de polysomes cytoplasmiques, tandis que celle des glycoprotéines M, S et HE s'effectue au niveau du réticulum endoplasmique rugueux (RER) (Holmes 1990). La synthèse des glycoprotéines S et HE est similaire à celle des glycoprotéines d'autres virus enveloppés tels les paramyxovirus ou orthomyxovirus. Parallèlement à leur synthèse, ces deux glycoprotéines sont insérées dans la membrane du RER, et glycosylées. Pour la glycoprotéine S, la glycosylation, de type *N*-liée, est d'abord formée de chaînes d'oligosaccharides riches en mannose. Au cours de sa migration dans l'appareil de Golgi, ses chaînes d'oligosaccharides sont modifiées pour y incorporer des molécules de galactose, fructose et glucosamine (Siddell *et al.* 1982). Des acides palmitiques stabilisant l'ancrage de la protéine dans la membrane sont également ajoutés à la protéine lors de son passage dans l'appareil de Golgi. Quant à la glycoprotéine HE, son passage au niveau de l'appareil de Golgi n'entraînerait non pas un ajout d'oligosaccharides, mais au contraire un clivage de certains sucres réduisant légèrement la masse moléculaire de la protéine (Yokomori *et al.* 1989). La présence de la glycoprotéine S à la surface de la membrane cytoplasmique est responsable de la fusion des cellules infectées (Vennema *et al.* 1990). La synthèse de la glycoprotéine M diffère des précédentes en plusieurs points. Tout d'abord, son insertion dans la membrane n'est pas co-translationnelle, mais s'effectue après que la protéine soit synthétisée (Holmes 1990). De plus, la glycosylation de la protéine varie entre coronavirus. Elle est de type *N*-liée pour les virus IBV, TGEV, TCV (Dea *et al.* 1989) et HCV-229E (Arpin

1988), tandis qu'elle est de type O-liée pour les virus MHV, BCV et HCV-OC43 (Mounir et Talbot 1992). Cette glycosylation O-liée est effectuée lors de la migration de la protéine dans l'appareil de Golgi. Finalement, la glycoprotéine M s'accumule dans l'appareil de Golgi et n'est pas exprimée à la surface des cellules infectées.

### **3.4 Assemblage et bourgeonnement des virions**

L'assemblage des virions s'effectue à la surface cytoplasmique des membranes entre le RER et l'appareil de Golgi (Holmes 1990). Les nucléocapsides sont formées par l'interaction du génome d'ARN avec des nucléoprotéines. Il y a alors arrangement des nucléocapsides du côté cytoplasmique des membranes de manière à ce qu'elles soient incorporées dans le virion lors du bourgeonnement. Cet arrangement serait médié par des interactions avec la glycoprotéine M, dont l'accumulation au niveau de l'appareil de Golgi déterminerait le site de bourgeonnement des virions. Lors de la formation des virions, les protéines cellulaires seraient exclues, et remplacées par les glycoprotéines virales. Les virions bourgeonnent au niveau de l'appareil de Golgi et sont évacués de la cellule par des vésicules de sécrétion.

### **3.5 Recombinaison génétique et variants**

Les mécanismes de transcription et de réplication de l'ARN génomique du coronavirus seraient responsables des fréquences élevées de recombinaison (Baric *et al.* 1990). Cette fréquence, d'environ 25 %, est de l'ordre de celle retrouvée pour les virus à ARN segmenté tels le virus influenza ou les réovirus. La recombinaison entre différents coronavirus murins lors de co-infection fut démontrée *in vitro* (Makino *et al.* 1987) et *in vivo* (Keck *et al.*

1988). Le gène codant pour la protéine HE, présent chez certains coronavirus, aurait été acquis suite à une recombinaison non-homologue avec le virus influenza de type C (Luytjes *et al.* 1988), préservant la structure fonctionnelle de la protéine. Ce gène est d'ailleurs présent dans le génome du MHV-A59. L'absence de séquence intergénique en amont du gène de la HE expliquerait l'absence d'ARNm et de protéines correspondantes (Luytjes *et al.* 1988). La recombinaison de différentes portions d'une même molécule d'ARN génomique serait également responsable de la formation de particules défectives-interférentes (Makino *et al.* 1988; Lai 1990).

#### 4. PATHOGÉNICITÉ

Le tropisme diversifié des coronavirus constitue l'une des caractéristiques les plus intéressantes de ces virus. Ils peuvent en effet causer des infections au niveau du système respiratoire, gastro-intestinal et nerveux (Tableau 1). Leur transmission se fait par aérosols ou par la voie fécale-orale. Par voie naturelle, les coronavirus sont responsables de maladies que chez l'espèce d'origine. Cependant, par voie intracérébrale, plusieurs coronavirus tels le HCV-OC43, le BCV et l'IBV peuvent causer une encéphalite chez la souris (Wege *et al.* 1982). Chez leur hôte d'origine, certains virus très reliés des points de vue génomique et antigénique, tels le BCV et le HCV-OC43 (Mounir et Talbot 1992, 1993b), ou le TGEV et le PRCV (Callebaut *et al.* 1988), présentent des tropismes très distincts. Les seules différences trouvées jusqu'à maintenant entre le génome du PRCV, comparé à celui du TGEV, consistent en une délétion de 672 nucléotides à l'extrémité 5' du gène codant pour la glycoprotéine S et l'absence du gène codant potentiellement pour la protéine non-structurale 3a (Rasschaert *et al.* 1990). Des différences au niveau des protéines non-structurales entre les virus

BCV et HCV-OC43 pourraient également expliquer leur tropisme dissemblable (Mounir et Talbot 1993a). Le tropisme peut varier entre différentes souches d'un même virus. Chez la souris, la souche JHM est principalement responsable d'encéphalomyélite tandis que la souche DVIM cause une entérite (Wege *et al.* 1982). Un autre exemple intéressant est celui du FIPV et du FECV, qui ne peuvent être distingués antigéniquement. Alors que le FECV ne cause qu'une entérite, le FIPV peut quitter le système digestif de l'hôte, infecter le système réticuloendothélial et causer une péritonite aiguë (Pedersen 1987). De plus, la maladie est amplifiée par un processus immunopathologique impliquant la réponse humorale contre la protéine de surface du virion (Spaan *et al.* 1989).

Les coronavirus sont capables d'infections chroniques et persistantes *in vitro* et *in vivo*. Des infections chroniques par le FIPV, l'IBV et le MHV ont été décrites (Siddell *et al.* 1983). Nous reviendrons sur l'infection causée par le MHV dans la section suivante. L'infection persistante de cultures cellulaires infectées par le coronavirus, dont le BCV, le MHV et le HCV-229E, ont également été décrites (Chaloner-Larsson et Johnson-Lussenberg 1981; Lamontagne et Dupuy 1984; Hoffman *et al.* 1990; Gallagher *et al.* 1991). Les mécanismes permettant l'établissement d'infections persistantes demeurent toutefois inconnus.

Au niveau cellulaire, la résistance ou la permissivité à l'infection pourraient être contrôlées à plusieurs étapes, soient l'attachement du virus, la pénétration, la décapsidation et la transcription de l'ARN. Pour le MHV, l'absence du récepteur fonctionnel chez la souris SJL expliquerait la résistance de ces souris à l'infection virale (Boyle *et al.* 1987). De plus, la permissivité à

l'infection par le MHV peut être conférée à des cellules résistantes par transfection de clones d'ADN exprimant ce récepteur (Dveksler *et al.* 1991). La pénétration du virion peut également être bloquée par la cellule cible. Par exemple, le MHV peut s'attacher efficacement aux cellules Vero et C-6, mais est incapable de les infecter de façon productive (Kooi *et al.* 1988, 1991). L'utilisation d'un agent fusiogène, le polyéthylène glycol, rend alors ces cellules sensibles à l'infection, ce qui suggère l'incapacité du virus à se fusionner à la membrane cellulaire. Finalement, des facteurs génétiques peuvent contribuer à la résistance. Toujours pour le MHV, un gène autosomal récessif, localisé sur le chromosome 7, serait relié à la résistance (Smith *et al.* 1984).

#### 4.1 Pathogénicité du virus de l'hépatite murine

Comme son nom l'indique, la majorité des souches de MHV peuvent causer une hépatite. Par voie naturelle, les souches A59 et JHM du MHV peuvent également infecter le système nerveux central (SNC) et causer différents types de pathologies dépendamment de l'hôte et de la souche utilisée (ter Meulen *et al.* 1989). Le MHV-JHM est la souche possédant le plus grand neurotropisme. Elle infecte d'abord les souris au niveau de leurs muqueuses nasales. Le virus rejoint le SNC via le nerf olfactif, pour ensuite infecter la moelle épinière. L'encéphalite observée est caractérisée par des lésions nécrotiques au niveau de l'hippocampe, des lobes olfactifs et du tissu épendymal. Au niveau cellulaire, les cellules neuronales, gliales, endothéliales et épendymales peuvent toutes permettre la réplication du virus, indiquant la nature pantropique de l'infection. Les souris qui survivent à l'infection aiguë développent une infection chronique caractérisée par des foyers de démyélinisation ou de remyélinisation au niveau du SNC et de la moelle

épineière, impliquant surtout les oligodendrocytes. Le mécanisme responsable de cette pathologie n'est toutefois pas encore élucidé. Plusieurs études ont montré que le virus pouvait se répliquer dans les oligodendrocytes (Lampert *et al.* 1973; Weiner *et al.* 1973; Fleury *et al.* 1980), suggérant une lyse directe de ces cellules par effet cytopathique. Par contre, une immunosuppression des souris infectées préviendrait la maladie, qui pourrait être partiellement restaurée par transfert passif de lymphocytes naïfs (Wang *et al.* 1990). Ceci suggère que la démyélinisation serait le résultat d'une réaction immunopathologique. L'expression d'antigènes d'histocompatibilité de classes I et II sur des cellules gliales infectées par le MHV (Suzumura *et al.* 1986; Massa *et al.* 1986, 1987) renforce l'hypothèse selon laquelle le système immunitaire serait impliqué dans la pathogénie de ce virus. De plus, il a été rapporté que le transfert passif de lymphocytes de rats infectés par le MHV-JHM à des rats naïfs pouvait induire chez ces derniers une encéphalite allergique expérimentale (Watanabe *et al.* 1983). Ces lymphocytes transférés étaient sensibilisés à la protéine basique de la myéline. Kyuwa *et al.* (1991) ont également montré l'induction de lymphocytes T auto-immuns suite à l'infection de souris par le virus.

Par voie naturelle, la souche A59 est responsable d'hépatite chez la souris adulte (Wege *et al.* 1982). Par voie intracérébrale, elle peut causer chez plusieurs lignées de souris, dont la BALB/c (Koolen *et al.* 1987) et la C57BL/6 (Lavi *et al.* 1990), une encéphalite modérée et des plaques de démyélinisation. Le virus infecte également le foie et cause une hépatite sévère. Au niveau du SNC, l'infection est principalement confinée aux structures du système limbique de même qu'aux ganglions basaux (Lavi *et al.* 1990). Une infection chronique peut être observée chez les souris récupérant de la phase aiguë. Les lésions sont alors

restreintes à la matière blanche (Lavi *et al.* 1984), corroborant *in vivo* une étude démontrant *in vitro* un tropisme accentué du MHV-A59 pour les cellules non-neuronales (Dubois-Dalcq *et al.* 1982). La souche A59 présente quelques avantages pour l'établissement d'un modèle d'étude du neurotropisme du MHV, tels l'efficacité de sa production en culture cellulaire et la reproductibilité de la maladie produite *in vivo*.

#### 4.2 Immunité induite par le virus de l'hépatite murine

Plusieurs mécanismes de défense peuvent être induits lors d'une infection par le MHV. Au niveau de l'immunité humorale, la glycoprotéine S est la cible majeure des anticorps neutralisants et protecteurs (Collins *et al.* 1982; Buchmeier *et al.* 1984; Fleming *et al.* 1983; Wege *et al.* 1984). Toutefois, bien qu'elles ne puissent induire d'anticorps neutralisants chez le MHV, les glycoprotéines M et HE, et la nucléoprotéine N induisent des anticorps pouvant protéger de l'infection virale (Nakanaga *et al.* 1986; Lecomte *et al.* 1987; Fleming *et al.* 1989; Yokomori *et al.* 1992). Dans ces expériences de protection par transfert passif d'anticorps monoclonaux (AcMo), les souris ne sont cependant pas protégées de l'infection chronique. L'importance de l'immunité à médiation cellulaire a également été démontrée chez la souris. Le MHV stimule l'activité NK (natural killer), et la pathogénicité du virus est augmentée chez les souris dépourvues de cellules NK (Bukowski *et al.* 1983). Le MHV stimule également une activité cytotoxique, spécifique à la glycoprotéine S, dont la cellule effectrice possède un phénotype de lymphocyte B (Holmes *et al.* 1986; Welsh *et al.* 1986). L'induction par le MHV de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> a été mise en évidence par plusieurs groupes de recherches (Stohlman *et al.* 1986; Williamson et Stohlman 1990; Yamaguchi *et al.* 1991; Körner *et al.*



1991; Mobley *et al.* 1992). Cependant, ces résultats demeurent contradictoires sur le phénotype des lymphocytes permettant de réduire la réplication virale dans le SNC. De plus, ces études démontrent que les glycoprotéines S, M et N peuvent stimuler une réponse lymphocytaire spécifique (Körner *et al.* 1991; Mobley *et al.* 1992). Autre observation intéressante, la prolifération des lymphocytes suite à une stimulation par la glycoprotéine S est plus forte chez les souris en phase d'infection chronique qu'en phase aiguë.

### 4.3 Sclérose en plaques et coronavirus

La sclérose en plaques (SP) est une maladie caractérisée par la présence de plaques de démyélinisation au niveau du système nerveux. Elle serait la manifestation d'une réaction immunopathologique dont l'étiologie demeure jusqu'à maintenant inconnue (McFarlin et McFarland 1982). Plusieurs études supportent l'hypothèse d'une implication des coronavirus dans l'étiologie de la maladie. Des particules coronaviriformes ont été observés dans le cerveau d'un individu mort de SP (Tanaka *et al.* 1976). Des anticorps dirigés contre les coronavirus humains OC43 et 229E ont aussi été détectés dans le liquide céphalo-rachidien de patients atteints de SP (Salmi *et al.* 1982). De plus, deux coronavirus ont été isolés, suite à un passage chez la souris ou en culture de cellules murines, à partir du cerveau de deux individus atteints de SP (Burks *et al.* 1980). Ces deux isolats, dénommés SD et SK, sont antigéniquement reliés aux coronavirus HCV-OC43 et MHV-A59 (Gerdes *et al.* 1981). Au niveau génomique, les isolats SD et SK montrent une plus grande homologie avec le MHV-A59 qu'avec le HCV-OC43 et HCV-229E (Weiss 1983). Cette étude suggère que les souches SD et SK seraient d'origine endogène au système murin utilisé pour isoler ces virus. Par contre, la présence d'ARN homologues dans le



cerveau de patients atteints de SP a pu être démontrée par hybridation *in situ* utilisant des sondes d'ADN complémentaire (ADNc) préparées à partir de l'ARN génomique des coronavirus SD et MHV-A59 (Murray *et al.* 1992a). De plus, l'ARN du coronavirus a été détecté de façon significative dans une plus grande proportion d'échantillons de SP que dans les témoins. Récemment, Stewart *et al.* (1992) ont démontré par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) que l'ARN du coronavirus humain 229E pouvait également être présent dans le cerveau de patients morts de SP. Par ailleurs, les souches SD et MHV-A59 diffèrent au niveau de leur pathogénie chez la souris, toutes deux pouvant causer une démyélinisation, le virus SD ne produisant toutefois pas d'infection productive (Mendelman *et al.* 1983). Finalement, il a été démontré que les souches SD et MHV-JHM peuvent infecter le SNC de primates et y causer une démyélinisation (Murray *et al.* 1992b). A la lumière de ces résultats, il est suggéré que les souches SD et SK pourraient être des recombinants de coronavirus humains et murins.

## 5. FONCTIONS, STRUCTURE ET IMMUNOGÉNÉICITÉ DES PROTÉINES

### 5.1 La nucléoprotéine N

La nucléoprotéine permet l'encapsidation de l'ARN génomique, et l'incorporation de celui-ci dans le virion. L'interaction spécifique de la protéine N avec la séquence de tête (Stohlman *et al.* 1988), et l'inhibition quasi-totale de la réplication du génome viral par des anticorps dirigés contre la protéine N (Compton *et al.* 1987) suggèrent une participation de cette dernière dans la transcription. La protéine N est basique, ayant une charge positive au pH physiologique, et elle est phosphorylée (Spaan *et al.* 1990). Il a été mentionné

précédemment qu'elle pourrait être une cible de l'immunité humorale contre le virus. Des travaux récents démontrent qu'elle pourrait également être importante dans l'induction de l'immunité cellulaire contre les virus IBV et MHV (Boots *et al.* 1990; Körner *et al.* 1991).

## 5.2 La protéine de membrane M

La glycoprotéine M est essentielle à la structure et à la formation des virions (Spaan *et al.* 1990). L'accumulation de la protéine dans l'appareil de Golgi, qui détermine le site de bourgeonnement des virions, serait une propriété intrinsèque de celle-ci (Rottier et Rose 1987). L'analyse des séquences nucléotidiques de la protéine M de divers coronavirus et des travaux de protéolyse ont permis d'établir un modèle topologique de la protéine (Rottier *et al.* 1986). Près de 10 % de l'extrémité N-terminale de la protéine serait exposé à l'extérieur de l'enveloppe virale. La protéine possède trois domaines hydrophobes intégrés à l'enveloppe virale. Finalement, la portion C-terminale de la protéine M serait exposée du côté intérieur de la particule virale en étroite association avec l'enveloppe. Cette région de la protéine pourrait interagir avec la nucléocapside. Chez l'IBV, des protéines M mutantes ne possédant que le troisième domaine sont exportées à la surface de la membrane cellulaire, tandis que d'autres ayant seulement le premier domaine s'accumulent dans le cytoplasme (Machamer et Rose 1987). Ceci suggère que le premier domaine trans-membranaire porterait les signaux permettant l'accumulation de la protéine dans l'appareil de Golgi. Cependant, ces résultats ne purent être confirmés pour le MHV (Rottier *et al.* 1990). Une autre caractéristique structurale de la glycoprotéine M est l'absence, sauf chez le TGEV et le FIPV, d'un peptide signal N-terminal permettant la translocation de la protéine lors

de la synthèse (Jouvenne *et al.* 1990). L'intégration de cette protéine dans la membrane du RER serait médiée par des particules signal-dépendantes, ou "signal recognition particles" (Rottier *et al.* 1985). Les premier et troisième domaines contiendraient les séquences cibles de ces particules (Machamer et Rose 1987). Finalement, un autre point intéressant concerne la glycosylation de la protéine, qui varie selon le virus et la souche étudié, et la lignée cellulaire utilisée (Spaan *et al.* 1990). De plus, les coronavirus TCV et BCV possèdent une protéine M respectivement N- et O-glycosylée, bien qu'aucune différence n'ait été trouvée dans la séquence nucléotidique N-terminale de la protéine (Verbeek et Tijssen 1991).

La glycoprotéine M induit la production d'anticorps ne pouvant neutraliser l'infectivité du virus en absence de complément. Toutefois, des anticorps neutralisants en présence de complément furent obtenus (Fleming *et al.* 1989; Woods *et al.* 1987). Peu d'éléments sont connus sur la structure antigénique de la protéine. Par compétition entre AcMo, deux sites topographiquement distincts ont été localisés sur la protéine M du MHV (Talbot *et al.* 1984b) et du TGEV (Rasschaert *et al.* 1987). La glycoprotéine M stimule également la prolifération de lymphocytes de souris immunisées avec le MHV (Mobley *et al.* 1992). D'autre part, la glycoprotéine M du TGEV induit la production d'interféron  $\alpha$  *in vitro* et *in vivo* (Charley et Laude 1988). Le domaine de la protéine responsable de cette induction serait situé sur la portion N-terminale extramembranaire (Laude *et al.* 1992).

### 5.3 L'hémagglutinine-estérase HE

La glycoprotéine HE, présente chez les virus HCV-OC43, HEV, BCoV, TCoV et DVIM, possède une activité d'hémagglutination (Spaan *et al.* 1990; Dea *et al.* 1986). Une activité d'acétyl estérase associée à cette protéine a également été confirmée pour le BCoV et le HEV (Schultze *et al.* 1991b). La souche JHM du coronavirus murin possède cette protéine. Chez ce virus, la protéine HE montre une activité acétyl estérase mais est dépourvue d'activité d'hémagglutination (Yokomori *et al.* 1989). L'analyse de la structure primaire de la protéine, déduite de la séquence nucléotidique, indique qu'elle possède un peptide signal à son extrémité N-terminale et un domaine hydrophobe transmembranaire à l'extrémité C-terminale (Parker *et al.* 1989a). Sur le virion, cette protéine est présente sous forme de dimères de 130 à 140 kDa stabilisé par des ponts disulfures (King *et al.* 1985). L'induction d'anticorps neutralisants par la glycoprotéine HE fut démontrée chez le BCoV et le TCoV (Deregt et Babiuk 1987; Dea et Tijssen 1989) et au moins trois sites antigéniques distincts ont été localisés sur la protéine (Deregt et Babiuk 1987).

### 5.4 La glycoprotéine de surface S

Plusieurs fonctions biologiques essentielles à la réplication du virus sont médiées par la glycoprotéine S. Nous avons précédemment décrit son rôle dans l'attachement de la particule virale à la cellule cible, de même que dans la pénétration du virus dans la cellule. La glycoprotéine S, responsable de la fusion des cellules infectées, contribue par cette activité à la propagation de l'infection. De plus, l'activité d'hémagglutination des virus IBV et TGEV serait médiée par la glycoprotéine S (Mockett *et al.* 1984; Cavanagh et Davis 1986;

Noda *et al.* 1987). La glycoprotéine S serait également une meilleure hémagglutinine que la glycoprotéine HE chez les coronavirus ayant une grande activité d'hémagglutination, tel le BCV et le HEV (Schultz *et al.* 1991a). La séquence nucléotidique du gène de la glycoprotéine S a été déterminée pour de nombreux coronavirus, entres autres l'IBV (Binns *et al.* 1986), le TGEV (Rasschaert et Laude 1987), le BCV (Parker *et al.* 1990), les souches 229E (Raabe *et al.* 1990) et OC43 (Mounir et Talbot 1993b) du HCV, de même que pour les souches MHV-JHM (Schmidt *et al.* 1987), MHV-A59 (Luytjes *et al.* 1987) et MHV-4 (Parker *et al.* 1989b). L'analyse de la structure primaire de la protéine révèle qu'elle possède un peptide signal à l'extrémité N-terminale et un domaine trans-membranaire à l'extrémité C-terminale. De plus, on y retrouve de 21 à 35 sites potentiels de glycosylation N-liée. La majorité de ces sites seraient utilisés étant donné que cette protéine est fortement glycosylée, sa masse moléculaire passant de 145 (apoprotéine) à 180 kDa pour le MHV (Luytjes *et al.* 1987).

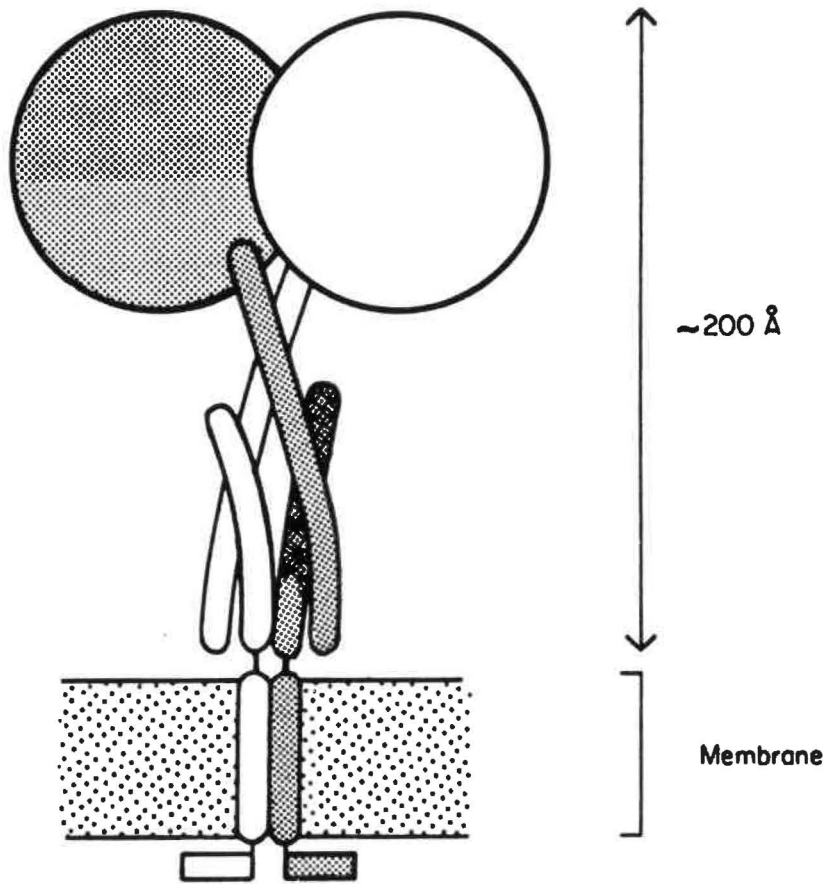
Chez certains coronavirus tels le MHV, le BCV et l'IBV, la glycoprotéine S est clivée par une protéase cellulaire pour former les glycopeptides S1 et S2, correspondant respectivement aux portions amino et carboxy-terminales de la protéine (Cavanagh *et al.* 1990). Le clivage de la protéine S, pour le MHV et le BCV, activerait l'activité fusiogénique de la protéine (Storz *et al.* 1981; Sturman *et al.* 1985), bien qu'il ait été récemment démontré que le clivage de la glycoprotéine S du MHV n'était pas pré-requis pour la fusion (Stauber *et al.* 1993; Taguchi 1993). Dans ce sens, il est à noter que le degré de clivage de la protéine S dépend du virus et de la cellule hôte (Frana *et al.* 1985; Sturman *et al.* 1985). De plus, un variant du MHV-A59 ayant conservé l'activité de fusion

possède une glycoprotéine S non-clivée (Sawicki 1987). D'autre part, le clivage de la protéine S n'est pas nécessaire à l'activité de fusion puisque chez les virus TGEV et FIPV, la protéine n'est pas clivée, bien que ces virus puissent induire la fusion cellulaire (de Groot *et al.* 1987b; Rasschaert et Laude 1987). Finalement, le clivage de la protéine S ne produit pas d'extrémités N-terminales hydrophobes, contrairement à ce que l'on retrouve après le clivage des protéines de fusion des paramyxovirus et des orthomyxovirus (Scheid et Choppin 1977; Klenk et Rott 1981). De plus, contrairement aux paramyxovirus et orthomyxovirus, les glycopeptides S1 et S2 des coronavirus ne sont pas reliés par des liens disulfures ou d'autres liens covalents. L'importance du clivage de la glycoprotéine S et les mécanismes responsables de la fusion induite par celle-ci demeurent donc indéterminés.

Les péplomères du coronavirus seraient formés de deux ou trois molécules des glycoprotéines S ou S1/S2 (Cavanagh 1983; Delmas et Laude 1990). La portion S1 de la protéine formerait le bulbe du péplomère tandis que la tige serait formée par la portion S2. On a identifié chez cette dernière la présence d'heptapeptides répétitifs suggérant une structure secondaire en hélice  $\alpha$  pour cette portion de la protéine (de Groot *et al.* 1987a). Le super-enroulement interchaînes de ces hélices  $\alpha$  permettrait de stabiliser la structure du péplomère, dont un modèle est présenté à la Figure 3.

La contribution de la glycoprotéine S dans l'induction de l'immunité humorale contre le coronavirus est abondamment décrite dans la littérature (Spaan *et al.* 1990). L'importance de la protéine S comme cible de l'immunité à médiation cellulaire est par contre moins documentée. Les quelques publications traitant de cet aspect ont été rapportées précédemment. Au niveau

**Figure 3:** Modèle structural des péplomères du coronavirus. Le péplomère est composé dans ce schéma d'un dimère de glycoprotéines S. Les hélices  $\alpha$  présentent dans la portion transmembranaire de la protéine et près de la membrane dans la portion externe de S2 permettraient de stabiliser la structure du péplomère. (D'après de Groot *et al.* 1987).





moléculaire, plusieurs études ont récemment traité de la localisation sur la structure primaire de la protéine S de sites antigéniques reconnus par des anticorps monoclonaux. Pour le virus IBV, les principaux sites antigéniques associés à la neutralisation sont localisés sur la portion S1 de la glycoprotéine S. Des anticorps neutralisants ne peuvent être induits chez la volaille inoculée avec le virus IBV dépourvu de protéine S1 (Cavanagh *et al.* 1986). Par ELISA de compétition, trois sites associés à la neutralisation ont été localisés sur le glycopeptide S1 du IBV tandis qu'un seul a été localisé sur le glycopeptide S2 (Koch *et al.* 1990). Les sites localisés sur la protéine S1 sont discontinus tandis que celui situé sur la protéine S2 est continu. L'utilisation des termes continu et discontinu réfèrent à la sensibilité de l'épitope à la dénaturation. On considère généralement que les épitopes continus (ou linéaires) sont formés d'acides aminés contigus sur la séquence primaire de la protéine tandis que les épitopes discontinus sont formés d'acides aminés rapprochés par la structure secondaire ou tertiaire de la protéine (van Regenmortel 1989). L'utilisation de fragments de protéine S exprimés dans un vecteur procaryotique a permis de localiser un site immunodominant à l'extrémité N-terminale de la sous-unité S2 (Lenstra *et al.* 1989; Kusters *et al.* 1989). L'immunodominance correspond à la propension d'un antigène ou d'une région d'un antigène à être la principale cible d'une réponse immunitaire. Cette caractéristique intrinsèque est donc dépendante du répertoire génétique de l'hôte (Hopp 1986).

Plusieurs sites ont également été localisés sur la protéine S du TGEV. Au total, cinq sites topographiquement distincts ont été identifiés (Delmas *et al.* 1986; Correa *et al.* 1988). Tous les sites associés à la neutralisation présentement identifiés, à l'exception d'un seul, sont discontinus et situés sur la moitié N-

terminale de la protéine, équivalent à la portion S1 chez les coronavirus dont la protéine S est clivée (Correa *et al.* 1990; Delmas *et al.* 1990; Gebauer *et al.* 1991). Le seul site neutralisant linéaire identifié chez le TGEV comprend les acides aminés 378 à 390 (Posthumus *et al.* 1990). Cette région de la protéine formerait un site discontinu dont l'autre portion comprendrait les acides aminés 1173 à 1184, situés dans la moitié C-terminale de la protéine. Chez le BCV, deux sites antigéniques associés à la neutralisation ont été identifiés (Deregt et Babiuk 1987). Deux domaines sur le glycopeptide S1 seraient essentiels à la formation des deux sites antigéniques neutralisants (Yoo *et al.* 1991b). Les auteurs de cette étude rapportent également que les déterminants responsables de la fusion cellulaire seraient situés sur la protéine S2 (Yoo *et al.* 1991a).

De cinq à six sites antigéniques ont été identifiés sur la glycoprotéine S du MHV-JHM (Talbot *et al.* 1984b; Talbot et Buchmeier 1985; Wege *et al.* 1984). De ces sites, deux ou trois sont associés à la neutralisation. De plus, certains des AcMo neutralisants peuvent protéger passivement des souris lors d'une épreuve avec une dose létale de virus et inhiber la fusion de cellules infectées (Collins *et al.* 1982; Buchmeier *et al.* 1984; Wege *et al.* 1984). Chez le MHV-A59, seulement deux sites distincts ont été identifiés (Gilmore *et al.* 1987). Les sites de neutralisation et d'inhibition de fusion sont associés à un seul de ces sites. L'étude de la liaison d'AcMo aux sous-unités S1 et S2, séparés par chromatographie, a permis de démontrer que des sites neutralisants et importants pour la fusion étaient situés sur chacune d'elles (Weismiller *et al.* 1990). Takase-Yoden *et al.* (1991) concluent, à partir d'expériences utilisant un vecteur baculovirus pour exprimer la portion S1, que les principaux sites de neutralisation sont situés sur cette dernière. Cependant, d'autres rapportent que

les sites de neutralisation et d'inhibition de fusion sont présents sur S1 et S2 (Routledge *et al.* 1991; Stühler *et al.* 1991). En utilisant une banque de fragments de la protéine S exprimés en fusion avec la  $\beta$ -galactosidase, Luytjes *et al.* (1989) ont déterminé le site de liaison d'un AcMo, dénommé 5B19.2, ayant les activités de neutralisation, d'inhibition de fusion et de protection passive. Cet anticorps reconnaît un épitope situé près de l'extrémité N-terminale de la protéine S2 dont la séquence est conservée chez les souches JHM et A59.

D'autres travaux ont porté sur la localisation de déterminants importants dans la pathogénie du virus. Des variants ayant échappés à la neutralisation ont été isolés et caractérisés (Dalziel *et al.* 1986; Fleming *et al.* 1986; Wege *et al.* 1988). Ces virus présentent généralement un neurotropisme atténué en conservant toutefois leur tropisme pour les cellules gliales et leur capacité d'induire une infection chronique. La séquence du gène codant pour la glycoprotéine S de tels variants viraux a été déterminée. Des variants sélectionnés avec des AcMo reconnaissant des épitopes discontinus présentaient des mutations ponctuelles ou des délétions pouvant atteindre jusqu'à 159 acides aminés dans la sous-unité S1 (Parker *et al.* 1989b; Gallagher *et al.* 1990). Wang *et al.* (1992) ont récemment identifié la présence de mutations ponctuelles dans les sous-unités S1 ou S2 de variants de neutralisation sélectionnés à l'aide d'AcMo reconnaissant respectivement un épitope discontinu et un épitope linéaire. Ils ont également identifié chez les doubles variants isolés à l'aide des deux AcMo une délétion dans la protéine S1. Cette région hypervariable de la protéine S1 correspondrait à un site de recombinaison préférentiel (Banner *et al.* 1990).

#### 5.4.1 Variabilité nucléotidique du gène de la glycoprotéine S du MHV

Jusqu'à ce jour, la séquence nucléotidique du gène de la glycoprotéine S du MHV n'a été déterminée que pour les souches MHV-JHM (Schmidt *et al.* 1987), MHV-A59 (Luytjes *et al.* 1987) et MHV-4 (Parker *et al.* 1989b). La souche MHV-4, utilisée dans le laboratoire du Dr Buchmeier, est un isolat obtenu après purification par isolement de plages du virus MHV-JHM provenant du laboratoire du Dr Weiner (Weiner 1973). L'isolat MHV-JHM utilisée dans le laboratoire du Dr Siddell (Schmidt *et al.* 1987) a également été obtenu du Dr Weiner et purifié par isolement de plages. La comparaison des séquences déduites en acides aminés de la glycoprotéine S de ces deux souches a permis de mettre en évidence une délétion de 141 acides aminés (Figure 4) dans la glycoprotéine S de l'isolat MHV-JHM (Parker *et al.* 1989b). De plus, la glycoprotéine S du MHV-A59 montrerait une délétion de 52 acides aminés (Figure 4). Ainsi, il est présumé que l'isolat MHV-4 correspondrait davantage à la souche MHV-JHM typique que l'isolat obtenu dans laboratoire du Dr Siddell, qui fut d'ailleurs renommé MHV Wb1 par la suite (Schwarz *et al.* 1990). Ces résultats montrent qu'il peut exister une grande variabilité d'un laboratoire à un autre entre les souches étudiées et que cet aspect ne doit pas être négligé dans l'interprétation de résultats. Il est à noter qu'à l'exception des travaux effectués dans le laboratoire du Dr Buchmeier, les auteurs de publications ne font généralement pas de distinction terminologique entre la souche utilisée dans leur laboratoire et la souche JHM "originelle" dont la pathogénie est décrite à la section 4.1.

## 5.5 Autres protéines

Récemment, une nouvelle protéine structurale, sM, fut identifiée chez les virus IBV et TGEV. Pour le virus IBV, cette protéine correspond au produit de traduction du gène 3c (Liu et Inglis 1991) tandis que pour le TGEV, elle serait encodée par le gène 4 (Godet *et al.* 1992). Chez ces deux virus, la protéine serait intégrée à l'enveloppe virale par un domaine transmembranaire près de l'extrémité N-terminale de la protéine. L'orientation et la fonction de la protéine demeurent inconnues. Liu et Inglis (1991) suggèrent que par la similarité de masse moléculaire et de structure avec la protéine M2 du virus influenza, la protéine sM pourrait avoir un rôle biologique comparable, soit la formation des canaux ioniques nécessaires au mécanisme de décapsulation et d'assemblage des virions (Sugrue et Hay 1991). Godet *et al.* (1992) suggèrent plutôt qu'elle serait impliquée dans les processus d'assemblage et/ou de relargage des virions. Finalement, l'alignement de séquences de divers coronavirus prédit qu'elle serait encodée par les gènes 5, 5b et 6 des virus HCV, MHV et BCV, respectivement.

**Figure 4:** Comparaison des régions hypervariables du MHV-4, MHV-A59 et MHV-JHM. La ligne horizontale représente la structure primaire de la glycoprotéine S du MHV-4. La séquence comprise entre les acides aminés 415 et 605 de la protéine S du MHV-4 est comparée avec les régions correspondantes des glycoprotéines S du MHV-A59 et MHV-JHM. Les points indiquent les régions de délétion et les caractères soulignés, les différences d'acides aminés. (Modifiée de Parker *et al.* 1989b).



MHV-4

440 605

NYNPSSWNRRYGFNDAGVVGKSKHDVAYAQQCFTVRPSYCPCAQPDIVSACTSQTKPMSAYCPTGITHRBCSLWNGPHLSARVGSPTYTCBCTCKPNPFDTYDLRCGQIKTIVNVGDHCBGLGVLRDCKGNSDPHKGCSCANDSFIGWSDTCLVNDRCQIFANI

MHV-A59 ( Δ 52 aa)

NYNPSSWNRRYGFNDAGVVGKSKHDVAYAQQCFTVRPSYCPCAQPDIVSACTSQTKPMSAE VNVGDHCBGLGVLRDCKGNSDPHKGCSCANDSFIGWSDTCLVNDRCQIFANI

MHV-JHM ( Δ 141 aa)

NYNPSSWNRRYGFK VNDRCQIFANI

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**



## 1. CELLULES

### 1.1 Lignées cellulaires

Les lignées continues de cellules DBT et L929 ont été obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, É-U). La lignée DBT d'astrocytes a été établie à partir d'une tumeur de souris CDF1 inoculée intra-cérébralement (i.c.) avec le virus du sarcome de Rous (Hirano *et al.* 1974). La lignée L929 a été isolée de la lignée cellulaire L2, provenant de poumons de rats adultes (Kaighn et Douglas 1973).

### 1.2 Culture cellulaire

Les cellules DBT et L929 ont été cultivées à 37°C, dans une atmosphère humide en présence de CO<sub>2</sub> à 5% (v/v), dans un milieu de croissance fait de milieu minimum essentiel de Earle et de milieu M199 de Hank (1:1, v/v) auquel a été ajouté 5% (v/v) de sérum foetal bovin (SFB), 0,13% (p/v) de bicarbonate de sodium et 50 µg/ml de gentamicine (Gibco Canada, Burlington, Ontario).

## 2. VIRUS

### 2.1 Souches virales

La souche A59 du virus de l'hépatite murine a été obtenue de l'ATCC. Ce virus a été cloné deux fois par isolement de plages de lyse et passé quatre fois sur des cultures de cellules DBT afin de produire un stock viral dont le titre était  $2 \times 10^7$  unités formatrices de plages (UFP) par ml (section 2.4).

## 2.2 Productions virales

Des feuillets cellulaires confluent à 90% ont été infectés avec le virus MHV-A59 à une multiplicité d'infection (MOI) de 0,01. La solution virale a été préparée dans du milieu de croissance identique à celui utilisé pour la culture cellulaire, à l'exception du pH ajusté à 7,0 ou 6,0 et de la concentration de SFB réduite à 1% (v/v). Après une adsorption de 1 h à 37°C dans un volume minimal de milieu, du milieu de culture modifié a été ajouté et les feuillets cellulaires incubés à 37°C en présence de 5% (v/v) CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture a été récolté lorsque le feuillet cellulaire était fusionné à près de 100%, en évitant qu'il y ait détachement des cellules. Ce milieu a été clarifié des débris cellulaires par 20 min de centrifugation à 10 000 x g à 4°C. Pour les expériences de chromatographie d'affinité et d'immunoempreinte, le virus a été concentré par précipitation en présence de 10% (p/v) polyéthylène glycol 8000 (PEG; Sigma, St-Louis, MO, É-U) et 0,5 M NaCl durant 16 h à 4°C avec agitation. Après une centrifugation à 10 000 x g pendant 30 min à 4°C, le culot a été resuspendu dans un tampon phosphate (0,1 M phosphate de sodium, pH 6,2, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) dans le 1/50 du volume de milieu de culture et conservé à -70°C.

## 2.3 Marquage métabolique du virus

Des feuillets de cellules DBT ont été infectés avec le MHV-A59 à une MOI de 0,01 selon le protocole décrit à la section 2.2. Environ 6 h post-infection (p.i.), le milieu de culture a été remplacé par du milieu de culture contenant 4 mCi de méthionine [<sup>35</sup>S] (activité spécifique: 1129 Ci/mme; ICN Biomedicals Canada, St-Laurent, Québec). Lorsque l'effet cytopathique optimal a été atteint, soit près

de 16 h p.i., le milieu de culture a été recueilli et le virus concentré selon la technique décrite à la section 2.2.

#### 2.4 Test de plages

Le titre viral des suspensions de MHV-A59 a été évalué par test de plages selon un protocole modifié de Hirano *et al.* (1974). Brièvement, les feuillets de cellules DBT ont été cultivées en plateaux de 12 puits (Flow Laboratories, Mississauga, Ontario). Les échantillons ont été soniqués de 5 à 10 sec dans un bain sonicateur Braunsonic 12 (Branson, Shelton, CT, É-U) et dilués dans du milieu de culture. Le virus, dans un volume minimal de 0,15 ml, a été adsorbé aux cellules pendant 60 min à 37°C sur une plaque basculante, l'inoculum a été retiré et les feuillets cellulaires recouverts de 1 ml de milieu de culture contenant 1,5% (p/v) de bacto-agar liquifié (Difco Laboratories, Détroit, MI, É-U), 0,05 mg/ml de gentamicin et 10% (v/v) de SFB. Les plateaux ont ensuite été incubés 48 h à 37°C en présence de 5% (v/v) CO<sub>2</sub>, fixés par une solution de 9,25% (p/v) formaldéhyde dans du PBS (Gibco) et colorés 5 minutes avec une solution de crystal violet (1% (p/v) crystal violet dilué dans une solution à 20 % (v/v) éthanol) dilué 10 fois dans du PBS (8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,47 mM KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4, 137 mM NaCl, 2,68 mM KCl). A noter que le tampon "PBS (Gibco)" correspond au tampon stérile vendu commercialement et que le tampon "PBS" sans mention d'origine correspond au tampon préparé au laboratoire.

#### 2.5 Dose infectieuse en culture de tissu

La dose infectieuse en culture de tissu (DICT) a également été évaluée pour le stock de MHV-A59 produit (section 2.1). Brièvement, les feuillets de cellules DBT ont été cultivées en plateaux de 96 puits (Flow). Les échantillons ont été

soniqués de 5 à 10 sec dans un bain sonicateur Braunsonic 12 (Branson) puis dilués dans du milieu de culture. Un volume de 25 µl de chacune des dilutions à été ajouté à quatre ou huit puits. Les plateaux ont été incubés 72 h à 37°C en présence de 5% (v/v) CO<sub>2</sub>. Le nombre de puits infectés pour chacune des dilutions a alors été déterminé et les titres calculés selon la méthode de Karber (Hawkes 1979). Le résultat (DICT<sub>50</sub>) représente l'inverse de la dilution de l'échantillon permettant d'infecter 50% des cultures (ou puits) inoculées.

### 3. PRODUCTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX

#### 3.1 Immunisations

Des souris BALB/c femelles âgées de six semaines, séronégatives pour le MHV (section 4.3), ont été immunisées par voie intrapéritonéale (i.p.) avec 8 x 10<sup>6</sup> UFP de MHV-A59 inactivé aux rayons ultra-violet. Une dose de rappel identique à la première a été donnée aux souris trois semaines plus tard. Quatre jours après la deuxième injection, les rates des souris immunisées ont été prélevées et triturées dans un pétri stérile contenant du milieu RPMI (Gibco).

#### 3.2 Fusion cellulaire

Après avoir été purifiées des débris tissulaires et des globules rouges, les cellules de rate ont été fusionnées avec les cellules myélomateuses non-sécrétrices P3-X63-Ag8.653 (rapport 5:1) à l'aide du PEG 1000 (Sigma). Après la fusion, les cellules ont été lavées et resuspendues dans le milieu HAT, qui correspond au milieu de culture d'hybridomes (RPMI 1640 supplémenté de 0,2% (p/v) bicarbonate de sodium, 10% (v/v) SFB, 2,5 µg/ml fongizone, 100 U/ml pénicilline, 100 µg/ml streptomycine et 1 mM pyruvate de sodium)

auquel est ajouté 100  $\mu\text{M}$  d'hypoxanthine, 0,4  $\mu\text{M}$  d'aminoptérine, 16  $\mu\text{M}$  de thymidine (Sigma) et 10% (v/v) de SFB supplémentaire. Les cellules ont ensuite été distribuées dans des plateaux de 96 puits à une concentration moyenne de  $3 \times 10^5$  cellules/puit et cultivées à 37°C en présence de 7% (v/v)  $\text{CO}_2$ . Après la mort des cultures témoin de cellules de rate et de cellules myélomateuses, le milieu HAT a été remplacé par le milieu HT, qui ne contient pas d'aminoptérine et de SFB supplémentaire. Quatre semaines après la fusion, le milieu HT a été remplacé par du milieu de culture pour hybridomes.

### **3.3 Criblage et clonage des hybridomes**

Deux semaines après la fusion, les surnageants d'hybridomes ont été criblés par la technique d'ELISA décrite ci-après. Les hybridomes sécrétant des anticorps spécifiques au MHV-A59 ont été cultivés en plus grand volume et clonés par dilution limite.

### **3.4 Isotypie et dosage des anticorps**

L'isotype des anticorps a été déterminé par la méthode de double immunodiffusion (Bailey 1984). Un volume de 5 ml de gel d'agarose (LE Seakem, FMC Bioproducts, Rockland, ME, É-U) à 1% (p/v), préparé dans un tampon PBS, a été coulé sur des plaques de verre de 5 cm x 5 cm (gel d'environ 2,5 mm d'épaisseur). Après solidification, un trou central de 3,0 mm de diamètre entouré de 5 trous identiques au premier ont été percés. L'anticorps à identifier a été ajouté au puit central, et les antisérums spécifiques aux IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 (Cappel, Organon Teknika, West Chester, PA, É-U) ont été

ajoutés aux puits en périphérie. Les plaques ont été incubées à 4°C en chambre humide jusqu'à ce que les lignes de précipitation soient visibles.

La concentration d'immunoglobulines a été déterminée par un test d'immunodiffusion radiale (Mancini *et al.* 1965). L'antisérum anti-IgG (ICN Biomedicals) a été ajouté, à une dilution finale de 1/100, à 5 ml d'une solution d'agarose 1% (p/v) préparée dans le PBS. Cette préparation a été coulée sur des plaques de verre de 5 cm x 5 cm et incubée à 4°C jusqu'à ce que le gel se soit solidifié. Neuf trous symétriques de 3,0 mm de diamètre ont été percés. Sur une plaque, des dilutions sérielles d'immunoglobulines standards d'isotype approprié ont été ajoutées aux puits. Les dilutions sérielles d'anticorps à doser ont été ajoutées aux puits d'autres plaques. Les plaques ont été incubées à 4°C en chambre humide pendant 3 à 4 jrs. Le diamètre des cercles de précipitation a été mesuré et une courbe standard de la surface des cercles en fonction de la concentration d'immunoglobulines a été établie.

### 3.5 Production des liquides d'ascites

Dix jours précédant l'injection des hybridomes, des souris BALB/c séronégatives pour le MHV (section 4.3) ont été injectées avec 0,5 ml de 2,6,10,14-tétraméthyl-pentadécane (Sigma) par voie i.p. Par la suite, de  $10^5$  à  $10^6$  hybridomes sécréteurs viables ont été injectés dans la cavité péritonéale des souris. Un ascite témoin a été produit à la suite de l'injection des cellules myélomateuses P3-X63-Ag8.653 utilisées pour la fusion cellulaire. Dès l'accumulation de liquide, soit généralement de 10 à 14 jours après l'injection des hybridomes, et à chaque deux jours suivants, la cavité péritonéale a été percée avec une aiguille 23G et le liquide s'en écoulant a été recueilli dans un

tube à centrifugation. Chaque récolte d'ascite a été clarifiée par centrifugation à 1 000 x g pendant 10 min et conservée séparément jusqu'à ce que leur homogénéité soit confirmée par ELISA. Les ascites ayant un titre similaire ont été groupés et conservés en aliquotes à -20°C.

#### 4. ELISA

##### 4.1 Préparation de l'antigène

Des feuillets de cellules L929 confluent à 90% ont été infectés avec le MHV-A59 (MOI de 0,001) dans un milieu de culture à pH 6,0 ou 7,0 contenant 1% (v/v) de SFB (section 2.2) et incubés jusqu'à ce que l'effet cytopathique ait été observé sur 75 à 90% de la surface des feuillets. Les flacons de culture ont alors été soumis à trois cycles de congélation (-80°C) et décongélation (37°C). Ils ont ensuite été soniqués 2 x 1 min au degré 100 de l'appareil Braunsonic 2000 (Branson). Les lysats cellulaires ont été centrifugés à 10 000 x g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant a été récolté et centrifugé à 100 000 x g pendant 60 min à 4°C. Le culot a été resuspendu dans un volume de PBS équivalent au 1/50 du volume de milieu de culture initial et soniqué tel que décrit précédemment. Cette préparation a été centrifugée à 1 000 x g pendant 10 min à 4°C et le surnageant a été prélevé, aliquoté, et conservé à -20°C. La concentration en protéine de l'antigène viral a été évaluée avec la trousse de dosage de Bio-Rad (Mississauga, Ontario) basée sur la méthode de Bradford (1976). Finalement, la concentration optimale d'antigène à adsorber au plateau a été évaluée par un test ELISA en échiquier. Brièvement, des dilutions sérielles d'antigène, effectuées dans un sens du plateau (colonnes ou rangées), ont d'abord été adsorbées (section 4.3). La réactivité de dilutions sérielles d'un antisérum

spécifique au MHV-A59 ou d'un antisérum témoin a ensuite été analysée selon le protocole habituel (section 4.3). La concentration optimale d'antigène a été établie à environ 1,25 à 2,5 µg/ml.

#### 4.2 Marquage à la biotine

La méthode décrite par Guesdon *et al.* (1979) a été utilisée pour le couplage de la biotine aux anticorps. Brièvement, l'anticorps à biotinyler, préalablement purifié par chromatographie d'affinité (section 9.1), a été dialysé contre un tampon PBS et ajusté à une concentration de 1 mg/ml. L'anticorps a ensuite été ajouté à une solution fraîchement préparée de 1 mg/ml N-hydroxysuccinimidobiotine (NHS; Sigma) dissout dans le diméthylformamide. Un rapport de 5 mg d'anticorps pour 1 mg de NHS a été utilisé pour ces expériences. Le mélange a été incubé pendant 4 h à température ambiante avec agitation. La biotine libre a été éliminée par dialyse contre le PBS et des aliquotes d'anticorps biotinylés ont été conservées à -70°C.

#### 4.3 Immunodétection directe

Cette section décrit la méthodologie employée pour titrer les anticorps spécifiques au MHV ou à des peptides synthétiques. Pour détecter les anticorps spécifiques aux protéines virales, l'antigène décrit précédemment a été dilué à la concentration optimale dans le tampon PBS stérile (Gibco) et 100 µl ont été adsorbés dans chaque puit de plateaux ELISA à 96 puits (Flow) pour 16 h à température ambiante. Après avoir vidangé les plateaux, les sites d'adsorption résiduels ont été bloqués pendant 1 h avec 150 µl de diluant ELISA, constitué de tampon PBS auquel est ajouté 0,1% (v/v) de Tween-20 (Sigma) et 10% (v/v) de SFB. Pour détecter les anticorps spécifiques à des peptides synthétiques, une



solution de 2 µg/ml de peptides couplés ou non-couplés a été utilisée. Une solution de PBS contenant 0,2% (v/v) de Tween-20 a été utilisée pour le blocage des plateaux adsorbés avec les peptides non-couplés tandis qu'un tampon Blotto, composé de 5% (p/v) de lait écrémé en poudre (Carnation, Toronto, Ontario) dans le tampon PBS, a été utilisé pour le blocage des plateaux adsorbés avec les peptides couplés. Dans ces deux derniers cas, une incubation de 2 h a été nécessaire pour le blocage. Les dilutions sérielles d'anticorps, dans un volume final de 100 µl, ont été effectuées dans le diluant ELISA lorsque l'antigène viral a été utilisé tandis qu'elles ont été effectuées dans le PBS contenant 0,1% (v/v) Tween-20 lorsque des peptides étaient utilisés. La détection des anticorps fixés a été effectuée à l'aide d'un antisérum dirigé contre les immunoglobulines de souris et conjugué à la peroxydase de raifort (Kirkegaard & Perry Laboratory, Gaithersburg, MD, É-U). La concentration optimale à utiliser a été également déterminée à l'aide d'un ELISA en échiquier et correspondait à une dilution de 1/1000 dans un volume de 100 µl. Les incubations étaient généralement de 1,5 à 2 h pour le premier anticorps (ou antisérum) et de 1 h pour l'anticorps conjuguée et ce, à la température ambiante. La réaction a été révélée à l'aide d'une incubation de 30 min à l'obscurité avec 100 µl de la solution de substrat-chromogène (50 mM acide citrique, 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 5,0, 2,2 mM 0-phénylène diamine, 3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Après quoi, la réaction a été bloquée par l'addition de 100 µl de 0,1 N HCl à chaque puit. L'intensité de la réaction a ensuite été mesurée à une longueur d'ondes de 492 nm par un lecteur EAR400AT (SLT-Labinstruments, Autriche). A noter que les puits ont été lavés cinq fois avec un tampon de lavage (PBS contenant 0,1% (v/v) de Tween-20) et vidés avant l'ajout des anticorps conjugués et du substrat. Le titre d'un anticorps ou d'un antisérum correspond

à l'inverse de la dilution maximale donnant une densité optique supérieure à la moyenne des densités optiques d'un sérum témoin à laquelle est ajoutée 2 fois la valeur de l'écart type.

#### 4.4 Test de compétition

Les ELISA de compétition ont été effectués selon une méthode modifiée du protocole décrit par Talbot *et al.* (1984b). L'antigène viral ou les peptides synthétiques ont été adsorbés aux plateaux et ces derniers bloqués tel que décrit précédemment (section 4.3). Le premier anticorps a été ajouté aux plateaux à une dilution initiale de 1/10 et dilué en série par un facteur 5. Après une adsorption de 1,5 h à la température ambiante, les plateaux ont été vidangés mais non lavés et le deuxième anticorps, marqué à la biotine, a été ajouté aux puits à des dilution de 1/500, 1/1000 et 1/2000. Suivant une incubation de 1,5 h à température ambiante, la fixation d'anticorps biotinylés a été détectée suite à une incubation de 1 h avec un conjugué streptavidine-peroxydase de raifort (Sigma) utilisé à une dilution de 1/1000, suivie d'une incubation avec la solution de substrat-chromogène et de la mesure des réactions tel que décrit précédemment (section 4.3). Les plateaux ont été lavés et vidangés avant l'ajout du conjugué streptavidine et du substrat, tel que décrit dans la section 4.3. Le pourcentage de compétition a été calculé en utilisant la formule suivante:

$$\text{Pourcentage de compétition} = \frac{\text{D.O. 0\% comp.} - \text{D.O. échantillon}}{\text{D.O. 0\% comp.} - \text{D.O. 100\% comp.}} \times 100$$

où le terme D.O. 0% comp. correspond à la densité optique maximale en absence de compétition, soit la réactivité de l'anticorps conjugué seul (sans premier anticorps), et le terme D.O. 100% comp. correspond à la densité optique minimale lors d'une compétition complète, soit la réactivité correspondant au bruit de fond sans anticorps conjugué.

#### 4.5 Quantification de la glycoprotéine S

Un test de capture d'antigène de type ELISA a été développé pour quantifier la glycoprotéine S. Un premier anticorps, l'AcMo 7-10A.13, a été adsorbé aux plateaux à 96 puits pendant 2 h à 37°C à une dilution de 1/1000 dans un volume de 75 µl par puit. Les plateaux ont ensuite été bloqués 2 h à 37°C avec 150 µl/puit de diluant ELISA. Les plateaux ont été lavés cinq fois avec le tampon de lavage. Des dilutions sérielles de l'antigène à titrer ont été ajoutées aux puits dans un volume de 50 µl. Après une incubation d'une heure à température ambiante, les plateaux ont été lavés et l'AcMo 4-11G.6 biotinylé a été ajouté aux puits à une dilution de 1/100 en volume de 50 µl/puit. Les plateaux ont été incubés 1 h à température ambiante et lavés. Finalement, les anticorps biotinylés fixés ont été détectés par l'ajout d'un conjugué streptavidine-peroxidase de raifort (Sigma) utilisé à une dilution de 1/500 (volume de 50 µl/puit). Les étapes subséquentes d'ajout du substrat-chromogène et de lecture des réactions ont été effectuées tel que décrit à la section 4.4.

## 5. IMMUNOPRÉCIPITATION

### 5.1 Préparation de l'antigène

Des feuillets confluents de cellules DBT cultivées en flacon de 150 cm<sup>2</sup> ont été infectés avec le virus MHV-A59 à une MOI de 1,0 dans un milieu de culture à pH 6,0 ou 7,0 contenant 1% (v/v) de SFB (section 2.2) et incubés à 37°C en atmosphère humide en présence de 5% (v/v) CO<sub>2</sub>. Lorsque l'effet cytopathique observé était d'environ 50%, 2,5 mCi de méthionine [<sup>35</sup>S] (ICN Biomedicals) ont été ajoutés à chacun des flacons et ceux-ci ont été incubés jusqu'à ce que les feuillets cellulaires soient fusionnés à 100%. Les feuillets ont alors été lavés 3 fois avec 5 ml d'un tampon de lavage RIPA (25 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>) et ils ont été lysés par une incubation de 20 min sur glace suivi de trois cycles de congélation à -80°C et de décongélation à 37°C en présence de 3 ml de tampon de lavage RIPA auquel est ajouté 0,5% (v/v) Triton X-100, 0,5% (p/v) désoxycholate de sodium (Sigma), 1% (v/v) aprotinine (Sigma) et 1mM fluorure de phénylméthylsulfonyl (Sigma). Le lysat cellulaire a été clarifié par centrifugation à 12 000 × g pendant 15 min et le surnageant utilisé comme antigène pour l'immunoprécipitation.

## 5.2 Précipitation

Les échantillons de plasma ou d'anticorps à analyser ont d'abord été adsorbés pendant 1 h à 37°C sur le gel de protéine A-Sepharose CL4B (Pharmacia) gonflé dans le tampon de lavage RIPA selon les recommandations du fabricant. Généralement 10 µl d'ascites d'hybridomes ou de plasma de souris ont été ajoutés à 100 µl de 5% (p/v) protéine A-Sepharose. Le gel a ensuite été lavé 3 fois avec 600 µl de tampon de lavage RIPA auquel a été ajouté 0,1% (v/v) Triton X-100. L'antigène (100 µl) a été ajouté au gel et le mélange incubé à 37°C pendant 2 h avec agitation occasionnelle. Après plusieurs lavages avec le tampon utilisé précédemment, les protéines adsorbées au gel ont été

éluées dans le tampon d'échantillon d'électrophorèse et analysées par SDS-PAGE et fluorographie (section 6.1).

## 6. ÉLECTROPHORÈSES ET IMMUNOEMPREINTES

### 6.1 Électrophorèse de protéines (SDS-PAGE)

L'analyse d'échantillons par électrophorèse a été effectuée selon la méthode de gels discontinus d'acrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS; Laemmli 1970). Généralement, des gels de séparation 10% (p/v) acrylamide (rapport acrylamide:bis-acrylamide de 38:1) ont été utilisés pour l'analyse des protéines virales ou des extraits bactériens (section 11.5). Dans d'autres cas, des gels de séparation en gradient continu de 7 à 15% (p/v) acrylamide ont été utilisés. Les gels de séparation ont été préparés dans un tampon 0,375 M Tris-HCl pH 8,8 contenant 0,1% (p/v) SDS, 0,03% (v/v) TEMED et 0,07% (p/v) persulfate d'ammonium. Les gels de regroupement étaient de 4% (p/v) acrylamide (rapport acrylamide:bis-acrylamide de 4:1) préparés dans un tampon 0,625 M Tris-HCl pH 6,7 contenant 0,1% (p/v) SDS, 0,06% (v/v) TEMED et 0,0005% (p/v) riboflavine. Avant d'être chargés, les échantillons ont été chauffés 2 min à 100°C dans un tampon contenant 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 1% (p/v) SDS, 1% (v/v)  $\beta$ -mercaptoéthanol, 10% (v/v) glycérol et 0,003% (p/v) bleu de bromophénol. L'électrophorèse a été réalisée dans un tampon contenant 25 mM Tris-HCl pH 8,3, 0,192 M glycine et 0,1% (p/v) SDS sous un courant de 35 mA. Le marqueur de masse moléculaire utilisé était constitué des protéines standards de masses moléculaires inférieures de Pharmacia (Pharmacia, Dorval, Québec) auquel a été ajouté la  $\beta$ -galactosidase (Sigma) à une concentration finale de 0,063  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

Les méthodes de coloration à l'argent (Oakley *et al.* 1980) ou au bleu de Coomassie ont été utilisées pour révéler la migration des protéines. Pour la coloration au bleu de Coomassie, le gel a d'abord été incubé 1 h avec agitation dans la solution de fixation (40% (v/v) méthanol et 10% (v/v) acide acétique) à laquelle a été ajoutée 0,25% (p/v) bleu de Coomassie R-250 (Bio-Rad); puis a été décoloré avec la solution de fixation. Pour la coloration à l'argent, le gel a été fixé pendant 1 hr, lavé deux fois pendant 30 min dans une solution de 10% (v/v) éthanol et 5% (v/v) acide acétique et lavé une autre fois pour 16 h dans la dernière solution. Le gel a été ensuite incubé 30 min dans une solution de 10% (v/v) glutaraldéhyde (BDH Chemicals, Toronto, Ontario), puis lavé par quatre incubations de 15 min chacune dans l'eau déionisée. Le gel a par la suite été incubé 15 min dans la solution de coloration à l'argent (1,4% (v/v)  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 0,076% (p/v)  $\text{NaOH}$ , 0,776% (p/v)  $\text{AgNO}_3$ ), puis lavé 2 min dans l'eau déionisée. La coloration a été révélée en incubant le gel dans la solution de développeur (0,005% (p/v) acide citrique, 0,019% (p/v) formaldéhyde) jusqu'à l'obtention de l'intensité désirée, après quoi le gel a été lavé avec l'eau déionisée.

Lorsque des échantillons marqués à la méthionine [ $^{35}\text{S}$ ] ont été analysés, le gel a d'abord été fixé pendant 1 h dans une solution de 40% (v/v) méthanol et 10% (v/v) acide acétique. Après plusieurs rinçages à l'eau déionisée, le gel a ensuite été incubé pendant 30 min dans la solution de fluorographie (Enlightning; New England Nuclear, Lachine, Québec) puis séché sous vide à 60°C dans un sécheur de gel (Bio-Rad slab dryer, modèle 483). Un film Kodak X-Omat AR XA2 a été exposé au gel avec un écran intensificateur (E.I. Dupont De Nemours & Co., Wilmington, DE, É-U) pendant 48 h à -70°C. Le marqueur de

masse moléculaire constitué de protéines marquées au  $^{14}\text{C}$  (New England Nuclear) a été utilisé pour les électrophorèses de protéines radiomarquées.

## 6.2 Immunoempreinte de type "Western"

L'immunoempreinte de protéines sur membrane de nitrocellulose a été effectuée selon la méthode modifiée de Talbot *et al.* (1984a). Après séparation par électrophorèse, les protéines ont été transférées du gel à la membrane de nitrocellulose Hybond-C extra (Amersham, Oakville, Ontario) pendant 1 h à 35 V dans le tampon d'électrophorèse auquel est ajouté 20% (v/v) méthanol. Les sites d'adsorption résiduels de la membrane ont été bloqués pendant 30 min avec un tampon de lavage (tampon PBS contenant 0,1% (v/v) Tween-20). L'antisérum ou l'anticorps a été dilué à la concentration appropriée dans le tampon de lavage et incubé pendant 1,5 h avec la membrane. La fixation des premiers anticorps a été détectée par une seconde incubation avec un antisérum dirigé contre les immunoglobulines de souris couplé à la peroxydase de raifort (Sigma). Cet antisérum a été dilué 1/1000 dans le tampon de lavage et incubé 1 h avec la membrane. Finalement, la fixation de l'antisérum a été révélée par une incubation de 30 à 45 min avec la solution de substrat-chromogène, composée de 17% (v/v) 4-chloro-1-naphtol et de 0,01% (v/v)  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans le tampon PBS. Toutes les incubations précédentes ont été effectuées à température ambiante avec agitation et cinq lavages ont été effectués entre les incubations avec les différents réactifs. Les protéines du marqueur de masse moléculaire ont été colorées par une incubation de 5 min dans une solution de 0,05% (p/v) bleu de Coomassie préparée dans 40% (v/v) méthanol et 10% (v/v) acide acétique.

### 6.3 Immunoempreinte ponctuelle

Un test d'immunoempreinte ponctuelle (dot blot) a été effectué afin d'évaluer la sensibilité de la glycoprotéine S au traitement à l'isothiocyanate d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{SCN}$ ) et au SDS. Le virus MHV-A59 concentré et solubilisé avec 2% (v/v) NP-40 (voir section 9.3) a été incubé 5 min en présence de 4 M  $\text{NH}_4\text{SCN}$  à température ambiante ou 1% (p/v) SDS à 100°C. L'antigène a été ensuite adsorbé à la membrane de nitrocellulose Hybond-C extra à l'aide de l'appareil Bio-Dot (Bio-Rad). La réactivité des AcMo 7-10A.13 et 4-11G.6 biotinylés contre la glycoprotéine S ont été comparée selon la méthode décrite précédemment (section 6.2), à l'exception que l'antisérum dirigé contre les immunoglobulines de souris conjugué à la peroxidase a été remplacé par un conjugué streptavidine-peroxydase (Sigma; dilué 1/1000).

## 7. NEUTRALISATION ET INHIBITION DE FUSION

### 7.1 Neutralisation de plages

Les plasmas à titrer ont d'abord été décomplémentés par une incubation de 30 min à 56°C. Les dilutions d'anticorps ou de plasma ont été ensuite ajoutées à un volume égal d'une dilution du stock viral de MHV-A59 contenant 300 à 400 UFP/ml. Après une incubation de 1 h à 37°C, l'infectivité résiduelle a été évaluée selon un test de plages tel que décrit précédemment (section 2.4). Le titre de neutralisation indique la réciproque de la dilution de l'échantillon permettant de réduire de 50% le nombre d'UFP obtenues dans un échantillon témoin (sans anticorps).



## **7.2 Neutralisation d'effet cytopathique**

Dans ce test de neutralisation, les dilutions d'anticorps ou de plasmas ont été incubées avec une dilution de stock viral contenant de 30 à 300 DICT<sub>50</sub>. Après incubation, l'infectivité résiduelle a été évaluée par le test de DICT (section 2.5). Le titre de neutralisation indique la réciproque de la dilution de l'échantillon permettant de neutraliser l'infectivité virale dans 50% des cultures inoculées. La dilution de virus utilisée a également été titrée pour s'assurer du nombre de doses employées dans le test.

## **7.3 Inhibition de fusion**

Des feuillets de cellules DBT cultivés dans des plateaux de 96 puits ont été infectés avec 50 à 100 UFP de MHV-A59 par puit (MOI  $\approx$  0,0004). Après une adsorption de 1 h à 37°C, l'inoculum a été prélevé et du milieu de culture ajouté aux puits. Après une incubation de 3 h à 37°C, le milieu précédent a été remplacé par du milieu de culture contenant des dilutions sérielles d'anticorps ou de plasma. Après une incubation de 32 h à 37°C, l'effet cytopathique a été évalué et le titre réduisant de 50% la fusion observée dans un échantillon témoin a été estimé.

# **8. EXPÉRIMENTATION CHEZ LA SOURIS**

## **8.1 Souris**

Pour chacune des expériences décrites dans cette thèse, nous avons utilisé des souris BALB/c femelles de six semaines (Charles River, St-Constant, Québec) qui ont été maintenues selon les conditions adéquates à l'expérimentation animale. Avant d'être injectées, soit au jour 0 des

expériences, un échantillon sanguin a été prélevé de chaque souris et l'absence d'anticorps anti-MHV dans le plasma a été vérifié par ELISA. Les échantillons ont été prélevés par la technique de saignée au plexus rétro-orbital décrite par Talbot (1989) et les échantillons de plasma ont été recueillis après centrifugation des cellules sanguines à  $10\,000 \times g$  pendant 10 min.

## 8.2 Immunisations

Les immunisations avec la glycoprotéine S purifiée, les peptides synthétiques ou les produits d'expression procaryotique ont été effectuées par voie i.p. Pour la première immunisation, les antigènes ont été émulsifiés (Harlow et Lane 1988) dans un volume égal d'adjuvant complet de Freund (ACF; Gibco). Pour les doses de rappel, les antigènes ont été émulsifiés dans un volume égal d'adjuvant incomplet de Freund (AIF). Un volume maximal de 0,1 ml d'adjuvant par souris a été injecté. Des échantillons sanguins ont été prélevés avant chacune des injections et le plasma conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation.

## 8.3 Épreuves virales

Le stock de la souche MHV-A59 a été utilisé pour les épreuves virales. La dose létale à 50% ( $DL_{50}$ ) a été estimée expérimentalement à  $5 \times 10^4$  UFP. Les souris ont d'abord été anesthésiées à l'éther ou par injection i.p. de 0,1 ml par souris de l'anesthésiant kétamine-xylazine, composé de 10% (v/v) Rogarsetic (Rogar/STB, Pointe-Claire, Québec) et 5% (v/v) Rompun (Bayvet, Concord, Ontario) dans le PBS. Elles ont ensuite été inoculées par voie i.c. avec 10  $DL_{50}$ , soit  $5 \times 10^5$  UFP par souris dans un volume de 0,05 ml de milieu de culture.

Avant l'épreuve, des échantillons sanguins ont été prélevés et le plasma conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

## 9. CHROMATOGRAPHIES D'AFFINITÉ

### 9.1 Purification des anticorps monoclonaux

Les AcMo ont été purifiés par chromatographie d'affinité sur protéine A-Sepharose CL4B (Pharmacia) selon la technique décrite par Manil *et al.* (1986). Brièvement, l'anticorps à purifier a été dialysé à 4°C contre un tampon 50 mM Tris-HCl pH 8,5, ce tampon ayant également servi à gonfler le gel de protéine A-Sepharose et à préparer la colonne. Un volume de 3,5 ml de gel gonflé a été sédimenté dans une colonne de 1 cm de diamètre. La solution d'anticorps a été ajoutée au dessus du gel et l'adsorption maximale a été permise, après pénétration au gel, par une incubation de 1 h à 4°C, température à laquelle s'effectue toutes les étapes de la purification. Le gel a été ensuite lavé avec le tampon 50 mM Tris-HCl pH 8,5 à un débit de 0,2 ml/min pour une colonne de 1 cm de diamètre et des fractions de 3 ml ont été récoltées. Le gel a été ainsi lavé jusqu'à ce que l'absorbance à 280 nm des fractions de lavage soit près de 0. Les anticorps adsorbés ont ensuite été élués avec un tampon citrate pH 4,0 (50 mM citrate de sodium) à un débit de 1 ml/min jusqu'à ce que l'absorbance de l'éluat soit presque nulle. Le gel a été finalement lavé avec un tampon citrate pH 3,0 et reconditionné avec le tampon 50 mM Tris-HCl pH 8,5. La concentration d'anticorps, en mg/ml, a été estimée selon le rapport de l'absorbance à 280 nm divisé par 1,4. L'anticorps purifié a été ensuite dialysé contre le tampon 50 mM Tris-HCl pH 8,5 et conservé à -20°C.

## 9.2 Préparation de l'immunoadsorbant

L'AcMo 7-10A.13 a été utilisé pour la chromatographie d'immunoaffinité. Cinq milligrammes d'anticorps purifié a été couplé à un gramme de gel de Sepharose 4B activé au bromure de cyanogène (Pharmacia). Le gel a d'abord été gonflé dans une solution 1 mM HCl. L'anticorps a été dilué dans un tampon bicarbonate (0,1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8,5, 0,5 M NaCl) dans un volume final de 7 ml et cette solution d'anticorps a été ajoutée au gel gonflé. Après une incubation de 2 h à température ambiante, les groupement réactifs résiduels ont été bloqués par une incubation de 16 h à 4°C avec un tampon 0,2 M glycine pH 8,0. Finalement, le gel a été lavé en trois cycles successifs avec un tampon acétate (0,1 M acétate de sodium pH 4,0, 0,5 M NaCl) et le tampon bicarbonate pH 8,5. Le gel a été conservé à 4°C dans le tampon bicarbonate.

## 9.3 Solubilisation de l'antigène

Le virus précipité au PEG (section 2.2) a été dialysé contre le tampon phosphate pH 6,2 et clarifié par centrifugation à 3 000 x g pendant 10 min. L'antigène viral a été ensuite solubilisé avec 2% (v/v) Nonidet P-40 (NP-40; Sigma) pendant 2 h à température ambiante avec agitation occasionnelle et clarifié des éléments insolubles par une centrifugation à 100 000 x g pendant 45 min.

## 9.4 Immunoadsorption en tube

L'antigène marqué métaboliquement à la méthionine [<sup>35</sup>S] (section 2.3) a été solubilisé selon la technique décrite ci-haut (section 9.3) et adsorbé à 100 µl d'immunoadsorbant (section 9.2) à 50% (v/v) pendant 16 h à 4°C. Le gel a été

lavé plusieurs fois avec 1 ml de tampon phosphate pH 6,2 (section 2.2) auquel a été ajouté 0,2% (v/v) NP-40. Lorsque la radioactivité résiduelle mesurée dans les surnageants de lavage a été minimale, le gel a été resuspendu dans le tampon d'échantillon d'électrophorèse et analysé par SDS-PAGE sur un gel en gradient de 7-15% (p/v) acrylamide et fluorographie (section 6.1). Les proportions des polypeptides détectés ont été estimées par l'analyse de l'autoradiogramme par densitométrie à une longueur d'ondes de 500 nm et une largeur de fente de 0,2 nm sur un spectrophotomètre Beckman DU-8 (Beckman, Montréal, Québec).

### 9.5 Chromatographie en colonne

L'antigène solubilisé a été ajouté à un volume de 3,5 ml d'immunoabsorbant et incubé 16hrs à 4°C sur un agitateur rotatif. Le gel a ensuite été versé dans une colonne à chromatographie d'un diamètre de 1,5 cm. Le gel a été lavé avec un tampon phosphate pH 6,2 (section 2.2) contenant 0,1% (v/v) NP-40 à un débit de 0,2 ml/min jusqu'à ce que l'absorbance à 280 nm des fractions de lavages soit minimale. La colonne a été lavée avec quatre volumes de gel de tampon phosphate (section 2.2) contenant 0,1% (p/v) octylglucoside (Sigma). Les protéines adsorbées ont été éluées à un débit de 1ml/min avec un tampon phosphate (section 2.2) contenant 4 M isothiocyanate d'ammonium et 0,1% (p/v) octylglucoside. Des fractions de 1 ml ont été recueillies et dialysées contre 50 mM bicarbonate d'ammonium. Une aliquote de chacune des fractions a été lyophilisée, et le culot resuspendu dans le tampon d'échantillon d'électrophorèse, analysé par SDS-PAGE et coloré à l'argent (section 6.1). Les fractions contenant la glycoprotéine S purifiée ont été assemblées, lyophilisées et resuspendues dans 500 µl de tampon TMEN (50 mM

Tris-acide maléique, pH 6,2, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA). La concentration en protéines des échantillons avant et après purification a été estimée par la trousse de micro-test de la compagnie Pierce (Rockford, Illinois, É-U) qui permet le dosage de protéines en présence de détergents.

## 10. PEPTIDES SYNTHÉTIQUES

### 10.1 Algorithmes de prédiction

Plusieurs algorithmes de prédiction d'épitopes ont été utilisés pour localiser les régions de la glycoprotéine S pouvant induire une réponse humorale reconnaissant la protéine en conformation native. Ces algorithmes sont basés sur des paramètres permettant de prédire des portions de protéine potentiellement exposées, soit l'hydrophilicité, la probabilité de surface et la flexibilité associée à des segments de la structure primaire de la protéine. Dans la présente étude, nous avons utilisé les paramètres d'hydrophilicité de Hopp et Woods (1981), Kyte et Doolittle (1982) et Parker *et al.* (1986), les paramètres de probabilité de surface de Welling *et al.* (1985), Hopp (1986), Rose *et al.* (1985) et Janin (1979), et finalement ceux de Karplus et Schulz (1985) pour la flexibilité. Selon ces différents paramètres, une valeur mathématique est attribuée à chacun des vingt acides aminés. La moyenne des valeurs de chaque segment, ou fenêtre, de 6 ou 7 acides aminés de la structure primaire de la protéine est calculée et représentée graphiquement sous forme de profil composé de pointes (valeur maximale) et de creux (valeur minimale). L'algorithme d'Emini *et al.* (1985) utilise les données publiées par Janin (1979) en multipliant, au lieu d'additionner, les valeurs des acides aminés à l'intérieur de chaque fenêtre.

## 10.2 Analyses et sélection des peptides

La séquence de la glycoprotéine S du MHV-A59 (Luytjes *et al.* 1987) a été analysée par les neuf méthodes citées précédemment, en employant une fenêtre de sept acides aminés, à l'aide d'un logiciel conçu avec la collaboration de Jean Pellerin du Service de l'Informatique (Institut Armand-Frappier). L'utilisation de plusieurs paramètres d'analyse permet de maximiser la réussite de la prédiction d'épitopes étant donné que le profil obtenu par chaque méthode est différent et que les meilleurs taux de réussite, qui sont d'environ 50 à 60%, s'appliquent aux pics maximaux obtenus par chacune des méthodes (van Regenmortel *et al.* 1988). La sélection des peptides et leur synthèse a été effectuée avec la collaboration de Martial Lacroix de Biochem Pharma Inc (Laval, Québec) selon la méthode décrite précédemment (Talbot *et al.* 1988).

## 10.3 Couplages

Les peptides ont été couplés à l'albumine sérique bovine (BSA) ou à l'hémocyanine de patelle (KLH) en utilisant le sulfosuccinimidyl 4-(N-maléimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate (Sulfo-SMCC; Pierce). Cet agent couplant hétérobifonctionnel a été d'abord couplé par l'intermédiaire d'amines libres à la molécule porteuse dans un tampon PBS pH 7,6. Brièvement, l'équivalent micromolaire est calculé pour la quantité de peptide désiré à coupler. Pour obtenir la quantité en milligrammes de molécule porteuse et de sulfo-SMCC à utiliser, le nombre de micromoles de peptide est multiplié par un facteur de 3,2 pour le KLH, de 1,7 pour le BSA et de 0,9 pour le sulfo-SMCC. Ces facteurs de proportions ont été utilisés selon la recommandation de Biochem Pharma Inc. La quantité de BSA a été dissoute à une concentration finale de 1%

(p/v) dans un tampon PBS pH 7,6, le sulfo-SMCC a été ajouté à cette solution et le mélange incubé 30 min à 37°C. Le sulfo-SMCC libre a été éliminé par dialyse contre un tampon PBS pH 7,2. Le peptide a été resuspendu dans le tampon PBS pH 7,2, ajouté au porteur activé, et le mélange incubé 16 h à température ambiante sous atmosphère d'azote. Le couplage de la molécule porteuse activée au peptide se fait par l'intermédiaire de groupements thiols. Les rapports molaires peptide/porteur théoriques étaient de 40 pour le BSA et de 310 pour le KLH. L'efficacité de couplage a été mesurée en établissant une courbe standard d'absorbance du peptide sur HPLC (Applied Biosystems, détecteur-contrôleur d'absorbance modèle 1783A, système de pompes modèle 1400A, intégrateur Shimadzu) et en dosant la quantité résiduelle de peptide libre après couplage. La chromatographie a été effectuée sur une colonne C<sub>18</sub> de 10 cm de longueur par 4,5 mm de diamètre en phase inversée en utilisant un gradient de 0 à 60% (v/v) acétonitrile dans 0,1% (v/v) acide trifluoroacétique. Le peptide A (voir section 4.2 au chapitre "Résultats") a été modifié par le 2-Imidothiolane-HCl (Réactif de Traut; Pierce) après la synthèse pour ajouter un groupement thiol libre. La réaction de couplage du réactif de Traut s'effectue par l'intermédiaire d'amines primaires.

## 11. CLONAGE ET EXPRESSION DE LA RÉGION IMMUNODOMINANTE

Sauf indication contraire, les techniques de génie génétique décrites ci-dessous proviennent ou s'inspirent de Sambrook *et al.* (1989).

### 11.1 Extraction des ARN viraux

Des feuilletts confluent de cellules DBT ont été infectés avec le MHV-A59 à une MOI de 0,01. Les ARN totaux ont été extraits selon le protocole décrit par



Chirgwin *et al.* (1979). Quatorzes heures après l'infection, les feuillettes ont été lavés avec un tampon PBS et lysés avec une solution d'isothiocyanate de guanidinium (4 M isothiocyanate de guanidinium, 25 mM acétate de sodium pH 6,0, 0,84% (v/v)  $\beta$ -mercaptoéthanol). Les ARN ont été isolés par ultracentrifugation sur un coussin de chlorure de césium (5,7 M CsCl, 25 mM acétate de sodium pH 6,0) pendant 16 h à 100 000 x g. Le culot d'ARN a été resuspendus dans 0,3 M acétate de sodium pH 6,0 et les protéines extraites avec 2 volumes de PCI (phénol:chloroforme:alcool isoamyl, 25:24:1). Après une seconde extraction de la phase aqueuse avec 2 volumes de chloroforme, l'ARN a été précipité avec 2.5 volumes d'éthanol (IBI, Toronto, Ontario). Les culots ont été lavés avec l'éthanol 70%, séchés dans une microcentrifugeuse sous vide (Speed Vac Concentrator; Savant, Farmingdale, New York, É-U) et resuspendus dans l'eau déionisée.

### 11.2 Amplification de la région immunodominante

Une région de la glycoprotéine S du MHV-A59 (Luytjes *et al.* 1987) codée par les nucléotides 2 272 à 2 827 a été amplifiée par synthèse d'ADN complémentaire et réaction de polymérisation en chaîne (Stewart *et al.* 1992). Les oligonucléotides A59-S2H (5'-GGATCCGGATCCGGGCACC-ATGAGGAGTT-3', homologue aux nucléotides 2272 à 2288) et A59-S2I (5'-GGATCCGGATCCCTGCTGACCACGGTGGG-3', complémentaire et inverse aux nucléotides 2811 à 2827) ont été utilisés pour amplifier un fragment de 556 paires de bases (580 incluant un double site de restriction *Bam*H1 ajouté à chaque oligonucléotide, et indiqué par le souligné).

Environ 1 µg d'ARN a été ajouté à 11,5 µl d'eau déionisée et incubé 7 min à 65°C. La réaction de synthèse a été effectuée dans le tampon de polymérase *Taq* (BIO/CAN, Mississauga, Ontario) contenant 10 mM Tris-HCl pH 8,8, 50 mM KCl et 0,1% (v/v) Triton X-100, auquel a été ajouté 1 mM chacun de dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 pmol d'oligonucléotide A59-S2I, 40 U de RNAsine (BIO/CAN) et 20 U de transcriptase inverse Mo-MuLV (Pharmacia) dans un volume final de 20 µl. Le mélange a été incubé 35 min à 37°C. La réaction d'amplification a été effectuée avec le mélange précédent dans un volume final de 100 µl avec les concentrations finales d'éléments: 1,25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de chaque nucléotide, 50 pmol d'oligonucléotides A59-S2H et A59-S2I et finalement 2,5 U de polymérase *Taq*. L'ADN a été amplifié (DNA thermal cycler, Perkin-Elmer, Norwalk, CT, É-U) par trente cycles d'une minute à 94°C, 2 min à 60°C et 2 min à 72°C, complétés par une incubation de 7 min à 72°C. Le produit d'amplification a été analysé par électrophorèse en gel d'agarose de 1.5% (v/v).

### 11.2.1 Électrophorèse d'ADN

Le gel a été préparé à la concentration désirée, dans un tampon TAE (40 mM Tris-acétate, 1 mM EDTA), avec l'agarose Seakem LE (FMC Bioproducts) auquel est ajouté 1 µg/ml de bromure d'éthidium. Les échantillons à analyser ont été mélangés à un tampon de chargement (0,25% (p/v) bleu de bromophénol, 0,25% (p/v) xylène cyanol FF, 30% (v/v) glycérol) avant d'être déposés dans les puits. Les marqueurs de taille utilisés sont l'ADN du phage lambda digéré par l'enzyme de restriction *Hind* III et l'ADN du phage ØX174 digéré par *Hae* III (Pharmacia). Après migration, les gels ont été photographiés sous illumination ultra-violette (Fotodyne, New Berlin, WI, É-U).

### 11.3 Préparation des bactéries compétentes et transformations

#### 11.3.1 Préparation des bactéries compétentes

Les bactéries compétentes ont été préparées selon le protocole publié par Hanahan (1985). Les souches bactériennes *E. coli* HB101 ou BL21(DE3)pLysS (Novagen, Madison, WI, É-U) ont d'abord été ensemencées sur des pétris contenant 1% (p/v) agar SOB (2% (p/v) bacto tryptone, 0,5% (p/v) extrait de levure, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7,0). Une colonie a été ré-ensemencée dans du milieu SOB liquide et cultivée avec agitation à 37°C jusqu'à ce qu'une densité optique de 0,6 à 600 nm soit obtenue. Les bactéries ont été conservées sur glace pendant 15 min avant d'être centrifugées à 1 000 x g pendant 10 min. Le culot de bactéries a été resuspendu dans le tiers du volume de départ dans du milieu RF1 (30 mM acétate de potassium pH 5,8, 100 mM RbCl, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% (p/v) glycérol) et incubé 45 min (BL21(DE3)pLysS) ou 2 h (HB101) sur glace. Les bactéries ont été centrifugées, le culot resuspendu dans 1/12,5 du volume de départ dans du milieu RF2 (10 mM MOPS pH 6,8, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% (p/v) glycérol), aliquoté en volume de 200 µl et conservé à -80°C.

#### 11.3.2 Transformations bactériennes

L'ADN a été ajouté à 200 µl de bactéries compétentes et le mélange incubé sur glace pendant 45 min. Après un choc thermique de 2 min à 42°C, le mélange a de nouveau été incubé sur glace pendant 2 min. Les bactéries ont ensuite été incubées pendant 1 h à 37°C dans 1 ml de milieu LB (1% (p/v) bacto-tryptone, 0,5% (p/v) extrait de levure, 1% (p/v) NaCl, pH 7,0) pour la souche HB101 et dans 1 ml de milieu ZB (1% (p/v) N-Z-amine A (Gibco), 0,5% (p/v)

NaCl, pH 7,0) pour la souche BL21(DE3)pLysS. Différents volumes de culture bactérienne ont ensuite été étalés sur des pétris contenant 1% (v/v) d'agar préparé avec les milieux précédents respectifs, auxquels a été ajouté 50 µg/ml d'ampicilline. Après une incubation de 12 à 15 h à 37°C, l'ADN des bactéries transformées a été analysé par la méthode alcaline de préparation d'ADN plasmidique (mini-prep; Sambrook *et al.* 1989). Les clones désirés ont été cultivés en milieu liquide et des aliquotes ont été conservées à -80°C en présence de 25% (v/v) glycérol.

#### 11.4 Clonage

Le vecteur pET-3xa (Novagen) a été d'abord digéré par *Bam* HI, les protéines du milieu réactionnel ont été ensuite extraites une fois au PCI et deux fois au chloroforme, et l'ADN précipité à l'éthanol. Les extrémités 5' de 1 à 20 pmol du vecteur digéré ont ensuite été déphosphorylées avec la phosphatase alcaline bactérienne (BAP; BRL, Gaithersburg, MD, É-U). La réaction a été effectuée dans un tampon 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM ZnCl<sub>2</sub> contenant 0,1 U de BAP à 60°C, et arrêtée 30 min plus tard par l'ajout de 0,1% (v/v) SDS et 100 µg/ml de protéinase K. Les protéines ont été extraites au PCI et au chloroforme, et l'ADN précipité à l'éthanol avant d'être dissous dans 20 µl d'eau déionisée. Parallèlement, l'ADN du produit d'amplification, après extraction des protéines et précipitation, a été digéré par *Bam* HI.

La ligation du produit d'amplification avec le vecteur déphosphorylé (rapport molaire 4:1) a été effectuée dans un volume de 20 µl avec un tampon de ligation (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM dithiothréitol, 1 mM ATP et 5 µg/ml de BSA) auquel a été ajouté 8 U de ligase d'ADN du phage T4

(Pharmacia). Le mélange a été incubé 16 h à 14°C. Les bactéries compétentes *E. coli* HB101 ont été transformées avec 2 et 10 µl du mélange de ligation. L'ADN des bactéries recombinantes a été isolé par la technique de mini-prep et analysé par une digestion *Hinf* I ou *Sph* I et ce, dans le but de déterminer l'orientation du fragment cloné dans le vecteur. Un clone, nommé pET-S, dont le produit d'amplification était inséré correctement, a été utilisé pour les expériences d'expression.

### 11.5 Expression

L'ADN plasmidique de pET-S a été utilisé pour transformer des cellules *E. coli* BL21(DE3)pLysS compétentes (voir section 11.3.2). Ces cellules possèdent dans leur chromosome une copie du gène de l'ARN polymérase ADN-dépendante du phage T7 placée sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'isopropylthiogalactopyranoside (IPTG; BRL) (Studier *et al.* 1990). Pour l'expression, une colonie a été ensemencée dans du milieu ZB contenant 50 µg/ml d'ampicilline, 25 µg/ml de chloramphénicol et 1 mM de thiamine. La culture est incubée sous agitation à 37°C jusqu'à ce que la densité optique à 600 nm atteigne 0,6 à 1. À ce moment, 1 mM d'IPTG a été ajouté au milieu de culture pour induire l'expression de la polymérase du phage T7. Les bactéries ont été récoltées deux heures plus tard et centrifugées à 5 000 x g pendant une minute. Le culot bactérien a été resuspendu dans un tampon constitué de 50 mM Tris-HCl pH 8,0, les bactéries ont ensuite été congelées et décongelées une fois et ont été lysées, dans 0,2% (v/v) de Triton X-100, au cours d'une incubation de 40 min sur glace. L'ADN chromosomal bactérien a par la suite été dégradé pendant 30 min à 37°C par l'ajout de 20 µg/ml de DNase A (Sigma) et 30 mM MgCl<sub>2</sub>. Les lysats ont été centrifugés à 10 000 x g pendant 5 min et les

culots resuspendus dans 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA. Les termes "extrait bactérien" réfèrent à cette préparation de protéines exprimées.

## RÉSULTATS

## 1. CARACTÉRISATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX

Avant le début des travaux présentés dans cette thèse, une première fusion avait été effectuée par le personnel du laboratoire suivant le protocole décrit à la section "Matériel et Méthodes". Plusieurs hybridomes sécrétant des anticorps dirigés contre le MHV ont été obtenus. La spécificité de ces anticorps a été déterminée par immunoprécipitation (Daniel et Talbot 1990) et trois hybridomes, 7-10A.13, 4-11G.6 et 1-9F.18, sécrétant des AcMo dirigés contre la glycoprotéine S ont été utilisés pour la suite des travaux. Mentionnons que par immunoempreinte Western des protéines du MHV-A59, aucun de ces AcMo ne reconnaît la glycoprotéine S. Les propriétés biologiques de ces anticorps sont résumées au Tableau II. Ces trois anticorps peuvent neutraliser l'infectivité du MHV-A59 *in vitro*. Par contre, seuls les anticorps 7-10A.13 et 4-11G.6 peuvent inhiber la fusion observée suite à l'infection de cultures cellulaires par le MHV-A59. Ces deux AcMo peuvent également protéger les souris contre une épreuve i.c. avec le MHV-A59. La Figure 5 montre la cinétique de mortalité des souris suite à une épreuve virale. Les souris ayant été injectées i.p. avec 200 µl de liquide d'ascites des hybridomes 7-10A.13 et 4-11G.6 un jour avant l'épreuve ont survécu à l'infection virale tandis que les souris injectées avec l'AcMo 1-9F.18 ont succombé moins de cinq jours après l'épreuve, tout comme les souris témoins ayant reçu du tampon PBS. Finalement, mentionnons que les trois AcMo sont d'isotype IgG 2a.



**TABEAU II**

**Propriétés biologiques d'AcMo spécifiques à la glycoprotéine S**

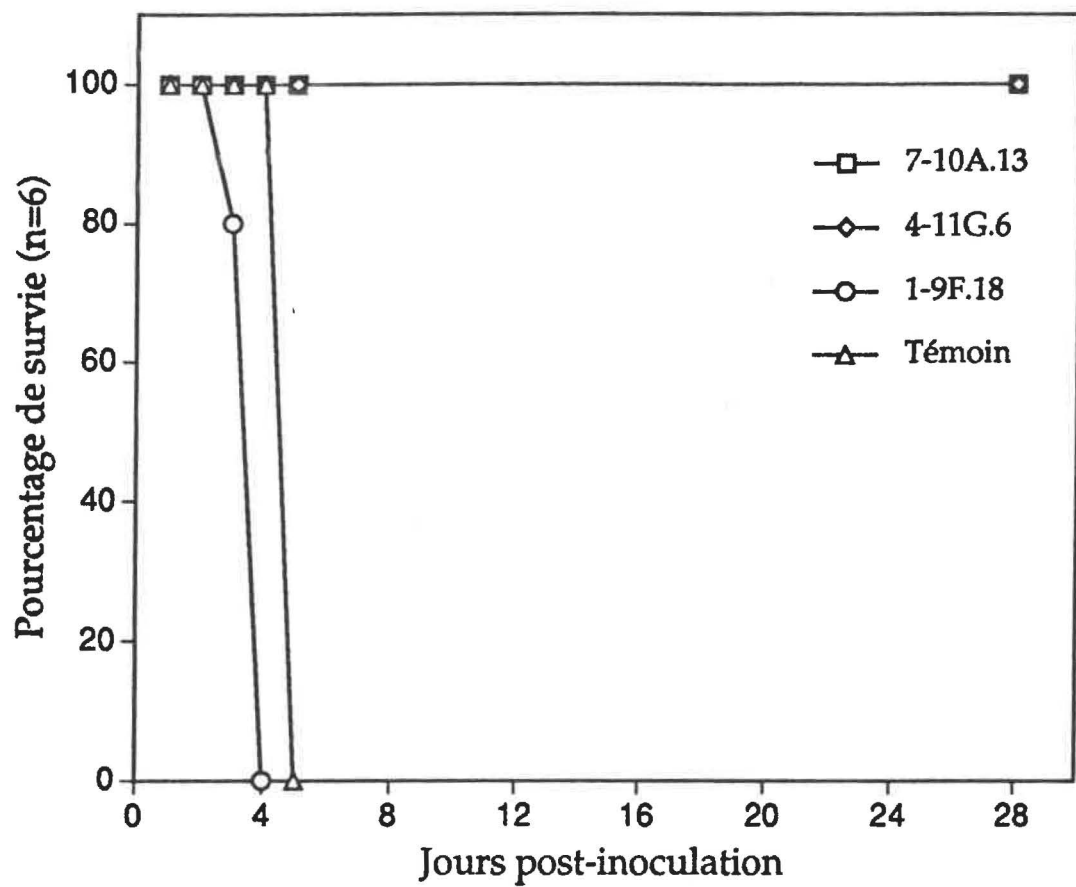
Hybridomes	Neutralisation <sup>a</sup> <i>in vitro</i>		Inhibition de fusion <sup>b</sup>	Protection passive <sup>c</sup> <i>in vivo</i>
	Plages	ECP		
7-10A.13	1-10 x 10 <sup>6</sup>	5-10 x 10 <sup>7</sup>	250	+
4-11G.6	32-64 x 10 <sup>3</sup>	28 x 10 <sup>3</sup>	50	+
1-9F.18	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1.7</sup>	10	-

a Réciproque de la dilution d'ascite neutralisant 50% de l'infectivité virale mesurée par un test de plages (300 à 400 UFP) ou un test DICT (30 à 300 DICT<sub>50</sub>).

b Réciproque de la dilution d'ascite réduisant de 50% la fusion cellulaire observée comparée à un échantillon témoin.

c Protection passive contre une épreuve létale avec le virus MHV-A59. Les souris ont reçu 200 µl i.p. d'ascites un jour avant l'épreuve avec 10 DL<sub>50</sub> (5 x 10<sup>5</sup> UFP i.c.).

**Figure 5:** Protection passive de souris par des anticorps monoclonaux contre une épreuve létale avec le virus MHV-A59. Les souris ont été injectées i.p. avec 200  $\mu$ l d'ascites ou de PBS (Témoin) un jour avant l'épreuve avec 10 DL<sub>50</sub> ( $5 \times 10^5$  UFP) de virus MHV-A59.



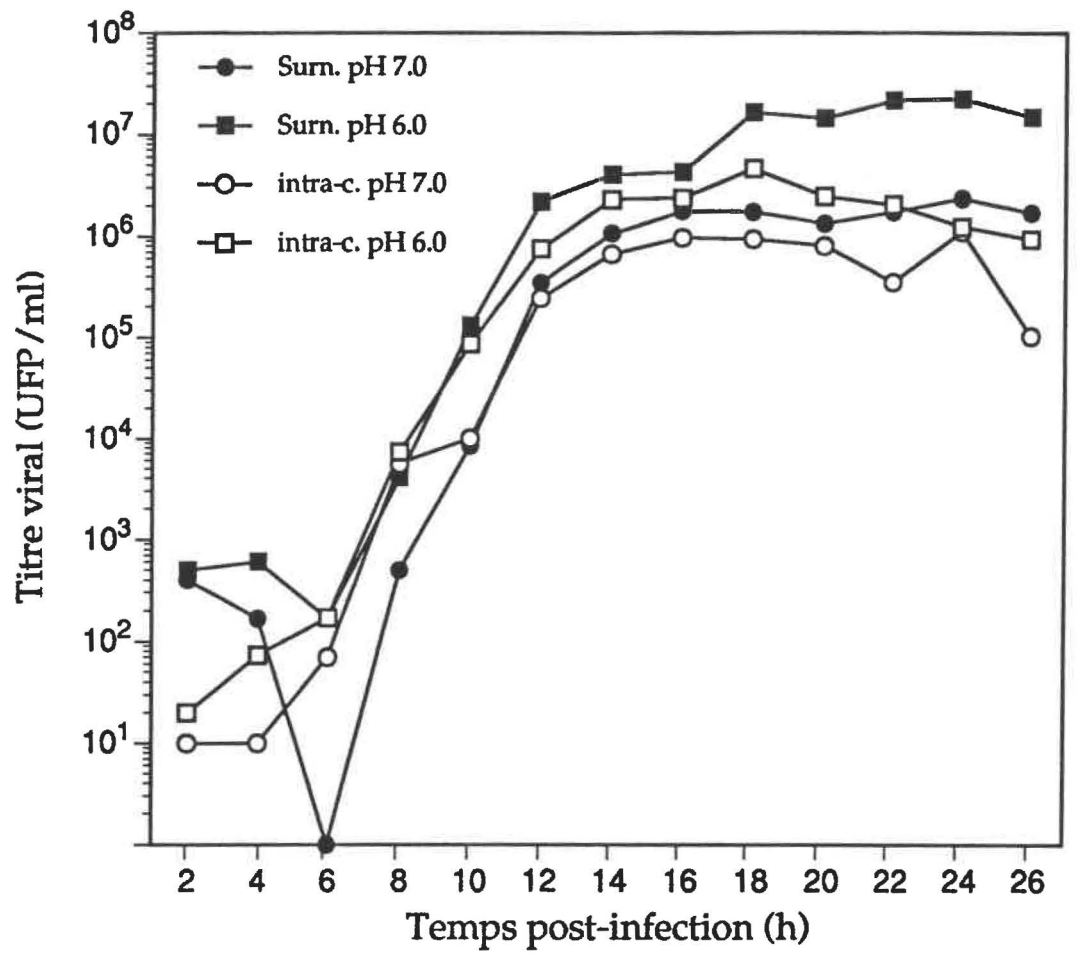
## 2. OPTIMISATION DE LA PRODUCTION VIRALE ET DE L'ANTIGÉNICITÉ DE LA GLYCOPROTÉINE S

Au cours des travaux présentés dans cette thèse, nous avons tenté de comparer la production du virus dans un milieu de culture légèrement acide (pH 6,0) au milieu habituel ayant un pH neutre. Il est à noter que les observations et les améliorations aux protocoles expérimentaux n'ont été appliquées qu'aux expériences portant sur l'identification et la localisation de sites antigéniques (Chapitre 4 et 5 des Résultats).

### 2.1 Effet du pH sur la production du MHV-A59

Des feuillets confluents de cellules DBT de même surface ont été infectés avec la souche MHV-A59 dans un milieu de culture ajusté à pH 6,0 ou 7,0. Le milieu des flacons de culture infectés à chacun des pH a été prélevé à intervalles de deux heures et congelé à -80°C. Les feuillets cellulaires ont été congelés et décongelés à trois reprises dans un volume équivalent de milieu de culture approprié. Les échantillons ont été clarifiés et le titre viral déterminé par test de plages. Les cinétiques de production du virus MHV-A59 à pH 6,0 ou 7,0 sont comparables, les titres optimaux étant atteints entre 16 et 18 h post-infection (Figure 6). Le titre viral des échantillons produits à pH 6,0 est cependant de 5 à 10 fois supérieur à ceux produits à pH 7,0 et ce, tout au long de l'infection.

**Figure 6:** Cinétique de réplication du virus MHV-A59 cultivé à pH 6,0 ou 7,0. Les feuillets de cellules DBT en flacons ont été infectés avec le MHV-A59 dans un milieu de culture à pH 7,0 (●,○) ou pH 6,0 (■,□). Les titres viraux des surnageants de culture (symboles pleins) et intra-cellulaires (symboles vides) ont été évalués à intervalles de deux heures.



## 2.2 Effet du pH sur l'antigénicité de la glycoprotéine S

La qualité des résultats obtenus lors d'une expérience d'immunoempreinte utilisant le virus produit à pH 6,0 nous a amené à comparer les virus produits aux différents pH. Deux AcMo, décrits ultérieurement au Tableau VIII, ont été utilisés pour comparer en immunoempreinte la réactivité de la glycoprotéine S. La réaction des anticorps contre les sous-unités S1/S2 (96 kDa) est beaucoup plus forte avec l'antigène produit à pH 6,0 qu'avec celui produit à pH 7,0 (Figure 7). L'antisérum contre le MHV-A59 réagit également mieux avec le virus produit à pH 6,0, bien que la réaction contre la glycoprotéine S soit faible. Nous pouvons remarquer que cet antisérum réagit en immunoempreinte principalement avec la nucléoprotéine N (50 kDa), suggérant soit une plus grande immunogénicité de cette protéine ou une propriété intrinsèque de posséder plus d'épitopes linéaires.

Pour confirmer que la différence d'antigénicité observée entre les antigènes produits à pH 6,0 et 7,0 n'était pas due à une plus grande quantité de protéines virales, les mêmes quantités d'antigènes utilisés pour l'expérience d'immunoempreinte ont été analysées par électrophorèse et coloration au bleu de Coomassie (Figure 8). Nous avons observé aucune différence importante pour la nucléoprotéine ou la protéine de membrane (23 kDa) entre les échantillons produits à pH 6,0 ou 7,0. De plus, bien que la glycoprotéine S soit difficilement distinguable sur le gel, nous ne pouvons pas mettre en évidence une différence quantitative susceptible d'expliquer la différence de réactivité des anticorps contre les glycoprotéines. La plus forte réactivité des anticorps contre l'antigène produit à pH 6,0 semble donc attribuable à une plus grande

antigénicité de la glycoprotéine S, soit à une plus grande capacité de la protéine à fixer le ligand que constitue l'anticorps.

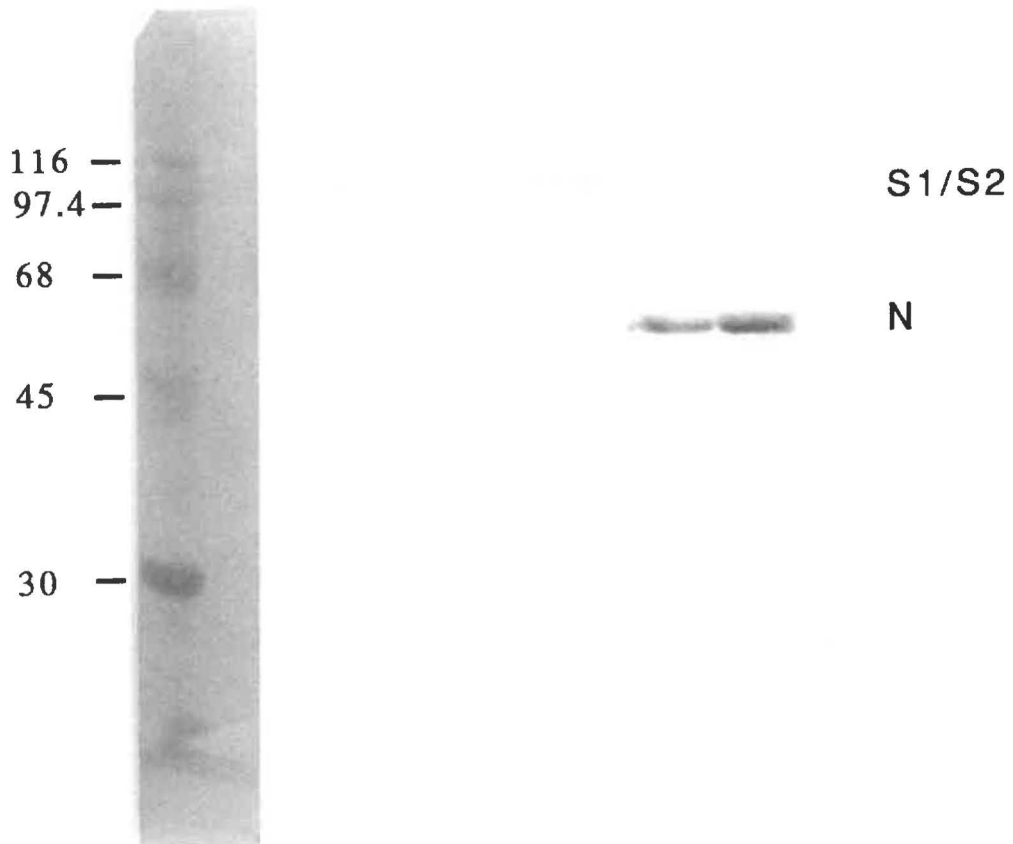
Nous avons également vérifié si cette plus grande antigénicité pouvait être observée avec des épitopes discontinus de la protéine S. L'immunoprécipitation des antigènes viraux produits à pH 6,0 ou 7,0 montre que l'AcMo anti-S et l'antisérum contre le MHV-A59 ont réagi beaucoup plus fortement avec l'antigène produit à pH 6,0 (Figure 9). Il est à noter que l'antisérum contre le MHV-A59 réagit fortement avec la glycoprotéine S en immunoprécipitation mais faiblement en immunoempreinte (Figure 7). La majorité des anticorps spécifiques à la protéine S dans cet antisérum semble donc réagir avec des épitopes discontinus. En assumant que des quantités similaires de glycoprotéines S étaient présentes dans les échantillons produits à pH 6,0 ou 7,0, il semble donc que l'augmentation d'antigénicité de la glycoprotéine S observée s'applique également aux épitopes discontinus. Nous n'avons pas comparé les cinétiques de synthèse des glycoprotéines virales pour les deux échantillons produits. Cependant, étant donné que l'accumulation intracellulaire de virions infectieux est similaire pour les cultures à pH 6,0 et 7,0 (Figure 6), nous prévoyons que les taux de synthèse de protéines doivent être similaires en présumant que l'assemblage et le bourgeonnement des virions ne sont pas les étapes limitantes dans la réplication du virus.

Finalement, la réactivité d'AcMo et de l'antisérum a été comparée en ELISA sur les antigènes produits à pH 6,0 et 7,0. La Figure 10 montre les profils des réactions observées. Les AcMo ont réagi beaucoup plus fortement avec l'antigène produit à pH 6,0, contrairement à l'antisérum dont la réaction contre



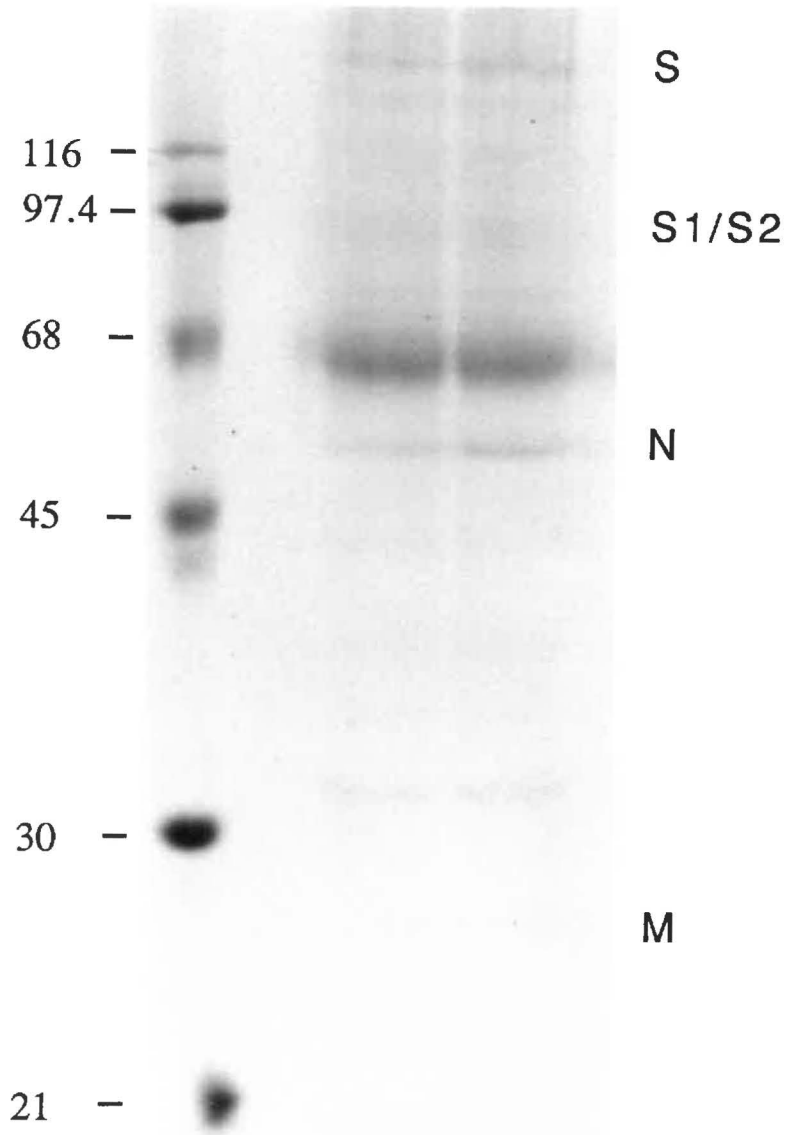
**Figure 7:** Immunoempreinte des protéines virales du MHV-A59 produit à pH 6,0 ou 7,0. Les réactivités d'un sérum hyperimmun dirigé contre le MHV-A59 ( $\alpha$ -A59) et des AcMo 5B19.2 (5B19) et E17 ont été comparées. La migration des marqueurs de masses moléculaires (kDa) est montrée à gauche.

5B19      E17       $\alpha$ -A59  
7 6      7 6      7 6

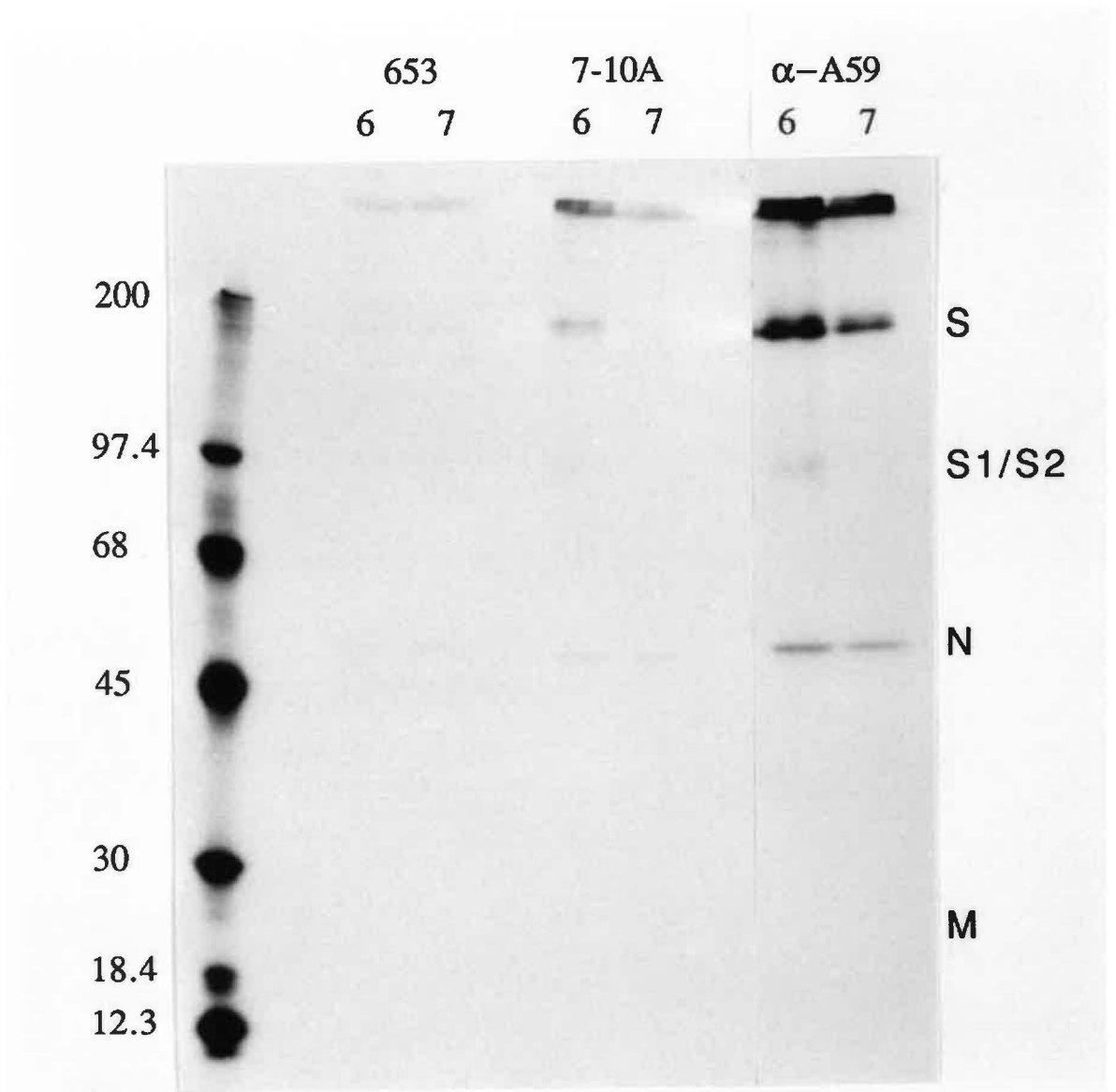


**Figure 8:** Comparaison du profil électrophorétique des virus MHV-A59 produits à pH 6,0 ou 7,0. Les préparations de virus concentrés ont été chargées en quantités égales sur le gel de 10 % (p/v) acrylamide et ont été analysées par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie. La migration des marqueurs de masses moléculaires (kDa) est montrée à gauche et celle des protéines virales, à droite.

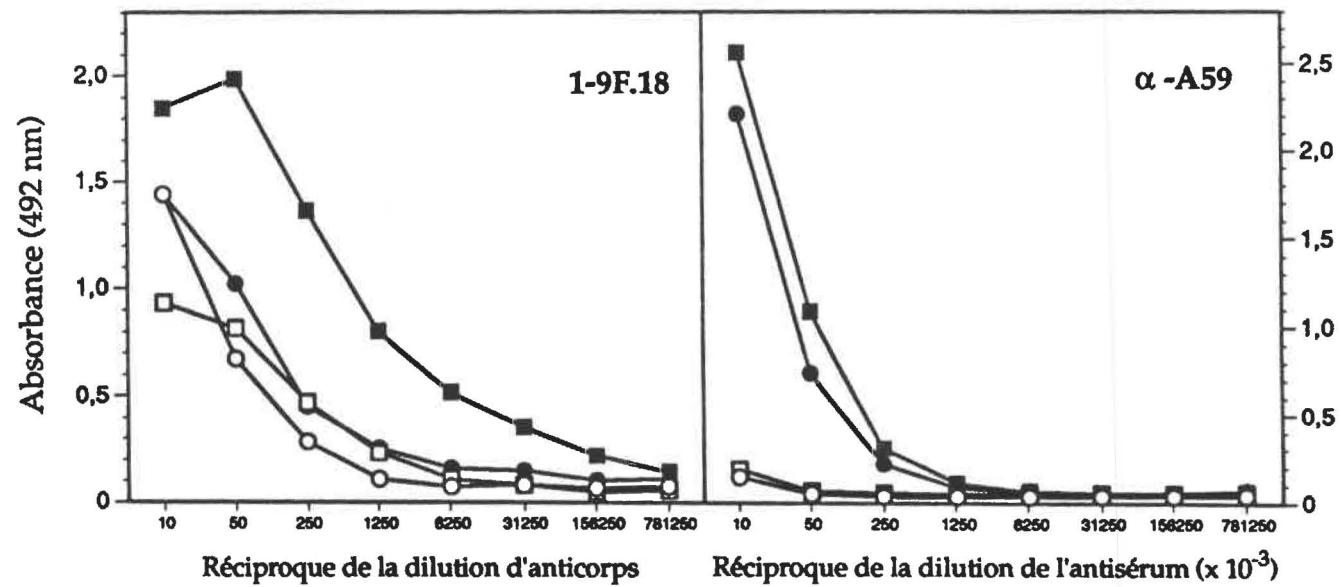
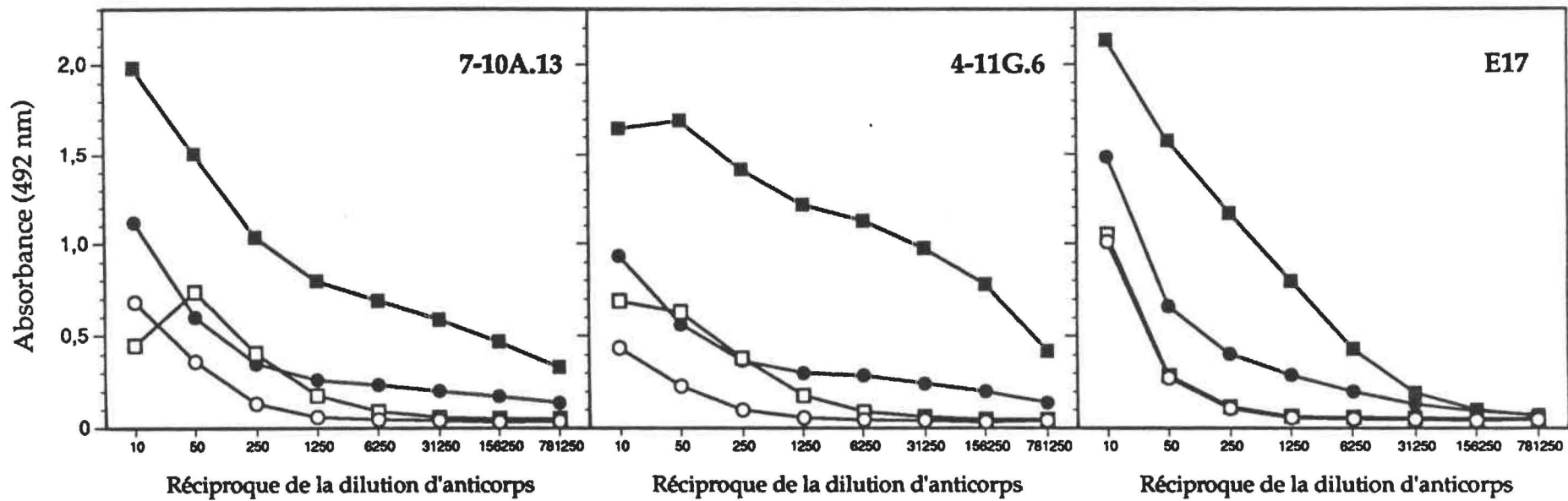
7 6



**Figure 9:** Immunoprécipitation d'antigènes viraux produits à pH 6,0 ou 7,0. Les lysats de cellules infectées par le MHV-A59 et marquées métaboliquement ont été immunoprécipités avec un sérum hyperimmun dirigé contre le MHV-A59 ( $\alpha$ -A59), un AcMo spécifique à la protéine S (7-10A.13) et un ascite témoin produit à partir de cellules myélomateuses (653). Les protéines immunoprécipitées ont été analysées par SDS-PAGE sur un gel en gradient de 7-15% (p/v) acrylamide. La migration des marqueurs de masses moléculaires (kDa) est montrée à gauche et celle des protéines virales, à droite.



**Figure 10:** Réactivité d'anticorps spécifiques au MHV contre l'antigène viral produit à pH 6,0 ou 7,0. Les microplateaux ELISA à 96 puits ont été adsorbés d'un lysat de cellules DBT infectées avec le MHV-A59 (symboles pleins) ou un lysat témoin (symboles vides) produits dans un milieu de culture à pH 6,0 (■,□) ou 7,0 (●,○). La réactivité d'AcMo spécifiques à la protéine S ou d'un sérum hyperimmun spécifique au MHV-A59 ( $\alpha$ -A59) a été ensuite évaluée selon la technique décrite au chapitre Matériel et Méthodes.





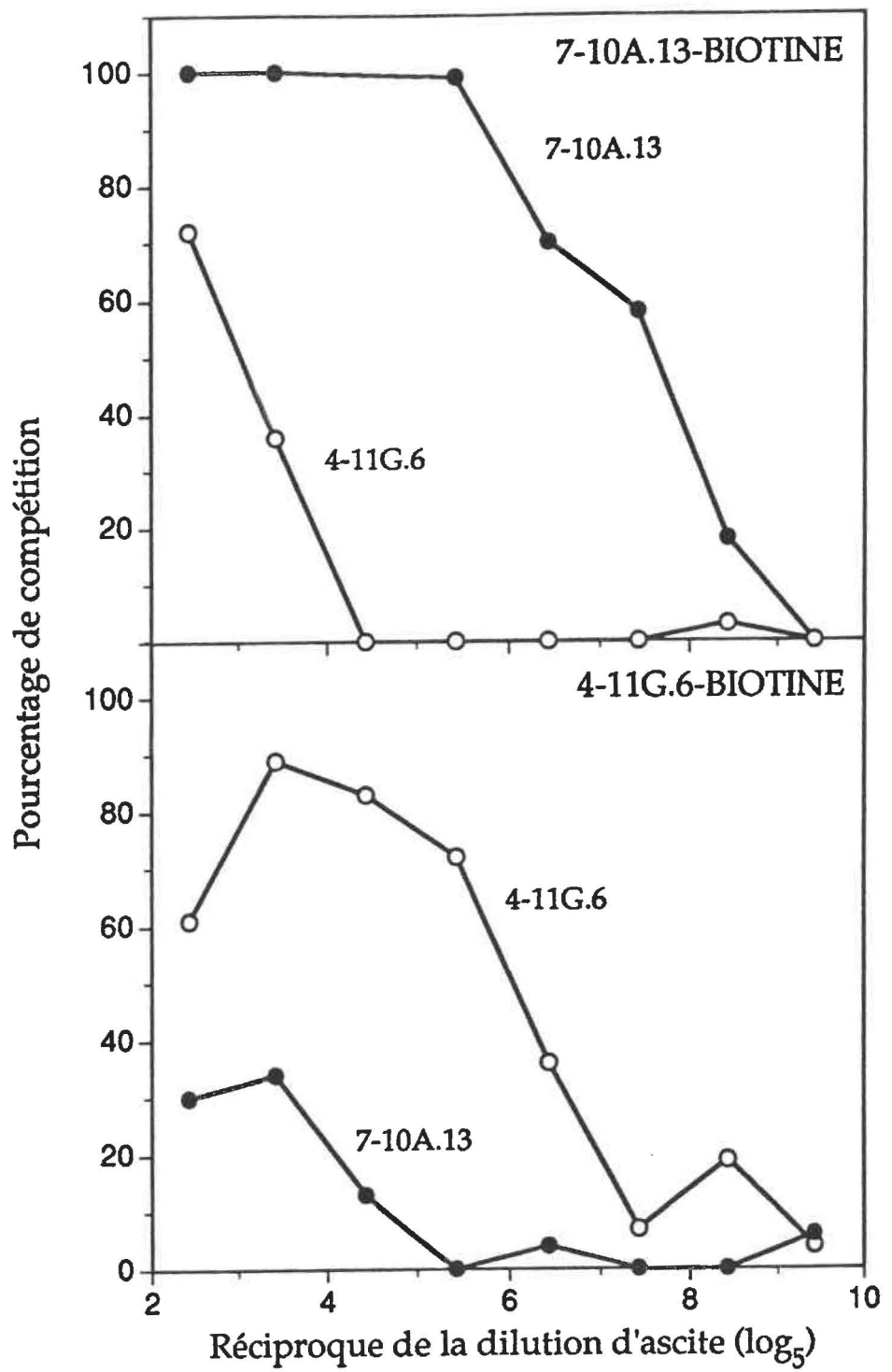
les deux antigènes est similaire. Quantitativement, pour cette expérience, la réactivité de l'anticorps 7-10A.13 a été augmentée de 625 fois, tandis que celle des anticorps 1-9F.18, E17 et 4-11G.6 a été augmentée de 60, 25 et 5 fois respectivement.

### 3. PURIFICATION DE LA GLYCOPROTÉINE S

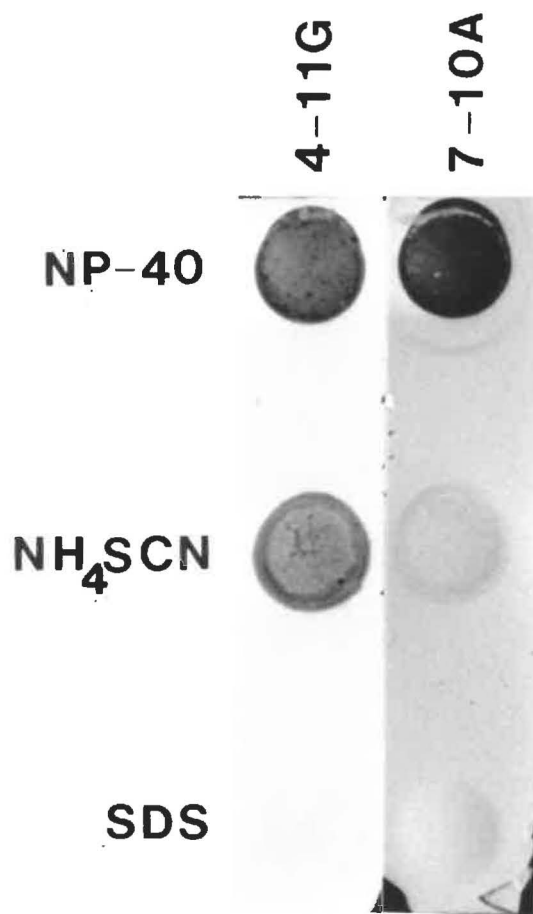
#### 3.1 Caractérisation d'épitopes de la glycoprotéine S

Les propriétés biologiques semblables des AcMo 7-10A.13 et 4-11G.6 nous ont incité à caractériser topographiquement les épitopes reconnus par ces deux anticorps. La compétition partielle observée entre les deux AcMo (Figure 11) suggère qu'ils reconnaissent deux épitopes se chevauchant ou rapprochés sur la structure tertiaire de la protéine. De plus, nous avons évalué la sensibilité de ces épitopes à la dénaturation par l'isothiocyanate et le SDS. La Figure 12 montre la réactivité comparée d'ascites dilués 1/100. La dénaturation par le SDS confirme la nature discontinue des épitopes reconnus par ces deux anticorps. Cependant, l'épitope reconnu par l'AcMo 4-11G.6 est résistant à la dénaturation par l'isothiocyanate, tandis que celui reconnu par l'AcMo 7-10A.13 est sensible au traitement. En résumé, les deux anticorps semblent donc reconnaître deux épitopes discontinus faisant partie d'un même site antigénique. De plus, des expériences effectuées dans le laboratoire du Dr Kathryn Holmes (Uniformed Services of the Health Sciences, Bethesda, MD, É.-U.), employant les deux sous-unités (S1 et S2) de la glycoprotéine S séparées par chromatographie sur colonne d'hydroxylapatite, suggèrent que les deux épitopes seraient situés dans la portion S2 (communication personnelle).

**Figure 11:** Compétition réciproque des AcMo 7-10A.13 et 4-11G.6. Les AcMo biotinylés 7-10A.13 et 4-11G.6 ont été utilisés à une dilution de 1/500 et 1/1000, respectivement. L'inhibition d'attachement (compétition) des anticorps biotinylés suite à une incubation préalable avec des dilutions sérielles d'ascites des hybridomes 7-10A.13 et 4-11G.6 a été évaluée par ELISA de compétition tel que décrit au chapitre Matériel et Méthodes.



**Figure 12:** Sensibilité de la glycoprotéine S à la dénaturation. La réactivité des AcMo 7-10A.13 (7-10A) et 4-11G.6 (4-11G) avec l'antigène viral dénaturé au détergent NP-40, à l'isothiocyanate d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{SCN}$ ) ou au SDS a été évaluée par immunoempreinte ponctuelle tel que décrit au chapitre Matériel et Méthodes.



### 3.2 Efficacité de la méthodologie employée

Un test ELISA fut développé pour évaluer l'efficacité de la méthode de purification de la glycoprotéine S. Ce test est basé sur l'adsorption spécifique de la glycoprotéine S à un premier anticorps fixé au plateau, soit 7-10A.13. La protéine S est ensuite détectée par une incubation avec un second anticorps, 4-11G.6, qui a été biotinylé. Ce test a été mis au point avant les expériences sur la sensibilité à la dénaturation et l'analyse topographique des épitopes reconnus par ces deux anticorps. Étant donné la dénaturation de l'épitope reconnu par l'anticorps 7-10A.13 sur la protéine S purifiée, nous n'avons donc pu établir de courbe standard quantitative pour celle-ci. Le test s'est toutefois avéré utile pour déterminer le rendement relatif aux différentes étapes lors de la purification. Une courbe de quantification relative est présentée à la Figure 13.

La spécificité de l'immunoabsorbant Sepharose-7-10A.13 a été évaluée en utilisant l'antigène viral marqué à la méthionine [<sup>35</sup>S]. Après l'adsorption de l'antigène et plusieurs lavages, les protéines adsorbées au gel ont été éluées dans le tampon d'échantillon d'électrophorèse et analysées par SDS-PAGE et fluorographie. La Figure 14 montre que la forme monomérique de la glycoprotéine S (180 kDa) a été retenue par le gel. La pureté de la protéine a été évalué à 87% par densitométrie sur un spectrophotomètre Beckman DU-8. Deux protéines de masse moléculaire de 96 et 87 kDa ont également été observées. Ces deux protéines pourraient correspondre aux sous-unités de clivage S1 et S2. L'identité exacte de ces deux polypeptides n'a pas été vérifiée. Cependant, il nous apparaît certain, par les expériences présentées dans cette thèse, que les sous-unités S1 et/ou S2 de la glycoprotéine S de la souche MHV-

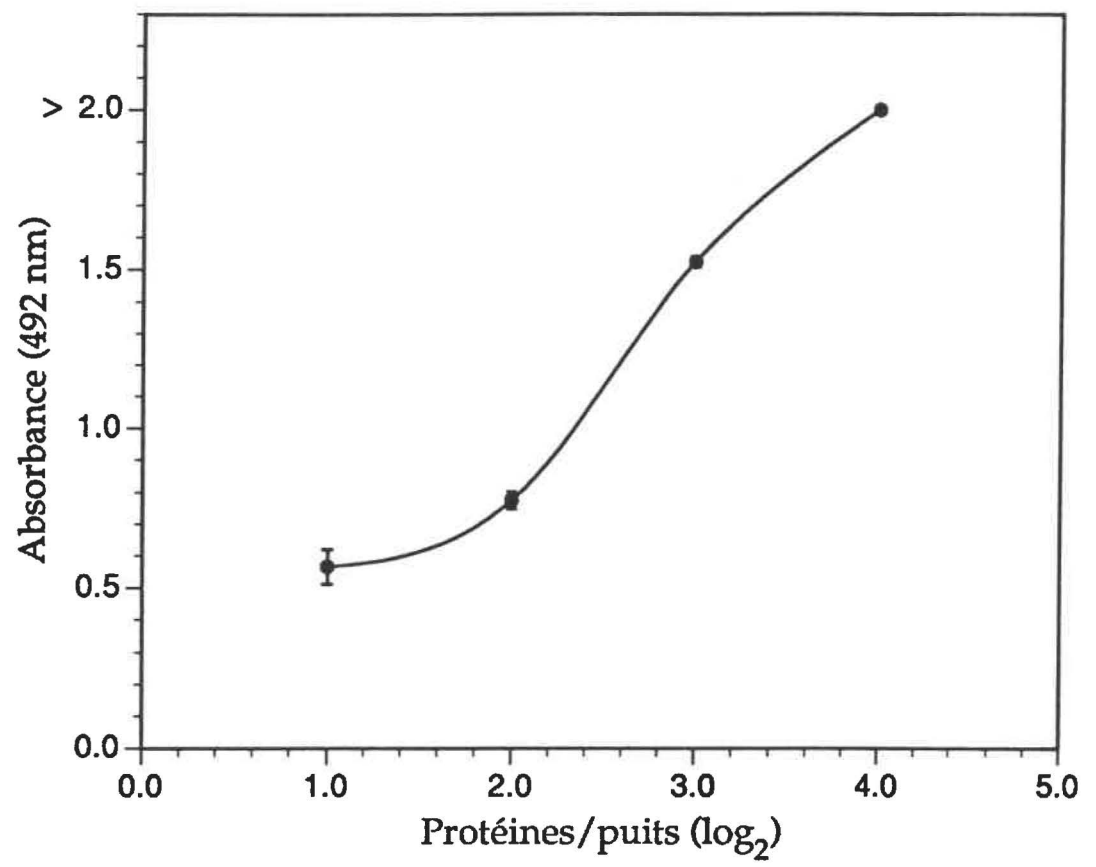
A59 utilisée au laboratoire n'ont pas une masse moléculaire de 90 kDa, tel que généralement admis dans la littérature (Sturman *et al.* 1985). Finalement, nous pouvons remarquer la présence de contaminants, probablement d'origine cellulaire, de masses moléculaires situées entre 27 et 32 kDa.

Ayant démontré la spécificité de l'immunoabsorbant, celui-ci a été utilisé pour purifier, par chromatographie en colonne, la glycoprotéine S nécessaire aux études d'immunogénicité. Environ 30 µg de protéines a été obtenu de 1,8 litres de milieu de culture. La Figure 15 montre l'électrophorèse des fractions combinées d'élution par l'isothiocyanate d'ammonium. On y retrouve principalement la glycoprotéine S sous forme de monomère (180 kDa) et de sous-unités (97 et 88 kDa). Il est à noter qu'aucune autre protéine d'origine virale n'a été détectée, bien qu'on puisse distinguer un contaminant similaire en taille à celui observé précédemment (Figure 14). De plus, deux bandes présentes dans le puit ne contenant que du tampon d'échantillon ont été observées de façon reproductible lors des colorations à l'argent de gels SDS-PAGE. Cet artefact a également été rapporté par d'autres laboratoires (Routledge *et al.* 1988). Il est intéressant de noter que la glycoprotéine S élue suite à la chromatographie en colonne (Figure 15) se retrouve en majeure partie sous forme clivée alors qu'elle est sous forme de monomère lors des expériences d'immunoabsorption (Figure 14).

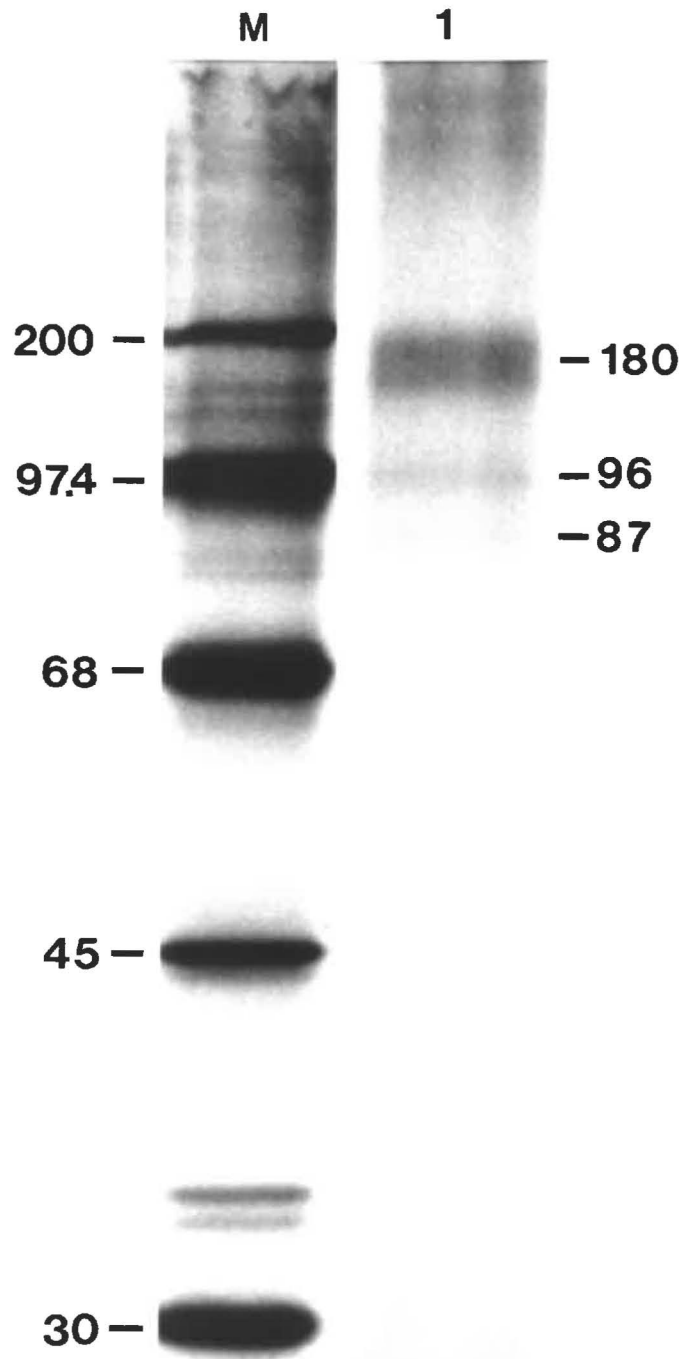
Le rendement obtenu à différentes étapes de la purification a été évalué avec l'ELISA semi-quantitatif. Premièrement, nous avons pu confirmer qualitativement par immunoempreinte ponctuelle qu'une importante quantité de glycoprotéine S restait dans le surnageant après ultra-centrifugation du MHV-A59. La protéine S "libre" est toutefois précipitée de façon efficace par

**Figure 13:** Dosage semi-quantitatif de la glycoprotéine S. La glycoprotéine S contenue dans les échantillons à évaluer à été détectée à l'aide du test de quantification de la protéine S décrit au chapitre Matériel et Méthodes. La figure représente une courbe de réactivité typique, où l'échantillon est dilué de façon sérielle par multiples de 2. La quantité relative de protéine S dans un échantillon par rapport à un autre échantillon est estimée à l'aide de cette courbe.

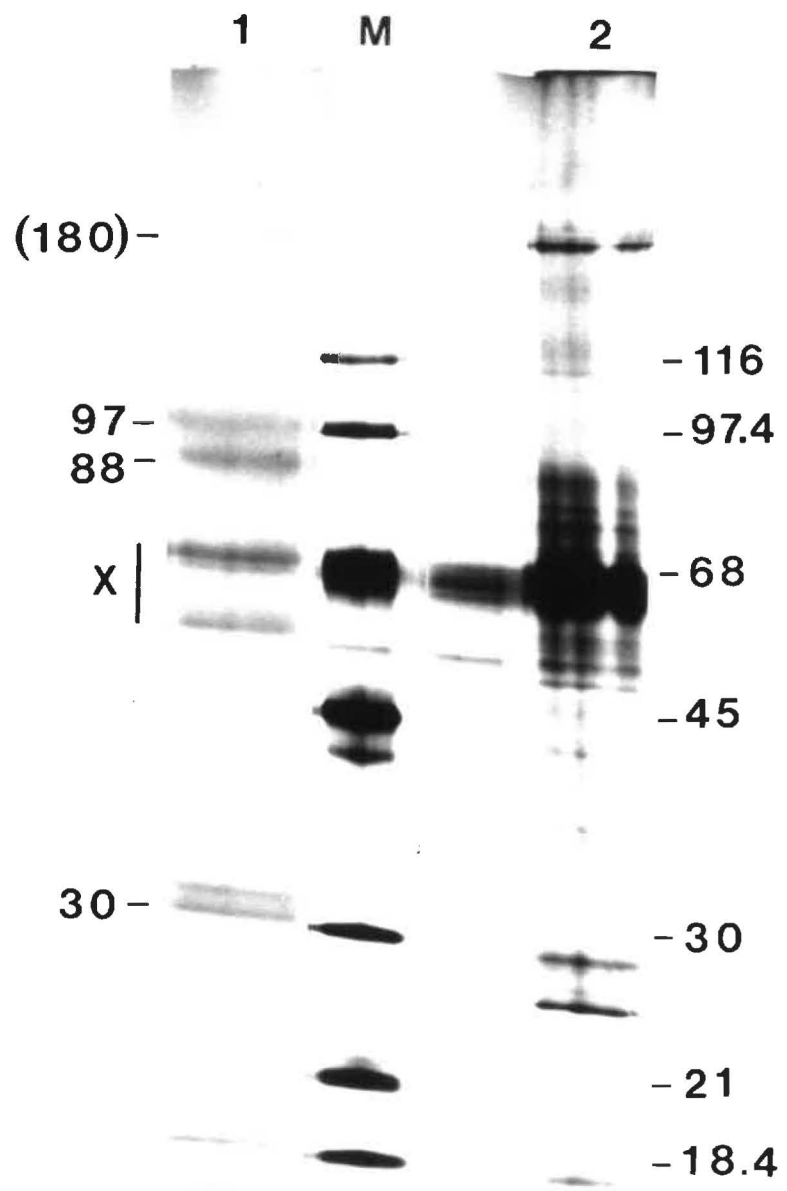




**Figure 14:** Immunoabsorption de l'antigène viral marqué à la méthionine [ $^{35}\text{S}$ ] au gel de Sepharose-7-10A.13. Le puit M montre la migration des marqueurs de masses moléculaires (kDa) et le puit 1 celle des protéines adsorbées au gel. Les marqueurs de masses moléculaires (kDa) sont indiqués à gauche et la masse moléculaire des glycoprotéines S et S1/S2 est indiquée à droite.



**Figure 15:** Analyse par SDS-PAGE et coloration à l'argent de la purification de la glycoprotéine S par chromatographie d'immunoaffinité en colonne. Puits M, marqueurs de masses moléculaires (kDa), indiquées à la droite du gel; puits 1, protéines éluées de l'immunoabsorbant; puits 2, antigène viral concentré utilisé pour la chromatographie. Le puits non-numéroté a été chargé avec le tampon d'échantillon d'électrophorèse et montre la présence d'artefacts de coloration (X). Les masses moléculaires (kDa) des protéines éluées de l'immunoabsorbant sont indiquées à gauche. Il est à noter que la masse moléculaire de 180 kDa est entre parenthèses car il s'agit d'une approximation étant donné que le marqueur le plus élevé avait une masse moléculaire de 116 kDa.



le polyéthylène glycol car elle ne peut plus être détectée par immunoempreinte dans le surnageant. Elle est donc présente dans l'antigène utilisé pour la chromatographie. De plus, nous avons estimé que seulement 66% de la glycoprotéine S du MHV-A59 pouvait être solubilisée par le détergent NP-40. L'emploi du détergent Triton X-100 ou l'ajout de 1% (v/v) désoxycholate de sodium au NP-40 n'ont pas permis d'obtenir de meilleurs résultats. Finalement, le test a été employé pour confirmer l'efficacité de l'adsorption de la protéine S au gel de Sepharose-7-10A.13 en s'assurant de l'absence de protéine S dans la fraction de protéines non-adsorbées au gel.

### 3.3 Immunogénicité de la protéine purifiée

Les expériences d'étude de l'immunogénicité de la glycoprotéine S purifiée ont été réalisées trois fois et ont donné des résultats similaires au niveau de l'induction d'anticorps neutralisants. Pour la première expérience, seulement trois souris ont été immunisées à deux reprises avec 1 µg de glycoprotéine purifiée émulsifiée dans l'adjuvant de Freund et celles-ci ont survécu à l'épreuve virale, contrairement aux souris témoins ayant été injectées avec le tampon phosphate. Dans la seconde expérience, des groupes de 10 souris ont été immunisées avec 1 µg de protéine purifiée émulsifiée dans l'adjuvant de Freund ou 1 µg de protéine sans adjuvant. D'autres groupes ont été immunisés avec 1 µg d'hémagglutinine du virus influenza (don du Dr Jit Arora) avec ou sans adjuvant. Un autre groupe a été immunisé avec les protéines non-adsorbées au gel dans l'adjuvant de Freund, et finalement, deux groupes ont été immunisés avec le tampon phosphate émulsifié dans l'adjuvant de Freund ou le tampon phosphate seul. Des plasmas neutralisants et inhibant la fusion n'ont été induit que par le groupe de souris immunisées avec la glycoprotéine S

purifiée dans l'adjuvant (Tableau III). Les plasmas des souris immunisées avec la protéine S sans adjuvant et les protéines non-adsorbées n'ont montré aucune activité biologique. Malheureusement, l'effet protecteur de la glycoprotéine S n'a pu être reconfirmé lors de cette expérience car une dose insuffisante de MHV-A59 a été injectée pour l'épreuve.

Pour la troisième expérience, un groupe de huit souris BALB/c a été immunisé avec 1 µg de glycoprotéine S purifiée dans l'adjuvant de Freund et un autre groupe a été immunisé avec le tampon TMEN dans l'adjuvant. Le Tableau IV résume les activités biologiques des plasmas prélevés lors de cette expérience. Des titres de neutralisation de 1/1 600 par test de plages et de 1/230 par ECP ont été obtenus avec le plasma des souris immunisées avec la protéine S purifiée. Une activité d'inhibition de fusion a également été détectée pour ce plasma. Finalement, les souris immunisées avec la glycoprotéine S ont survécu à une épreuve létale avec le virus MHV-A59. La Figure 16 représente la cinétique de mortalité des souris suite à l'épreuve virale. Les souris témoins immunisées avec le tampon TMEN meurent en moins de cinq jours, contrairement à celles immunisées avec la protéine S, bien que des signes cliniques d'infection (dos voûté, poils hérissés, hyper-irritabilité) aient été observés les premiers jours suivant l'épreuve. La compétition observée entre le plasma de souris immunisées avec la protéine S et l'AcMo 4-11G.6 biotinylé (Figure 17) suggère que l'épitope reconnu par cet anticorps a conservé sa structure et son antigénicité sur la protéine purifiée. De plus, l'absence de compétition entre le plasma et l'AcMo 7-10.13 confirme la dénaturation de l'épitope reconnu par ce dernier.

**TABLEAU III**

**Propriétés biologiques des plasmas de souris immunisées avec la glycoprotéine S purifiée**

Immunisation <sup>a</sup>	Jours post-immunisation	Neutralisation <sup>b</sup> <i>in vitro</i>	Inhibition de fusion <sup>c</sup>
S-AF	0	<15	N.D. <sup>d</sup>
	38	200	40
S-TMEN	38	<15	10
HA-AF	38	<15	10
HA-TMEN	38	<15	10
N.A.-AF <sup>e</sup>	38	<15	10
TMEN-AF	38	<15	10
TMEN	38	<15	10

a Dix souris BALB/c ont été immunisées i.p. avec 1 µg de protéine S purifiée ou d'hémagglutinine (HA) du virus influenza au jour 0 et au jour 25. Les antigènes ont été émulsifiés dans l'adjuvant complet (jour 0) ou incomplet (jour 25) de Freund (AF) ou dilués dans un volume équivalent de tampon TMEN.

b Réciproque de la dilution de plasma neutralisant 50% de l'infectivité virale mesurée par un test de plages (300 à 400 UFP).

c Réciproque de la dilution de plasma réduisant de 50% la fusion cellulaire observée comparée à un échantillon témoin.

d N.D. : Non déterminé

e N.A. : Protéines non-adsorbées au gel de Sepharose-7-10A.13



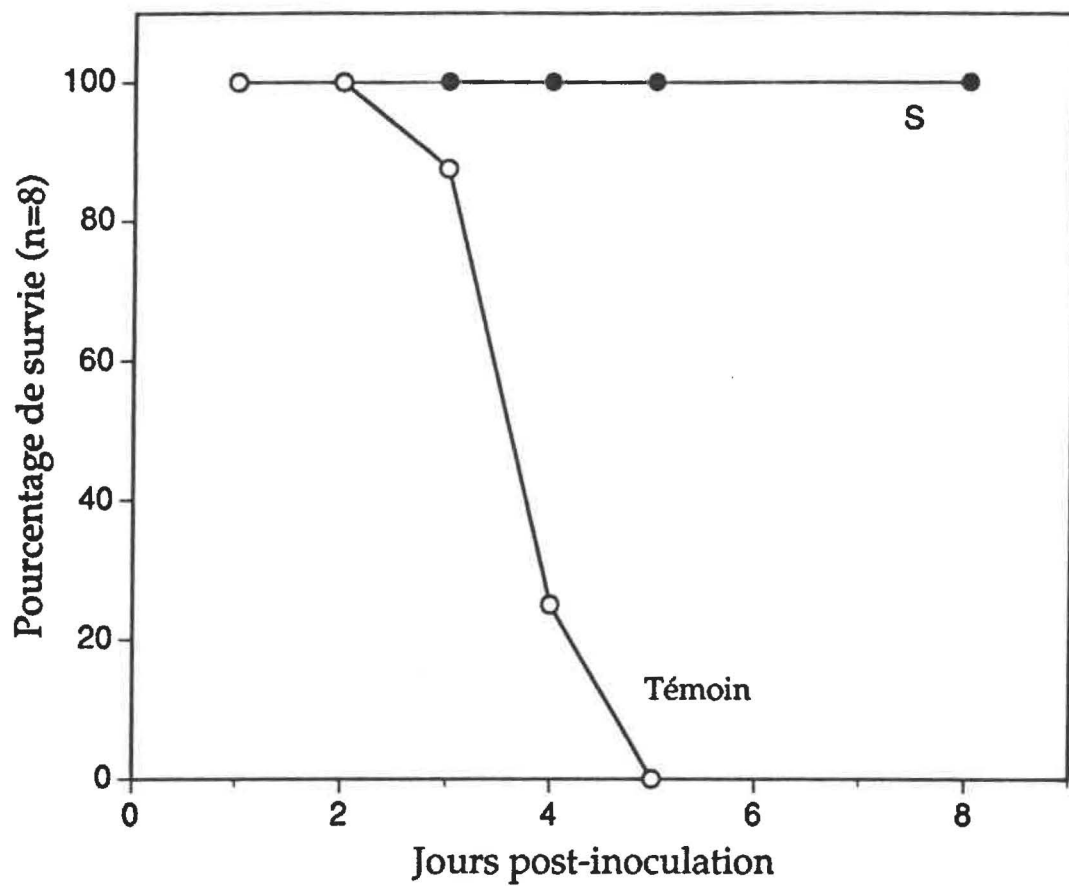
TABLEAU IV

Propriétés biologiques des plasmas de souris immunisées avec la glycoprotéine S purifiée

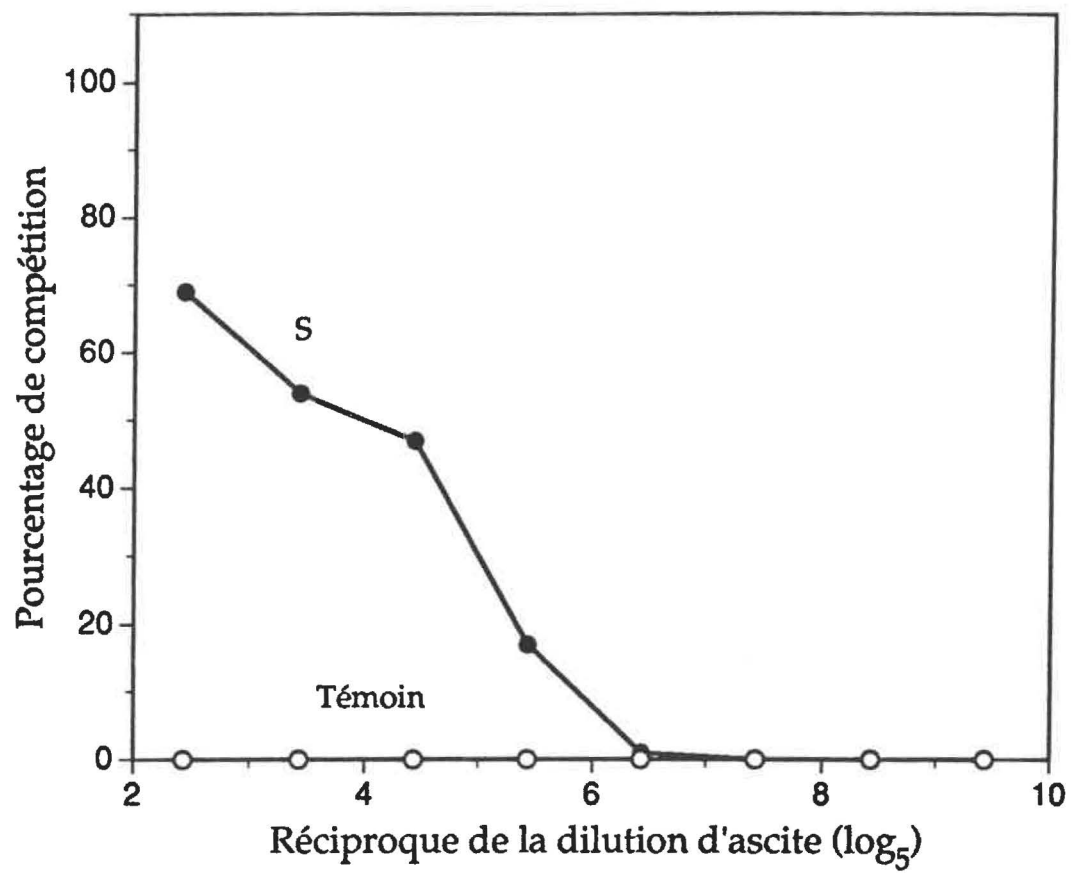
Immunisation <sup>a</sup>	Jours post-immunisation	Neutralisation <sup>b</sup> <i>in vitro</i>		Inhibition de fusion <sup>c</sup>	Protection passive <sup>e</sup> <i>in vivo</i>
		Plages	ECP		
S	0	<15	<15	N.D. <sup>d</sup>	
	40	1 600	230	40	7/7
TMEN	0	<15	<15	N.D.	
	40	<15	<15	10	0/8

- a Huit souris BALB/c ont été immunisées i.p. avec 1 µg de protéine S purifiée dans l'adjuvant de Freund au jour 0 et au jour 25.
- b Réciproque de la dilution de plasma neutralisant 50% de l'infectivité virale mesurée par un test de plages (300 à 400 UFP) ou un test DICT (30 à 300 DICT<sub>50</sub>).
- c Réciproque de la dilution de plasma réduisant de 50% la fusion cellulaire observée comparée à un échantillon témoin.
- d N.D. : Non déterminé
- e Protection passive contre une épreuve avec 10 DL<sub>50</sub> (5 x 10<sup>5</sup> UFP i.c.) du virus MHV-A59. Une souris immunisée avec la protéine S est morte avant l'épreuve.

**Figure 16:** Protection de souris BALB/c par vaccination avec la glycoprotéine S purifiée. Des groupes de huit souris ont été immunisées à deux reprises avec la glycoprotéine S purifiée (S) ou du tampon TMEN (Témoin). Ces souris ont ensuite subi une épreuve i.c. avec 10 DL<sub>50</sub> de MHV-A59 ( $5 \times 10^5$  UFP).



**Figure 17:** Inhibition de fixation de l'AcMo 4-11G.6 par le plasma anti-S. Le pourcentage de compétition représente l'inhibition de fixation à l'antigène viral de l'AcMo biotinylé 4-11G.6 (1/1000) par des dilutions sérielles du plasma des souris immunisées avec la protéine S purifiée.



## 4. IDENTIFICATION DE SITES ANTIGÉNIQUES SUR LA GLYCOPROTÉINE S

### 4.1 Analyse de séquence et sélection de peptides

La séquence publiée de la glycoprotéine S du virus MHV-A59 (Luytjes *et al.* 1987) a été analysée selon les algorithmes décrits à la section "Méthodes" (Sections 10.1 et 10.2). De ces profils de prédiction (Figures 18), 13 peptides ont été sélectionnés pour synthèse. Deux peptides déjà disponibles au laboratoire, les peptides MHV1 et MHV2, ont été inclus dans ces expériences. Les critères de sélection des peptides ont été principalement: l'importance relative du "pic" par rapport au profil général, la localisation du peptide sur la structure primaire de la protéine et la structure secondaire prédite pour la région déterminée. Par exemple, le peptide #1 a été sélectionné pour vérifier s'il aurait pu correspondre à l'épitope reconnu par l'AcMo 5B19.2 car il avait été suggéré que les épitopes importants pour la neutralisation et la protection étaient situés dans le tiers carboxy-terminal de la protéine (Makino *et al.* 1987). La séquence des peptides sélectionnés de même que leurs principales caractéristiques sont indiqués au Tableau V. Le choix de l'albumine sérique bovine comme molécule porteuse, au lieu du KLH utilisé lors d'expériences précédentes au laboratoire, a été motivé par la mise en évidence d'une réaction croisée avec l'antisérum dirigé contre le MHV (résultats non-montrés) et d'une protection partielle induite par le KLH (Talbot *et al.* 1988). Ces observations auraient pu rendre difficile l'interprétation de résultats litigieux.

**TABLEAU V**

**Peptides synthétiques sélectionnés**

Peptides <sup>a</sup>	Position	Séquence en acides aminés <sup>b</sup>	Principales caractéristiques
1	1156-1170 (16-mer)	(C)-T-G-S-S-Y-Y-Y-P-E-P-I-T-D-K-N N	Pic majeur selon Emini; hypothèse que ce site pourrait correspondre à l'épitope reconnu par l'AcMo 5B19.2
2	441-458 (18-mer)	Y-N-P-S-S-W-N-R-R-Y-G-F-K-V-N-D-R-C N-D-A-G-Y-F	Peptide dont la séquence chevauche l'extrémité N-terminale de la délétion observée chez la souche MHV-JHM. Exceptionnellement, les acides aminés indiqués sous la séquence du peptide 2 correspondent à ceux présents chez MHV-A59 et MHV-4
3	485-499 (15-mer)	D-I-V-S-P-C-T-T-Q-T-K-P-K-S-A A S M	Pic maximum selon Emini
4	761-775 (15-mer)	E-E-F-I-Q-T-R-S-P-K-V-T-I-D-C I A	Pic majeur selon Emini
5	165-176 (12-mer)	C-K-P-N-T-N-G-N-K-L-I-G R-V	Pic maximum selon Karplus et Schultz et majeur selon Parker et Hodges, Hopp et Kyte et Doolittle

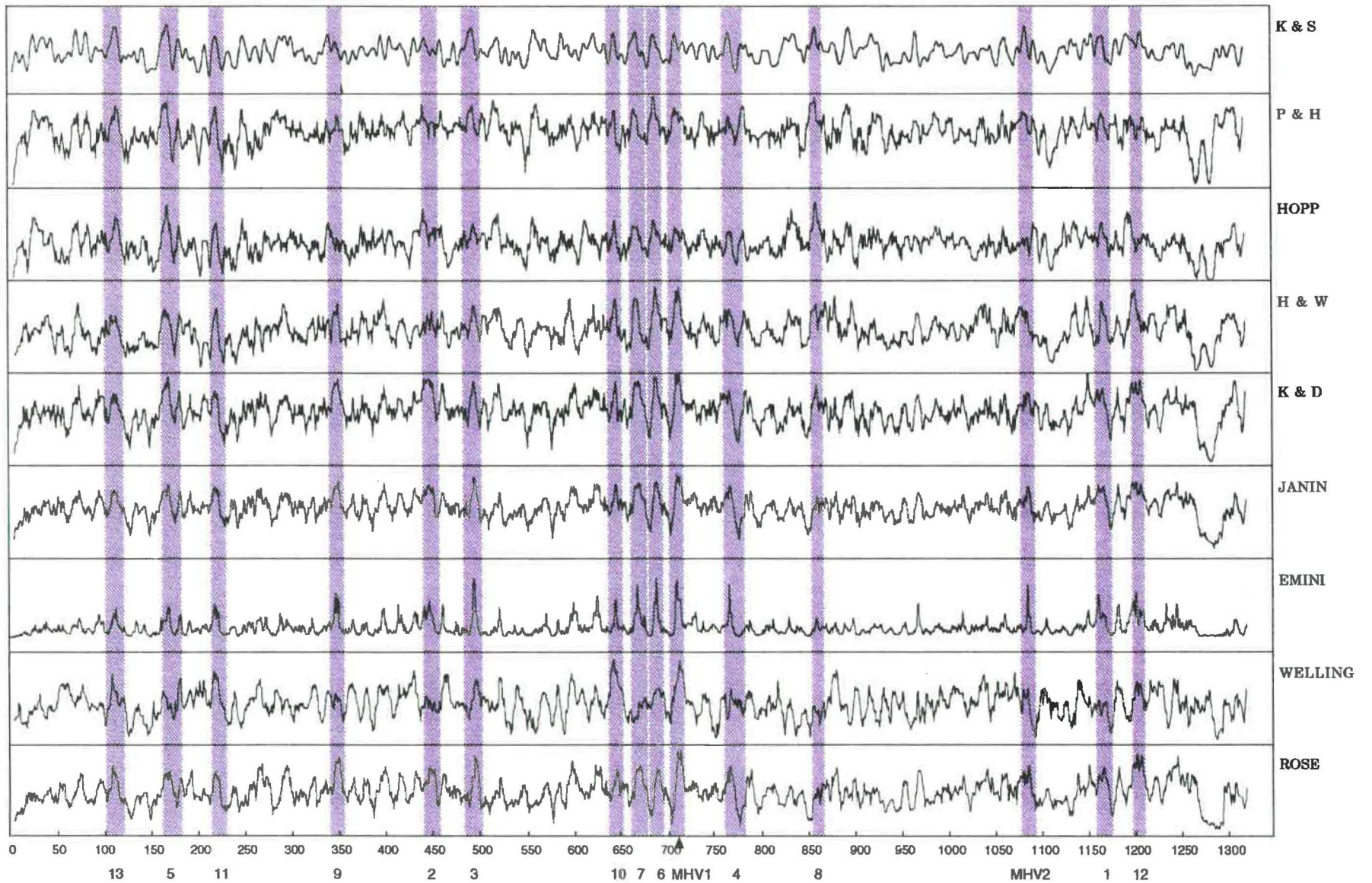
6	682-694 (13-mer)	C-V-V-N-A-D-N-R-T-D-E-A-L	Pic maximum selon Parker et Hodges et Hopp et Woods et majeur selon Emini
7	663-675 (14-mer)	(C)-S-N-N-I-S-R-E-E-N-P-L-N-Y T	Pic majeur selon Kyte et Doolittle, Janin, Emini, et Rose
8	856-866 (11-mer)	C-A-E-D-G-N-G-P-S-A-I	Pic maximum selon Hopp et majeur selon Karplus et Schultz, Parker et Hodges
9	343-354 (12-mer)	P-L-N-W-E-R-K-T-F-Q-N-C R	Pic majeur selon Kyte et Doolittle, Janin, Emini et Rose
10	633-648 (16-mer)	C-Y-S-G-R-V-S-A-A-F-H-K-D-A-P-E Y E	Pic maximum selon Welling et majeur selon Kyte et Doolittle et Emini
11	217-227 (12-mer)	Y-A-D-K-P-S-A-T-T-F-L-(C)	Pic majeur selon Parker et Hodges et Welling
12	1198-1208 (12-mer)	D-F-K-E-E-L-D-K-W-F-K-(C)	Pic majeur selon Hopp et Woods, Kyte et Doolittle, Emini et Rose
13	106-120 (16-mer)	(C)-A-K-V-Q-N-L-K-T-S-T-P-S-G-A-T N T	Pic majeur selon Karplus et Schultz, Parker et Hodges, Welling et Rose



MHV1	617-629 (13-mer)	C-V-D-Y-S-K-S-R-R-A-R-R-S H	Pic maximum selon Hopp et Woods, Kyte et Doolittle, Janin, Welling et Rose; peptide dont la séquence est déduite de celle du MHV-JHM et chevauchant le site de clivage
MHV2	993-1002 (10-mer)	C-V-K-S-Q-T-T-R-I-N	Pic majeur selon Karplus et Schultz, et Emini; peptide dont la séquence est déduite de celle du MHV-JHM

- a Tous les peptides, à l'exception des peptides 2, MHV1 et MHV2, sont déduits de la séquence de la glycoprotéine S du MHV-A59 (Luytjes *et al.* 1987) et de la numérotation correspondante en acides aminés. Les peptides MHV1 et MHV2 ont été sélectionnés après l'analyse de la séquence nucléotidique de la glycoprotéine S du virus MHV-JHM (Talbot *et al.* 1988).
- b Les substitutions d'acides aminés pour la glycoprotéines S de la souche MHV-4 (Parker *et al.* 1989b) sont indiquées en italiques sous la séquence du peptide. Le caractère "(C)" est utilisé pour signifier l'ajout d'une cystéine nécessaire au couplage et le caractère "N" est utilisé pour signifier un site potentiel de N-glycosylation sur la structure primaire de la protéine.

**Figure 18:** Analyse de la séquence nucléotidique du gène de la glycoprotéine S du MHV-A59 à l'aide d'algorithmes de prédiction d'épitopes. Les algorithmes de Karplus et Schultz (K & S), Parker *et al.* (P & H), Hopp, Hopp et Woods (H & W), Kyte et Doolittle (K & D), Janin, Emini *et al.*, Welling *et al.* et Rose *et al.* ont été utilisés tel que décrit au chapitre Matériel et Méthodes. Les numéros des peptides sont indiqués au bas de la figure et le symbole ▲ indique le site de clivage de la protéine S en sous-unités S1 et S2.



## 4.2 Immunogénicité des peptides synthétiques

Des groupes de 10 souris BALB/c ont été immunisés avec 50 µg des peptides couplés au BSA et émulsifiés dans l'ACF lors de la première injection et dans l'AIF lors du rappel (jour 21). Des groupes témoins ont été injectés avec le tampon PBS dans l'adjuvant de Freund. Au jour 40, les souris ont été injectées i.c. avec 10 DL<sub>50</sub> de MHV-A59. Aucun des peptides n'a protégé les souris de l'épreuve virale (Tableau VI). Le titre anti-peptide élevé des plasmas prélevés avant l'épreuve nous indique que les peptides couplés ont été très immunogéniques, à l'exception des peptides 8 et 12 dont les titres sont inférieurs à 5 000. Cependant, aucune activité de neutralisation du virus MHV-A59 n'a été détectée pour ces plasmas. La réactivité des plasmas contre la glycoprotéine S, qu'elle soit sous forme native ou dénaturée, a été vérifiée par la technique d'immunoprécipitation et d'immunoempreinte, respectivement. Aucun des plasmas n'a été capable d'immunoprécipiter la glycoprotéine S ou les polypeptides S1/S2. Néanmoins, les plasmas dirigés contre les peptides 1, 4 et 12 réagissent spécifiquement en immunoempreinte avec une protéine de masse moléculaire de 96 kDa, correspondant à celle du polypeptide S2 (Figure 19). De plus, il nous a été impossible de démontrer par ELISA une réactivité spécifique des plasmas anti-peptides contre l'antigène viral à cause du bruit de fond élevé causé par la réaction des anticorps dirigés contre le BSA, celui-ci étant adsorbé de façon équivalente sur les membranes cellulaires présentes dans l'antigène viral et l'antigène témoin.

Il avait été démontré par Talbot *et al.* (1988) que le peptide MHV-2 couplé au KLH (MHV2/KLH) pouvait induire la production d'anticorps neutralisants.

Les résultats négatifs obtenus avec le peptide MHV2 couplé au BSA (MHV2/BSA), de même que les résultats décevants obtenus avec les nouveaux peptides sélectionnés, nous ont incité à comparer l'immunogénicité de peptide MHV-2 couplé au BSA ou au KLH. De plus, au cours de ces travaux, l'épitope reconnu par l'AcMo 5B19.2 (épitope A) a été localisé sur la structure primaire de la glycoprotéine S du MHV-A59 entre les acides aminés 848 à 856 (Luytjes *et al.* 1989). Un peptide, dénommé peptide A, homologue aux acides aminés 846 à 858 et dont la séquence est NH<sub>2</sub>-S-P-L-L-G-C-I-G-S-T-C-A-E-COOH a été synthétisé. L'immunogénicité du peptide A couplé au BSA (peptide A/BSA) ou au KLH (peptide A/KLH) a également été comparée. Les titres ELISA anti-peptides montrent que pour le peptide MHV2, le titre du plasma des souris immunisées avec le peptide couplé au BSA est cinq fois supérieur au titre obtenu avec le peptide couplé au KLH, tandis que ce dernier semble être un meilleur porteur pour le peptide A (Tableau VII). Aucun de ces peptides couplés n'a induit d'anticorps neutralisants. Toutefois, les souris immunisées avec le peptide A/KLH ont été protégées de l'épreuve virale avec le MHV-A59. Bien que le nombre de souris immunisées avec le peptide A/KLH n'ait été que de cinq, l'observation quotidienne des signes cliniques d'infection, moins sévères chez ce dernier groupe, confirme l'effet protecteur du peptide. De plus, la réactivité des plasmas figurant au Tableau VII a été analysé par immunoempreinte. Seul le plasma des souris immunisées avec le peptide A/KLH réagit contre la glycoprotéine S du MHV-A59 (Figure 20).

Nous avons également comparé l'efficacité des plasmas anti-peptide A/KLH et anti-peptide A/BSA à inhiber la fixation des AcMo 5B19.2 et E17 (voir section 5.3) au peptide A. Une dilution de 20 fois du plasma anti-peptide



A/BSA inhibe de 50% la fixation de l'AcMo E17, tandis qu'il faut diluer celui du peptide couplé au KLH jusqu'à plus de 280 fois pour obtenir une telle inhibition (Figure 21). Les dilutions nécessaires pour obtenir une inhibition de 50% de l'anticorps 5B19.2 sont de 38 fois pour le plasma anti-peptide A/BSA et de 2700 fois pour le plasma anti-peptide A/KLH. Ces différences de titres excèdent de beaucoup les différences de titres anti-peptides observées entre les deux plasmas (Tableau VII). L'effet protecteur du peptide couplé au KLH, la réactivité en immunoempreinte et l'efficacité de compétition démontrent une différence d'immunogénicité entre le peptide couplé au KLH ou au BSA.

### 4.3 Antigénicité des peptides synthétiques

Parallèlement aux travaux précédents, nous avons déterminé la réactivité d'une banque d'AcMo disponibles au laboratoire contre les 15 peptides synthétiques. L'origine et les principales caractéristiques des AcMo utilisés sont résumées au Tableau VIII. Les activités biologiques déterminées pour ces anticorps sont la neutralisation *in vitro*, l'inhibition de la fusion cellulaire induite par l'infection virale et la protection passive *in vivo*. De plus, certains des AcMo utilisés ont été caractérisés par ELISA de compétition. Les AcMo provenant du laboratoire du Dr Wege reconnaissent six sites antigéniques topographiquement distincts, désignés par les lettres A à F (Wege *et al.* 1984). Les AcMo produits dans le laboratoire du Dr Buchmeier (Collins *et al.* 1982) ont été assignés à cinq sites antigéniques, désignés A à E (Talbot *et al.* 1984b; Talbot et Buchmeier 1985). La réactivité de certains de ces AcMo contre les sous-unités S1 et S2, séparées par chromatographie (Weismiller *et al.* 1990; K.V. Holmes, communication personnelle), est également indiquée au Tableau VIII. Aucun des anticorps monoclonaux n'a réagi de façon spécifique contre chacun des

TABLEAU VI

Immunogénicité des peptides synthétiques

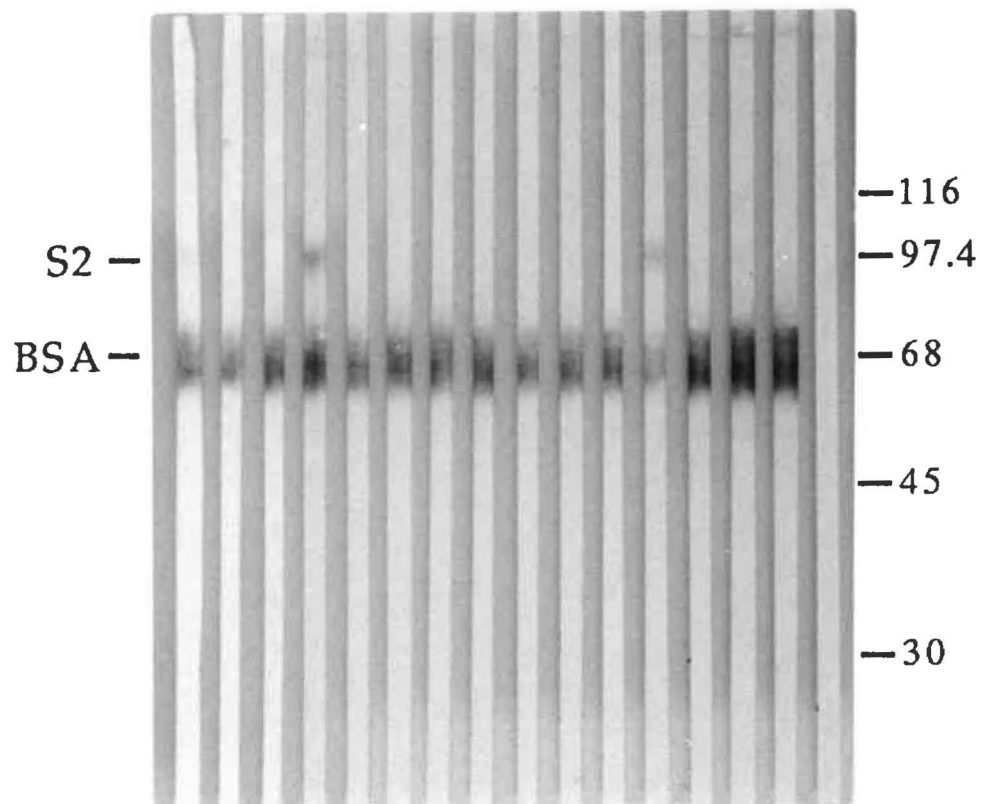
Plasma (peptides)	titre ELISA $\alpha$ -peptide	Neutralisation	Protection
#1	625 000	—*	—
#2	125 000	—	—
#3	125 000	—	—
#4	625 000	—	—
#5	625 000	—	—
#6	25 000	—	—
#7	625 000	—	—
#8	5 000	—	—
#9	125 000	—	—
#10	625 000	—	—
#11	625 000	—	—
#12	5 000	—	—
#13	125 000	—	—
MHV1	3 125 000	—	—
MHV2	3 125 000	—	—

\* Titre de neutralisation (50%) < 1/50

**Figure 19:** Immunoempreinte du virus MHV-A59 concentré avec les plasmas anti-peptides. Puits 1 à 13, plasma anti-peptide correspondant; puits 14, plasma anti-MHV1; puits 15, plasma anti-MHV2; puits 16, plasma témoin. La position de migration des marqueurs de masses moléculaires (kDa) est indiquée à droite et celle du polypeptide S2 et du BSA, à gauche.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



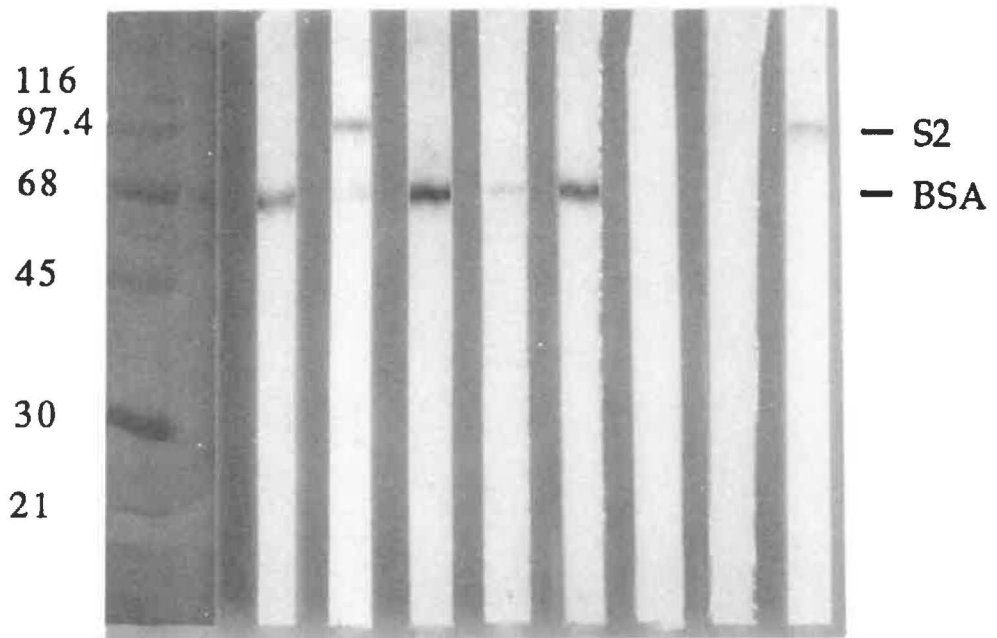
**TABLEAU VII****Immunogénicité des peptides "peptide A" et "MHV2"  
couplés au BSA ou au KLH**

Plasma (peptides)	titre ELISA $\alpha$ -peptide	Neutralisation	Protection
MHV2/BSA	781 250	—*	0/10
MHV2/KLH	156 250	—	0/10
peptide A/BSA	156 250	—	0/10
peptide A/KLH	781 250	—	5/5

\* Titre de neutralisation (50%) < 1/50

**Figure 20:** Immunoempreinte comparée du virus MHV-A59 avec les plasmas anti-peptides MHV2 et peptide A couplés au BSA ou au KLH. Puits 1 et 2, plasma anti-peptide A couplé au BSA ou KLH, respectivement; puits 3 et 4, plasma anti-MHV2 couplé au BSA ou KLH, respectivement; puits 5, plasma anti-BSA; puits 6, plasma anti-KLH; puits 7, plasma témoin; puits 8, AcMo 5B19.2. La migration des marqueurs de masses moléculaires (kDa) est montrée à gauche et celle du polypeptide S2 et du BSA, à droite.

1 2 3 4 5 6 7 8



**Figure 21:** Inhibition de fixation des AcMo 5B19.2 et E17 par les plasmas anti-peptides A couplés au BSA ou au KLH. L'inhibition d'attachement (compétition) des anticorps biotinylés suite à une incubation préalable avec des dilutions sérielles de plasmas anti-peptide A/BSA ou anti-peptide A/KLH a été évaluée par ELISA de compétition tel que décrit au chapitre Matériel et Méthodes. Le titre de compétition (50%) représente la réciproque de la dilution du plasma inhibant de 50% la fixation des AcMo 5B19.2 ou E17 biotinylés au peptide A.

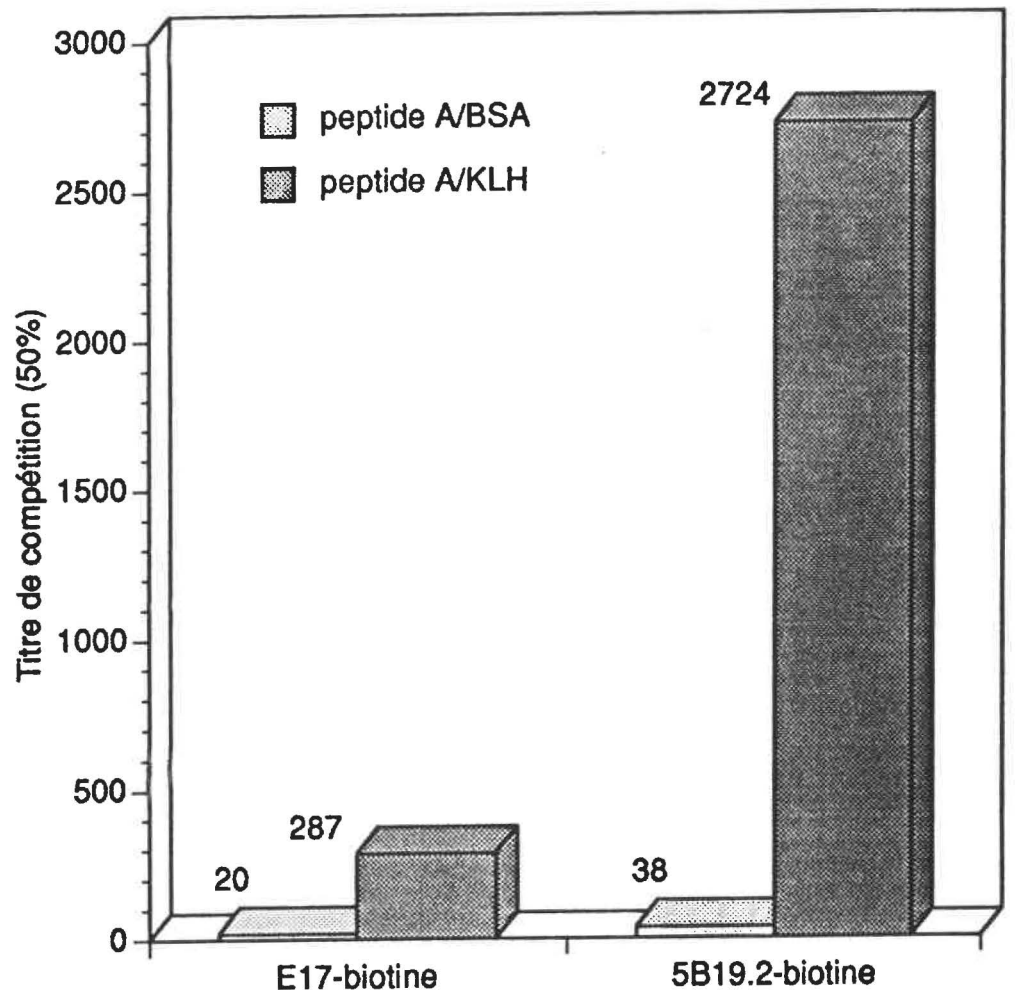


TABLEAU VIII

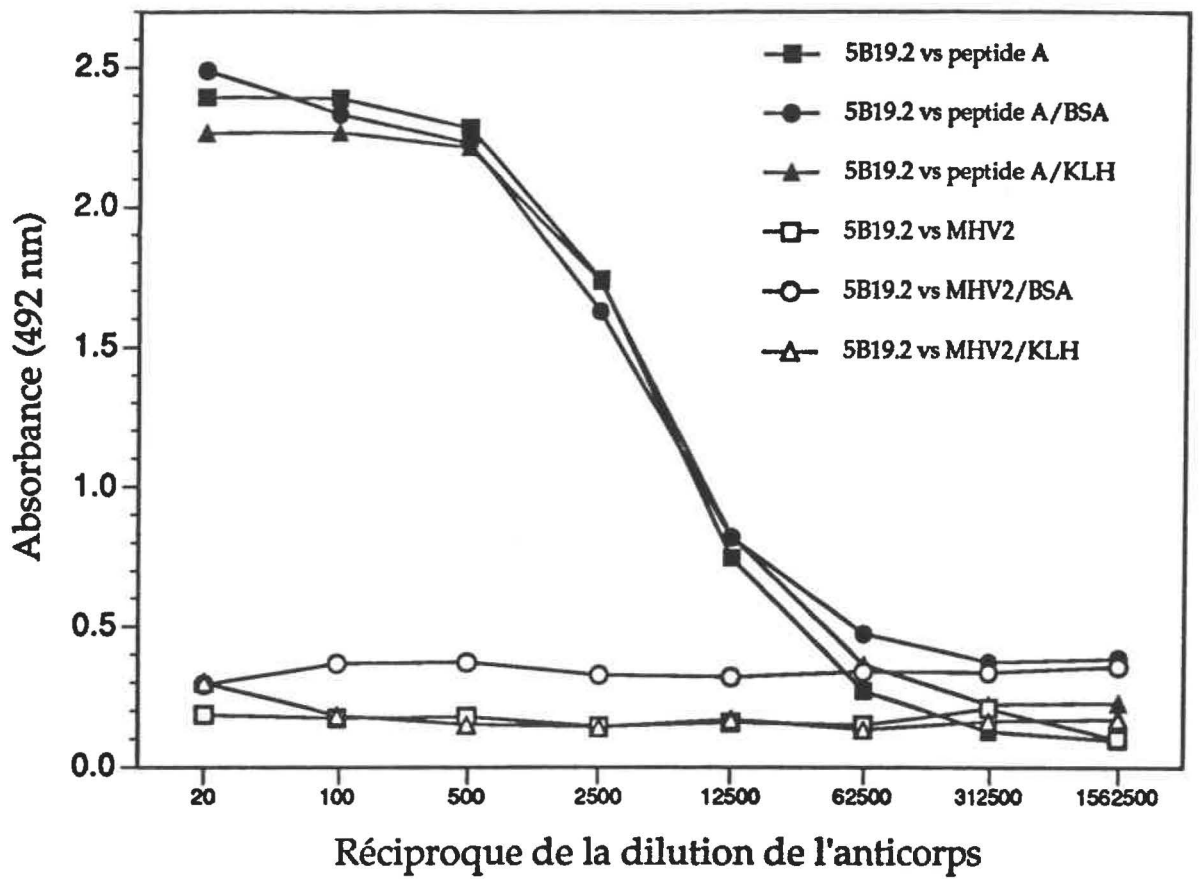
## Banque d'AcMo disponibles

Hybridome	Groupe de Recherche	Souche d'immunisation	Propriétés biologiques			Réactivité assignée <sup>1</sup>	
			Neutralisation <i>in vitro</i>	Inhibition de fusion	Protection <i>in vivo</i>	S1	S2
A1	Wege	JHM	+	+	+	n.d.	n.d.
A4			+	-	-	n.d.	n.d.
B6			+/-	-	-	n.d.	n.d.
B7			+/-	-	-	n.d.	n.d.
B35			+	-	n.d.	n.d.	n.d.
C8			-	-	-	n.d.	n.d.
D12			-	-	-	n.d.	n.d.
D14			-	-	-	n.d.	n.d.
E16			-	-	-	n.d.	n.d.
E17			-	-	-	n.d.	n.d.
F18	-	-	-	n.d.	n.d.		
J.7.18	Fleming	JHM	+	+	n.d.	-	+
J.2.2			+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d. <sup>2</sup>
J.7.2			+	n.d.	n.d.	n.d. <sup>3</sup>	n.d.
J.7.1			-	-	n.d.	+	-
J.1.16			-	-	n.d.	-	+
J.2.5			-	+	+	+	-
J.7.5			+	-	+	+	-
J.7.6			+	n.d.	n.d.	+	-
J.2.6			+	+	n.d.	-	+
5B19.2 (A)			Buchmeier	4 (JHM)	+	+	+
5B170.3 (A)	+	+			+	-	+
5A13.5 (B)	+	n.d.			+	n.d. <sup>4</sup>	n.d.
4B11.6 (C)	+	+			-	n.d. <sup>4</sup>	n.d.
5B93.9 (D)	+/-	-			-	-	+
5B21.5 (D)	+/-	n.d.			-	-	+
5B207.5 (E)	-	n.d.			-	-	+
5B216.8 (E)	-	n.d.			-	-	+
H6A	Anderson	A59			+	+	n.d.
2E10.3			+	+	n.d.	n.d.	n.d.
C16A			+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
B28A			+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
A.2.1	Fleming	A59	+	+	n.d.	n.d.	n.d.
A.2.3			+	-	n.d.	+	-
A.3.10			-	+	n.d.	+	-
A.1.3			-	-	n.d.	+	-
A.1.4			-	-	n.d.	+	-
A.1.9			-	-	n.d.	+	-
A.1.12			-	-	n.d.	+	-
7-10A.13			Talbot	A59	+	+	+
4-11G.6	+	+			+	-	n.d.
1-9F.18	+	-			n.d.	+	-
3-8B.3	+	-			n.d.	+	-
1-9G.1	+/-	-			n.d.	n.d.	n.d.
4-12G.2	+/-	-			n.d.	n.d.	n.d.

<sup>1</sup> n.d.: non déterminée;<sup>2</sup> un variant de neutralisation possède une mutation ponctuelle dans la sous-unité S2 (Wang *et al.* 1992);<sup>3</sup> un variant de neutralisation possède deux mutations ponctuelles dans la sous-unité S1 (Wang *et al.* 1992);<sup>4</sup> des variants de neutralisation possèdent des délétions dans la sous-unité S1 (Parker *et al.* 1989).

**Figure 22:** Réactivité de l'AcMo 5B19.2 contre le peptide A libre, couplé au BSA ou couplé au KLH. Le peptide A libre, couplé au BSA ou au KLH a été adsorbé au plateau ELISA et la réactivité de l'AcMo 5B19.2 évaluée tel qu'indiqué au chapitre Matériel et Méthodes. Le peptide MHV2 a été utilisé comme témoin.





peptides, qu'ils soient couplés ou non au BSA. Dans le but de mettre en évidence une différence d'antigénicité entre les peptides couplés au BSA ou au KLH, nous avons évalué la réactivité de l'AcMo 5B19.2 contre le peptide A non-couplé ou couplé à un ou l'autre des porteurs. Aucune différence d'antigénicité n'a pu être mise en évidence entre les trois présentations possibles du peptide (Figure 22).

## 5. LOCALISATION D'ÉPITOPES SUR LA STRUCTURE PRIMAIRE DE LA GLYCOPROTÉINE S

### 5.1 Réactivité d'anticorps monoclonaux contre la banque d'expression

La réactivité des AcMo figurant au Tableau VIII contre une banque de fragments de la glycoprotéine S exprimés dans le vecteur pEX a été analysée par immunoempreinte. Cette banque nous a été gracieusement fournie par le Dr Willy Spaan (Université de Leiden, Pays-Bas). Les fragments exprimés et les sites de restriction utilisés pour les générer, de même que le vecteur d'expression procaryotique pEX sont schématisés à la Figure 23. Un exemple d'analyse des résultats d'immunoempreinte des fragments de la banque est présenté à la Figure 24. L'AcMo E17 (Figure 24A) réagit avec les fragments 9, 4 et 14, délimitant donc une région comprise entre les nucléotides 2512 à 2662. Les résultats de l'immunoempreinte effectuée avec l'AcMo J.2.2 sont présentés à la Figure 24B. La réactivité de cet anticorps est ambiguë puisqu'il réagit avec des fragments ne se chevauchant pas, soient les fragments 3 et 11 d'une part et les fragments 4, 9 et 14 d'autre part. La réaction plus forte contre ces trois derniers fragments suggère toutefois qu'une portion importante de l'épitope reconnu par l'anticorps J.2.2 est localisée dans la région commune aux trois fragments.

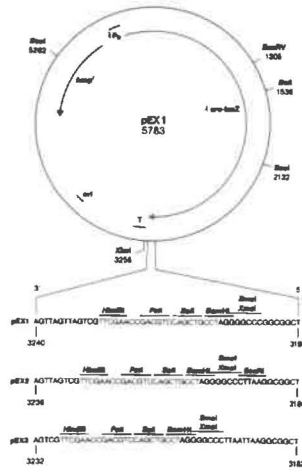
Les immunoempreintes des autres AcMo réagissant avec des fragments de la banque d'expression sont présentés aux Figures 25, 26 et 27.

Ainsi, les sites de liaison de 13 AcMo ont pu être localisés sur la structure primaire de la glycoprotéine S (Figure 28). La majorité des anticorps reconnaissent une région de 68 acides aminés, soit les domaines III et IV, comprenant respectivement 50 et 18 acides aminés. Cette région, située entre les nucléotides 2512 à 2716 et chevauchant les fragments 9, 4, 14 et 5, est totalement conservée entre les souches MHV-JHM, MHV-4 et MHV-A59. Ces résultats suggèrent que cette région de la glycoprotéine S serait immunodominante, du moins pour l'induction d'anticorps contre des épitopes linéaires. Cette interprétation est supportée par la réactivité prépondérante d'un plasma hyperimmun induit par le MHV-A59 contre les fragments délimitants cette région (résultats non-présentés; Luytjes *et al.* 1989).

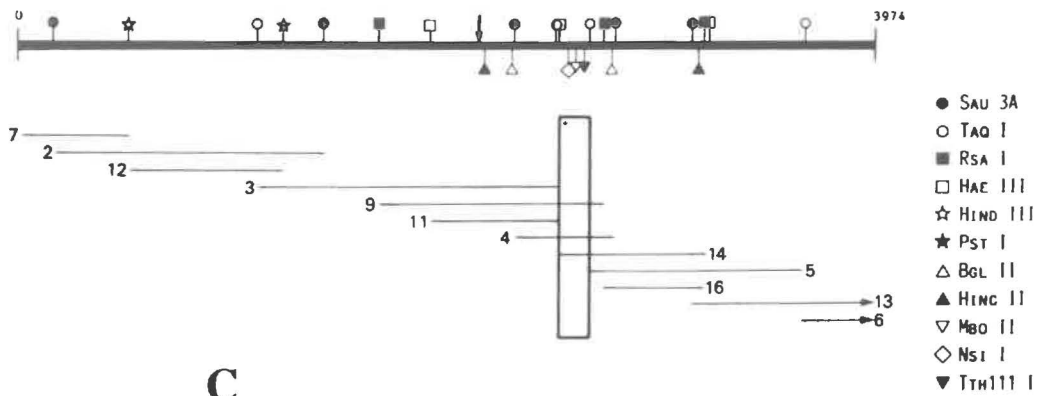
D'autre part, il est intéressant de constater que tous les anticorps neutralisants, à l'exception de 1-9F.18, reconnaissent les domaines III/IV. L'anticorps 1-9F.18 reconnaît un épitope situé sur une région composée de 202 acides aminés codés par les nucléotides 517 à 1124 (domaine I) dans la portion S1 de la glycoprotéine. Nous avons également identifié d'autres épitopes dans la région du site de clivage, soit le domaine II, composé de 132 acides aminés et codé par les nucléotides 1906 à 2300. Un autre épitope a été localisé dans la portion S2 de la glycoprotéine sur une région de 154 acides aminés codée par les nucléotides 3223 à 3656 (domaine V). Finalement, l'épitope reconnu par l'anticorps 5B93.9, qui est faiblement neutralisant, a été localisé entre les domaines III et IV.

**Figure 23:** Représentation schématique du vecteur pEX et de la banque des fragments de la protéine S exprimés chez *E. coli*. (A) Schéma du vecteur pEX; les fragments sont clonés dans le vecteur pEX approprié (1, 2 ou 3) afin de conserver le cadre de lecture et génèrent une protéine de fusion avec la  $\beta$ -galactosidase de *E. coli*. (B) Représentation du gène de la glycoprotéine S du MHV-A59, des sites de restriction utilisés pour le clonage et des fragments générés. Le site de clivage de la protéine S est indiqué par la flèche. (C) Tableau de la taille des fragments exprimés ainsi que de la position où ils se situent sur le gène de la protéine S. (modifié du catalogue 1990/91 de biologie moléculaire de Boehringer-Mannheim et de Luytjes *et al.* 1988).

**A**



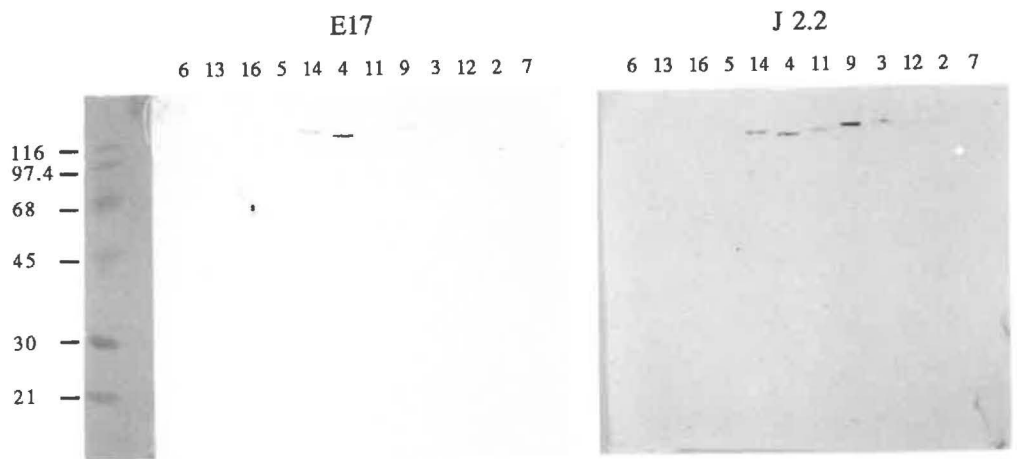
**B**



**C**

fragment	longueur	position nucléotidique
2	1 261	163 - 1 424
3	1 364	1 124 - 2 488
4	469	2 300 - 2 769
5	993	2 663 - 3 656
6	312	3 662 - 3 974
7	517	1 - 517
9	1 034	1 682 - 2 716
11	606	1 906 - 2 512
12	714	517 - 1 231
13	844	3 130 - 3 974
14	710	2 512 - 3 222
16	478	2 716 - 3 194

**Figure 24:** Immunoempreintes de la banque des fragments de la protéine S exprimés dans le vecteur pEX avec les AcMo E17 et J.2.2. Les fragments, identifiés en haut des puits, ont été séparés par gel d'électrophorèse SDS-PAGE et transférés sur membrane de nitrocellulose. La réactivité des liquides d'ascites (dilués 1/200) des hybridomes E17 et J.2.2 a été évaluée tel que décrit au chapitre Matériel et Méthodes. La migration des marqueurs de masses moléculaires (kDa) est montrée à gauche.



**Figure 25:** Immunoempreintes de la banque des fragments de la protéine S exprimés dans le vecteur pEX avec les AcMo 1-9F.18, D14, E16 et F18. Les fragments, identifiés en haut des puits, ont été séparés par gel d'électrophorèse SDS-PAGE et transférés sur membrane de nitrocellulose. La réactivité des liquides d'ascites (dilués 1/200) des hybridomes 1-9F.18 (A), D14 (B), E16 (C) et F18 (D) a été évaluée tel que décrit au chapitre Matériel et Méthodes. La position de migration des marqueurs de masses moléculaires (kDa) est indiquée à gauche.

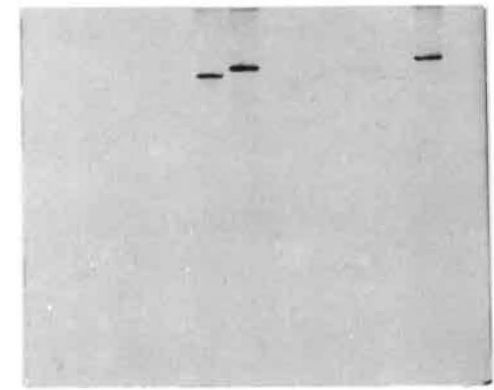


A 16 14 13 12 11 9 7 6 5 4 3 2

116  
97.4  
68  
45  
30  
21



B 16 14 13 12 11 9 7 6 5 4 3 2

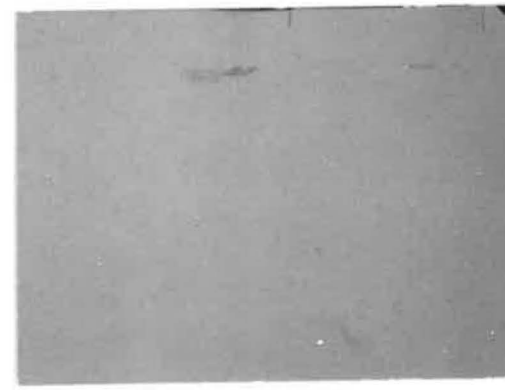


C 16 14 13 12 11 9 7 6 5 4 3 2

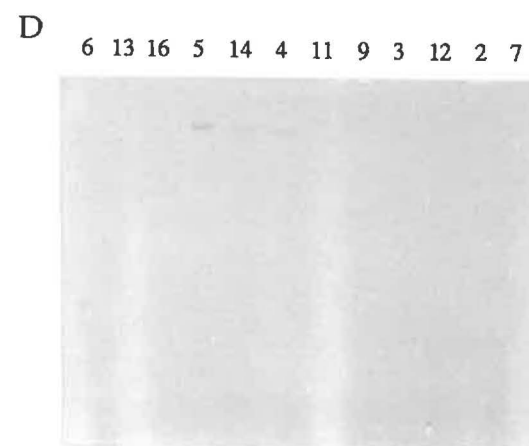
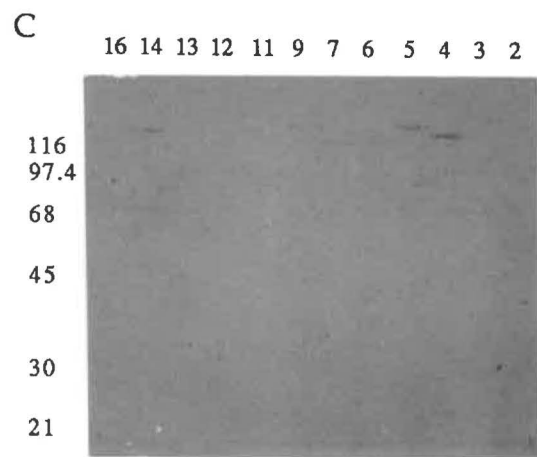
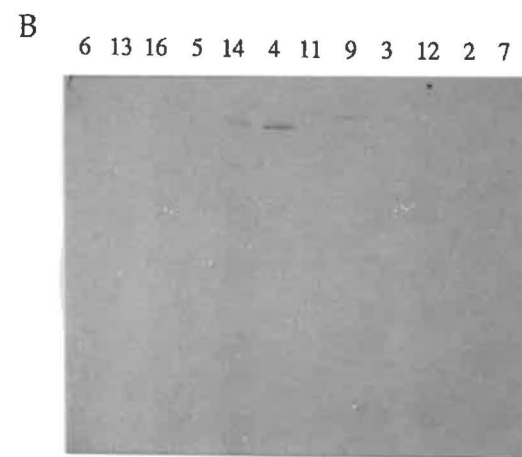
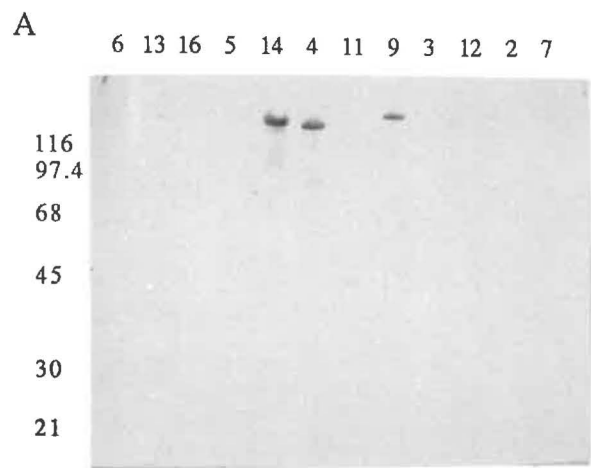
116  
97.4  
68  
45  
30  
21



D 16 14 13 12 11 9 7 6 5 4 3 2



**Figure 26:** Immunoempreintes de la banque des fragments de la protéine S exprimés dans le vecteur pEX avec les AcMo 5B170.3 5B207.5, H6A et 2E10.3. Les fragments, identifiés en haut des puits, ont été séparés par gel d'électrophorèse SDS-PAGE et transférés sur membrane de nitrocellulose. La réactivité des liquides d'ascites (dilués 1/200) des hybridomes 5B170.3 (A), 5B207.5 (B), H6A (C) et 2E10.3 (D) a été évaluée tel que décrit au chapitre Matériel et Méthodes. La position de migration des marqueurs de masses moléculaires (kDa) est indiquée à gauche.



**Figure 27:** Immunoempreintes de la banque des fragments de la protéine S exprimés dans le vecteur pEX avec les AcMo 5B93.9 et D12. Les fragments, identifiés en haut des puits, ont été séparés par gel d'électrophorèse SDS-PAGE et transférés sur membrane de nitrocellulose. La réactivité des liquides d'ascites (dilués 1/200) des hybridomes 5B93.9 (A) et D12 (B) a été évaluée tel que décrit au chapitre Matériel et Méthodes. La position de migration des marqueurs de masses moléculaires (kDa) est indiquée à gauche.

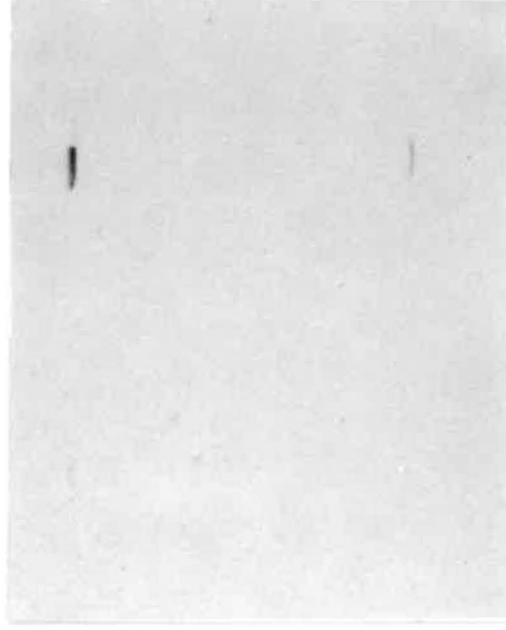
**A**

6 13 16 5 14 4 11 9 3 12 2 7

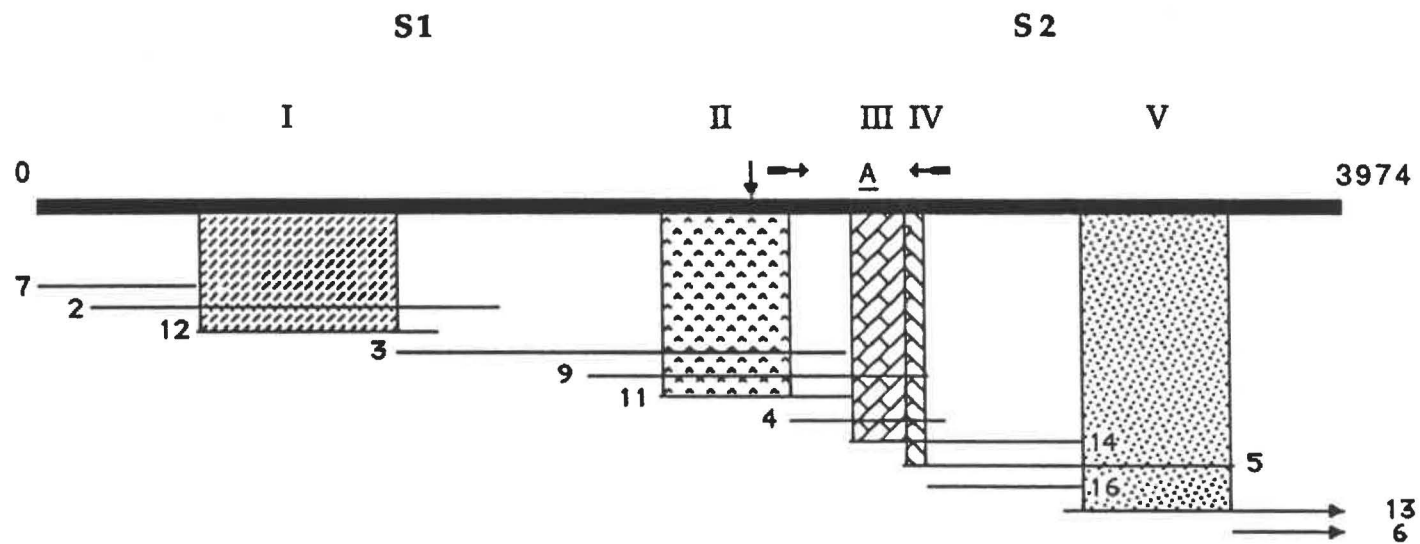


**B**

16 14 13 12 11 9 7 6 5 4 3 2



**Figure 28:** Localisation d'épitopes linéaires sur la structure primaire de la glycoprotéine S de MHV-A59. La ligne en caractère gras représente le gène de la protéine S et les lignes horizontales, la banque de fragments exprimés dans le vecteur pEX. La flèche verticale indique le site de la clivage de la protéine S. La réactivité des AcMo a été assignée à cinq domaines distincts, soit le domaine I (202 acides aminés), le domaine II (132 acides aminés), le domaine III (50 acides aminés), le domaine IV (18 acides aminés) et le domaine V (154 acides aminés). Un AcMo faiblement neutralisant a été assigné à une région comprise entre les domaines II et III. Les flèches horizontales de sens opposés représentent les amorces utilisées pour l'amplification des domaines III/IV et le tiret superposé d'un "A", la position du peptide A synthétisé.



- I: 1-9F.18 (N+)
- II: D14, E16, F18 (N-)
- III: J.2.2, 5B19.2, 5B170.3 (N+)  
5B207.5, E17 (N-)
- IV: H6A, 2E10.3 (N+)
- V: D12 (N-)
- entre les domaines II et III: 5B93.9 (N+/-)

## 5.2 Expression de la région immunodominante dans le vecteur pET3xa

Dans le but de mieux caractériser les domaines III et IV (Figure 28), une portion du gène de la glycoprotéine S du MHV-A59 a été amplifiée et insérée dans le vecteur d'expression procaryotique pET-3x. La création d'une banque de sous-clones produits par délétions unidirectionnelles de la région amplifiée nous aurait permis de définir plus précisément le site de liaison d'AcMo.

Un fragment de 580 paires de bases, correspondant à la taille prédite, a été obtenu par réaction de polymérisation en chaîne (Figure 29). L'identité du fragment amplifié a été confirmé par séquençage nucléotidique selon la méthode de Sanger (Sanger *et al.* 1977) avec la polymérase d'ADN T7 (Pharmacia) et le [<sup>35</sup>S]dATP (Amersham). Le vecteur pET3xa utilisé pour l'expression du fragment amplifié, de même que la région de contrôle de la transcription, sont représentés par la Figure 30. Dans ce système, le fragment d'ADN à cloner est inséré au site de restriction *Bam* HI, de façon à ce que le polypeptide correspondant soit exprimé en fusion avec une protéine porteuse composée des 260 premiers acides aminés de la protéine de la capsid du phage T7. L'expression du gène est contrôlée par un promoteur du phage T7 localisé en amont de la séquence codante. Ainsi, l'induction de l'expression de la polymérase du phage dans les bactéries recombinantes permet l'expression de la protéine de fusion.

Nous avons d'abord confirmé que la protéine de fusion n'était reconnue que par les AcMo dont le site de liaison avait été localisé dans les domaines III/IV. Comme le montre l'immunoempreinte (Figure 31), seuls les anticorps réagissant avec les domaines III/IV reconnaissent le fragment exprimé. La



réaction des plasmas dirigés contre les peptides 4 et 8 confirme l'identité du fragment amplifié (Figure 31). Les AcMo H6A et 2E10.3 montrent une réaction additionnelle avec une protéine de masse moléculaire d'environ 40 kDa. Bien que la nature de cette protéine demeure indéterminée, nous pouvons exclure qu'il s'agisse d'une réaction avec la portion de protéine de capsidie exprimée, car sa masse moléculaire prédite est de 27.7 kDa.

Nous avons également voulu vérifier que la réponse humorale dirigée contre cette région de la protéine n'est pas génétiquement restreinte à la souris BALB/c, utilisée pour la production des AcMo décrits précédemment, mais constitue une réponse normale contre le MHV chez différentes lignées de souris ou d'autres espèces. La forte réaction de plasmas hyperimmuns anti-MHV-A59 de plusieurs lignées de souris, de rats ou de lapins contre le fragment exprimé confirme l'immunodominance du domaine exprimé (Figure 32). Nous avons également évalué l'immunogénicité du fragment exprimé portant la région immunodominante. Les souris BALB/c immunisées avec la protéine de fusion portant le fragment n'ont pas survécu plus longtemps à l'épreuve virale que les souris témoins immunisées avec la protéine porteuse (260 premiers acides aminés de la protéine de la capsidie du phage T7). De plus, les plasmas des souris immunisées avec la protéine de fusion n'ont pas d'activité de neutralisation (résultats non-présentés). Cependant, ce plasma réagit spécifiquement avec la sous unité S2 en immunoempreinte (Figure 33).

### 5.3 Réactivité d'anticorps monoclonaux contre l'épitope A

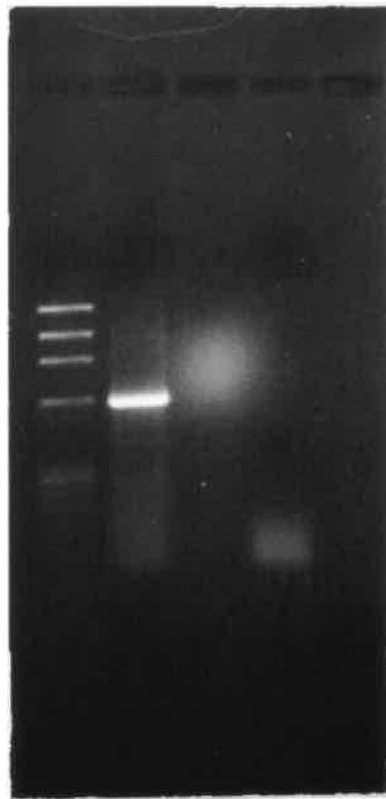
Les résultats obtenus quant à la cartographie des sites de liaison des AcMo nous ont conduit à vérifier la réactivité des anticorps préalablement assignés au

domaine III contre le peptide A. Le graphique présenté à la Figure 34 montre que par ELISA, les anticorps E17, 5B19.2, 5B170.3, J.2.2 et 5B207.5 réagissent avec le peptide, tandis que les anticorps H6A et 2E10.3, cartographiés dans le domaine IV, et l'anticorps E16, cartographié au domaine II, ne reconnaissent pas le peptide. Ce résultat corrobore ceux obtenus avec la banque de fragments pEX qui ont permis de localiser les épitopes des anticorps H6A et 2E10.3 dans une région de 18 acides aminés formant le domaine IV.

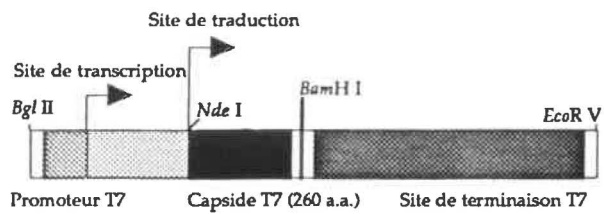
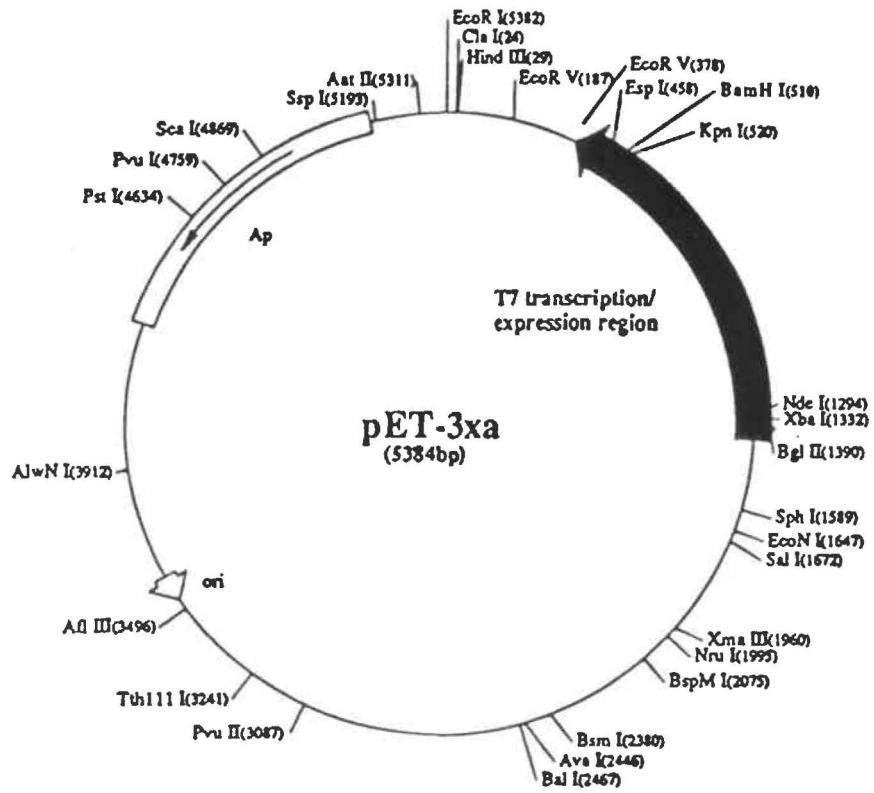
**Figure 29:** Amplification par transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne de la région immunodominante du gène de la protéine S de MHV-A59. Puits 1, amplification effectuée à partir d'ARN totaux isolés de cellules infectées; puits 2, témoin sans ARN. La migration des marqueurs de taille (pb) est montrée à gauche.

M 1 2

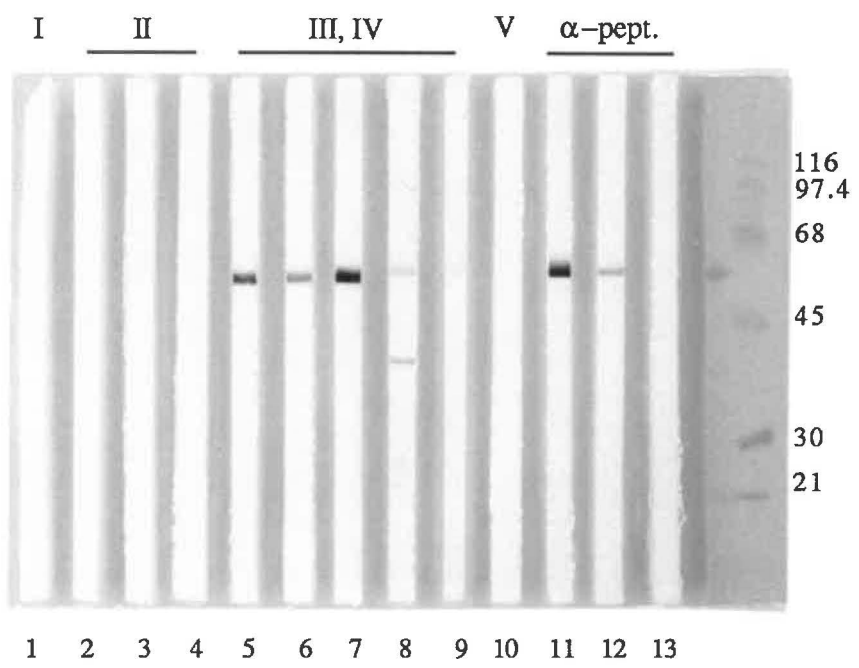
1353  
1078  
872  
603  
310  
281



**Figure 30:** Représentation schématique du vecteur d'expression procaryotique pET-3xa et de la région de contrôle de la transcription. Dans ce système, le fragment d'ADN est inséré au site *Bam*H 1 et exprimé en fusion avec les 260 premiers acides aminés de la protéine de la capsid du phage T7. De plus, l'initiation et l'arrêt de la transcription de l'ARN sont sous le contrôle du promoteur et du site de terminaison normalement utilisés pour la transcription du gène de la capsid (modifié des instructions du manufacturier, Novagen 1991).



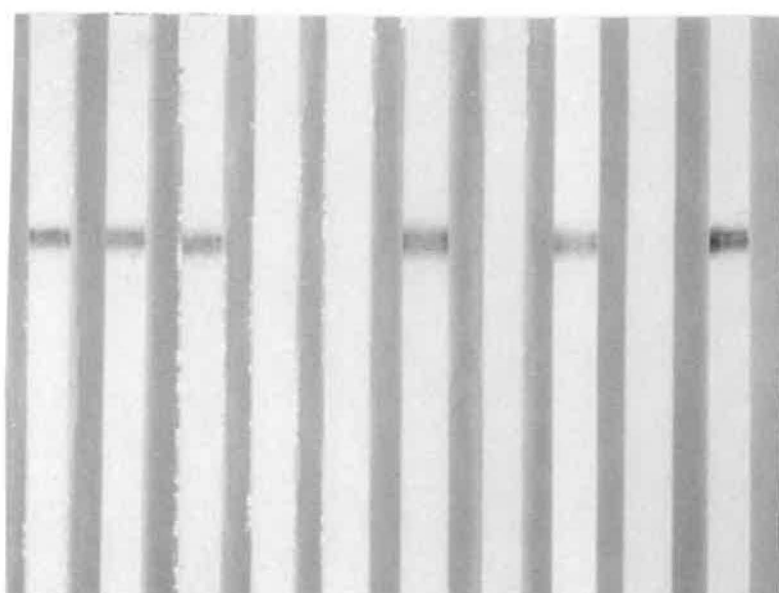
**Figure 31:** Immunoempreinte du domaine immunodominant avec les AcMo dont le site de liaison a été localisé. La protéine de fusion comprenant le domaine immunodominant a été analysée par SDS-PAGE et électrotransfert sur membrane de nitrocellulose. La réactivité des anticorps suivants a été évaluée: puits 1, AcMo 1-9F.18; puits 2 à 4, AcMo D14, E16 et F18, respectivement; puits 5 à 9, AcMo E17, J.2.2, 5B19.2, H6A, 2E10.3, respectivement; puits 10, AcMo D12. La réactivité de plasmas dirigés contre des peptides compris dans la région amplifiée (puits 11 et 12, anti-peptides 4 et 8, respectivement) et à l'extérieur de cette région (puits 13, anti-peptide 1) est également présentée. Les domaines reconnus par les AcMo sont identifiés en haut des puits. La migration des marqueurs de masses moléculaires (kDa) est montrée à droite.





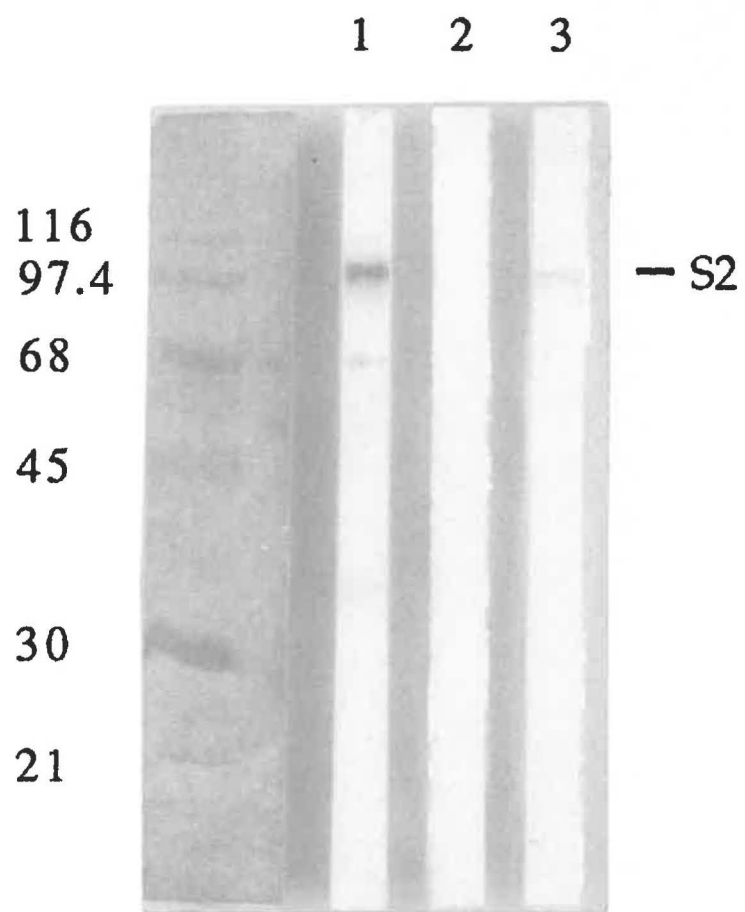
**Figure 32:** Immunoempreinte du domaine immunodominant avec différents antisérums contre le MHV-A59. Puits 1 à 3, antisérums produits chez la souris C57BL/6, SJL et AKR, respectivement; puits 4 et 5, sérum pré-immuns des souris C57BL/6 et AKR, respectivement; puits 6 et 7, antisérum et sérum pré-immun de lapin, respectivement; puits 8 et 9, antisérum et sérum pré-immun de rat, respectivement; puits 10, AcMo E17. La position de migration des marqueurs de masses moléculaires (kDa) est indiquée à droite.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



— 116  
— 97.4  
— 68  
— 45  
— 30

**Figure 33:** Immunoempreinte du virus MHV-A59 avec les plasmas de souris immunisées avec le domaine immunodominant. Puits 1, plasma de souris immunisées avec la protéine de fusion contenant le domaine immunodominant; puits 2, plasma de souris immunisées avec la protéine porteuse; puits 3, AcMo 5B19.2. La migration des marqueurs de masses moléculaires (kDa) est montrée à gauche et celle du polypeptide S2, à droite.



**Figure 34:** Réactivité d'AcMo spécifiques à la glycoprotéine S contre le peptide A. La réactivité des dilutions sérielles d'ascites de différents hybridomes ou d'un plasma témoin (PBS) contre les microplateaux dans lesquels avait été adsorbés le peptide A a été évalué tel que décrit au chapitre Matériel et Méthodes.



## DISCUSSION

## 1. ANTIGÉNICITÉ COMPARÉE DE LA GLYCOPROTÉINE S À pH6/pH7

Nous avons démontré que le titre infectieux du virus MHV-A59 peut être augmenté de 5 à 10 fois lorsque les feuillettes de cellules DBT sont infectés avec un milieu de culture légèrement acide (Figure 6). De plus, la glycoprotéine S de ces virions réagit plus fortement, comparativement à la protéine du virus produit à pH neutre, avec certains anticorps dirigés contre celle-ci. Cette observation a été effectuée par trois méthodes différentes, soient par immunoempreinte, immunoprécipitation et ELISA. L'augmentation du titre viral pourrait être expliquée, d'une part, par une plus grande stabilité du virus MHV-A59 à pH 6,0 (Daniel et Talbot 1987) et d'autre part, par une meilleure propagation de l'infection suite à une modification structurale de la glycoprotéine S, celle-ci étant impliquée dans l'attachement et la pénétration du virion.

La nature des modifications responsables de la plus grande antigénicité de la protéine S produite à pH 6,0 demeure cependant indéterminée. Des expériences supplémentaires nous ont permis de démontrer que cette modification ne peut pas être reproduite, et détectée par ELISA, à la suite d'une incubation de 16 h à 37°C de l'antigène produit à pH 7,0 dans un tampon à pH 6,0. De même, l'antigène ELISA produit à pH 6,0 et incubé 16 h à 37°C dans un tampon à pH 7,0 demeure plus antigénique que l'antigène produit à pH 7,0. Ainsi, la modification de la glycoprotéine S serait médiée par un processus cellulaire agissant sur la synthèse ou la maturation post-traductionnelle de la protéine S. L'altération structurale de la glycoprotéine responsable de l'augmentation d'antigénicité n'est pas dépendante de la structure



conformationnelle puisque le phénomène est observable en immunoempreinte après SDS-PAGE en présence d'un agent réducteur de ponts disulfures (Figure 7). De plus, nous pouvons exclure la possibilité que les protéines produites à l'un ou l'autre des pH soient différemment sensibles à la dénaturation par le SDS, ou qu'elles aient des charges nettes différentes car leur migration en électrophorèse est identique (Figure 7 et 9). La possibilité de proportions différentes de protéines S1 et S2 peut également être exclue étant donné que des AcMo reconnaissant différentes sous-unités et différents domaines antigéniques de la protéine S (1-9F.18: S1 et 5B19.2: S2) réagissent tous les deux de meilleure façon avec la protéine produite en conditions acides (Figure 10). Toutefois, les résultats obtenus en ELISA suggèrent que certains domaines ou épitopes sur la glycoprotéine ne sont pas affectés de la même manière par cette altération structurale. L'utilisation d'une banque plus grande d'AcMo ne nous a pas permis de localiser les domaines impliqués dans ce changement.

Quelques études ont démontré que la glycoprotéine S de MHV-A59, et la réplication de celui-ci, pouvaient être affectées par des variations de pH. D'une part, la fusion cellulaire observée lors de l'infection de cultures cellulaires par le MHV-A59 est réduite dans des conditions de culture légèrement acides (Sturman *et al.* 1990). D'autre part, il a également été démontré qu'il y avait aggrégation des sous-unités S2 et détachement des sous-unités S1 après incubation des virions à pH 8,0 et 37°C (Sturman *et al.* 1990). La glycoprotéine S subirait un changement conformationnel pouvant modifier l'antigénicité de la protéine (Weismiller *et al.* 1990). Les changements conformationnels associés aux variations de pH ont été observés pour de nombreux virus, par exemple

chez les paramyxovirus et le virus influenza. L'activité hémagglutinante de l'hémagglutinine du virus de la rougeole peut être abolie après incubation à un pH acide (Sheshberadaran 1991). Au contraire, l'hémagglutinine (HA) du virus influenza doit être exposée à un pH acide pour être activée et induire la fusion des membranes cellulaires et virales (White 1990). Il a par ailleurs été démontré qu'après incubation de la protéine HA du virus influenza à pH acide, certains épitopes étaient plus réactifs et d'autres moins réactifs (Brown *et al.* 1990). Cependant, contrairement à ce que nous avons observé pour le MHV-A59, ces changements conformationnels ne sont pas dépendants de la réplication du virus.

D'autres expériences devront être envisagées pour confirmer l'hypothèse du changement conformationnel à pH acide, telles la purification des deux protéines et la comparaison quantitative des réactivités et des quantités réelles de protéine S, la reproductibilité de l'observation dans différents systèmes cellulaires, la comparaison des réactivités après expression bio-synthétique ou synthétique (acellulaire) de la protéine. Le rôle biologique possible d'un tel changement conformationnel demeure indéterminé. Il pourrait avoir une importance dans les mécanismes liés à l'infection de la cellule cible, entre autre la pénétration. Il a été démontré que les coronavirus murins entrent dans la cellule cible par la voie endosomale ou par fusion à la membrane plasmique, bien que ce dernier mécanisme soit privilégié (Gallagher *et al.* 1991; Kooi *et al.* 1991). L'intérêt de cette observation, pour les travaux présentés dans cette thèse, demeure toutefois la plus grande sensibilité obtenue dans la détection d'anticorps dirigés contre la glycoprotéine S. Ainsi, il a été possible de démontrer que les antisérums dirigés contre certains peptides de la protéine S

pouvaient réagir avec celle-ci en immunoempreinte lorsque l'antigène produit à pH 6,0 a été utilisé (Figure 19), alors que les résultats étaient négatifs avec l'antigène produit à pH 7,0.

## 2. IMMUNOGÉNÉICITÉ DE LA PROTÉINE S PURIFIÉE

Un des objectifs présentés dans cette thèse était de démontrer l'importance de la glycoprotéine S dans l'induction d'une réponse immunitaire protectrice. Jusqu'à ce que ces travaux soient entrepris, la contribution de la glycoprotéine S à l'immunité anti-MHV avait été principalement évaluée de façon indirecte, en particulier par la caractérisation d'AcMo neutralisants et/ou protecteurs (Buchmeier *et al.* 1984; Wege *et al.* 1984; Gilmore *et al.* 1987). Pour atteindre l'objectif fixé, une technique de purification de la glycoprotéine S par chromatographie d'immunoaffinité a été mise au point et l'immunogénicité de la protéine purifiée a été évaluée chez la souris BALB/c.

La méthode développée permet de purifier la glycoprotéine S des autres protéines virales et de la plupart des protéines cellulaires. Un contaminant, constitué d'un doublet de masse moléculaire d'environ 30 kDa, a toutefois été observé de façon reproductible lors de la purification. Ce contaminant est probablement d'origine cellulaire puisque sa migration en SDS-PAGE est plus lente que la protéine de membrane (M) et pourrait être associé à la protéine S lors de la solubilisation de l'antigène ou se lier directement à l'AcMo 7-10A.13. Nous avons également démontré que la glycoprotéine S purifiée pouvait induire la synthèse d'anticorps neutralisants et capables d'inhiber la fusion. De plus, l'immunité conférée par la glycoprotéine protège les souris d'une épreuve létale avec le virus MHV-A59. Finalement, nous avons démontré qu'il n'était

pas nécessaire que la structure native de la protéine S soit conservée pour que celle-ci induise une réponse immunitaire protectrice.

Hasony et Macnaughton (1981) ont montré que la glycoprotéine S du virus MHV-3 purifiée par ultracentrifugation à l'équilibre pouvait induire une réponse immunitaire protectrice chez la souris, quoique la protection obtenue n'ait été que partielle. Ils ont également démontré que la protéine S du coronavirus aviaire IBV, purifiée par chromatographie d'immunoaffinité, pouvait induire la synthèse d'anticorps neutralisants (Mockett 1985). Les résultats que nous avons obtenus confirment l'importance de la glycoprotéine S dans l'immunité anti-coronavirale. De plus, nos travaux se distinguent des précédents par l'utilisation du coronavirus murin neurotrope MHV-A59 comme modèle d'étude.

Des travaux portant sur la caractérisation des sites antigéniques de la glycoprotéine S ont montré que les AcMo neutralisants ou capables d'inhiber la fusion peuvent reconnaître des sites communs ou distincts et que ces activités biologiques pouvaient être associées à des épitopes linéaires ou discontinus (Collins *et al.* 1982; Talbot *et al.* 1984a,b; Gilmore *et al.* 1987). La caractérisation des AcMo 7-10A.13 et 4-11G.6 ne nous permet pas de tirer de nouvelles conclusions sur les épitopes liés aux différentes activités biologiques. Cependant, nous avons démontré que les épitopes reconnus par les anticorps 7-10A.13 et 4-11G.6 font partie du même site antigénique mais ne sont pas également sensibles à la dénaturation par l'isothiocyanate d'ammonium. Ces résultats suggèrent que ce site conformationnel serait formé de différentes interactions moléculaires. Les agents chaotropiques, tel l'isothiocyanate, agissent principalement sur les liens hydrophobes, très importants à la

formation des structures tertiaires (von Hippel et Wong 1964; Hatefi et Hanstein 1969). Ce type d'interactions semble donc essentiel à la conformation de l'épitope 7-10A.13. Ces résultats pourront être mis à contribution lorsque la structure tri-dimensionnelle de la protéine S sera connue.

Il a été démontré que le clivage enzymatique de la glycoprotéine S (180 kDa) du MHV-A59 génère deux sous-unités, S1 et S2, de masses moléculaires d'environ 90 kDa chacune (Sturman *et al.* 1985). Cependant, lors des expériences d'immunoabsorption ou de chromatographie en colonne, deux produits de 87-88 et 96-97 kDa ont été obtenus de façon reproductible. Nous n'avons pas vérifié expérimentalement l'identité de ces deux polypeptides. Ils pourraient toutefois correspondre aux sous-unités S2 et S1, dont les masses moléculaires ont été estimées à 66 et 79.8 kDa d'après la séquence nucléotidique de la protéine S (Luytjes *et al.* 1987). L'apoprotéine S a une masse moléculaire prédite de 146 kDa. En supposant que les 34 kDa de chaînes glycosylées sont réparties également sur les sous-unités, qui compte chacune 10 sites potentiels de glycosylation, la masse moléculaire des sous-unités S2 et S1 serait 83 et 97 kDa, ce qui correspond aux résultats obtenus. L'utilisation de substrats cellulaires différents ou de gels de gradient d'acrylamide pourrait expliquer les discordances entre les résultats rapportés dans la littérature et les nôtres.

Finalement, il est à noter que nous avons observé différentes proportions de glycoprotéines S/S1,S2 selon le type d'expérience effectuée. Lors de l'élution avec le thiocyanate de la protéine S de la colonne d'immunoaffinité, les sous-unités S1/S2 étaient dominantes en quantité (Figure 15), tel que lors de l'immunoempreinte de la protéine S avec des anticorps monoclonaux (Figure 7). Par contre, lors de l'élution de la glycoprotéine S avec le tampon

d'échantillon d'électrophorèse, la protéine S de 180 kDa est majoritaire (Figure 14). Le processus responsable de ces différentes observations demeure indéterminé. Toutefois, nous pouvons suggérer que cette situation diffère de celle de l'immunoprécipitation, où l'antigène utilisé est un lysat de cellules infectées. Il y a présence dans cet antigène de glycoprotéines S intra-cellulaires potentiellement non-clivées, alors que la glycoprotéine S utilisée pour les expériences de chromatographie d'immunoaffinité provient de virus extra-cellulaires. Il semble donc étonnant qu'un même type d'antigène viral ait donné différentes proportions de S/S1,S2 selon la méthode d'élution utilisée.

### 3. IDENTIFICATION DE SITES ANTIGÉNIQUES À L'AIDE DE PEPTIDES SYNTHÉTIQUES

Nous avons démontré que la glycoprotéine S pouvait, à elle seule, induire une réponse immunitaire protectrice contre une épreuve létale avec la souche MHV-A59. Conséquemment, nous nous sommes intéressés à identifier et à caractériser des régions de la protéine S qui pourraient être importantes à l'induction de cette réponse immunitaire. La première approche envisagée a été celle de la prédiction de sites antigéniques de la protéine et de l'utilisation de peptides synthétiques pour l'étude de ces sites.

L'utilisation d'algorithmes de prédiction pour l'identification et la localisation d'épitopes importants a été rapporté pour plusieurs virus, entre autres le virus respiratoire syncytial (Trudel *et al.* 1987; Bourgeois *et al.* 1991), le virus de la rougeole (Mäkelä *et al.* 1989a, 1989b) et le virus herpès simplex (Strynadka *et al.* 1988). De plus, il avait été démontré au laboratoire qu'un décapeptide synthétique (MHV2), déduit de la séquence nucléotidique du

MHV-JHM, pouvait induire chez les souris immunisées la synthèse d'anticorps neutralisants et protéger celles-ci d'une épreuve létale avec le MHV-JHM (Talbot *et al.* 1988). De façon à définir davantage la structure antigénique de la glycoprotéine S, la structure primaire de la protéine S a été analysée à l'aide de neuf algorithmes de prédiction de sites antigéniques et 13 peptides synthétiques supplémentaires ont été sélectionnés et synthétisés pour la suite de l'étude. Nous avons également inclus dans l'étude les peptides MHV1 et MHV2 déjà disponibles au laboratoire. Les profils de prédictions obtenus par notre analyse de séquences ont par la suite été corroborés par le profil d'index antigénique, combinant les algorithmes d'hydrophilicité, de probabilité de surface et de flexibilité, obtenu par l'analyse de la séquence de la protéine S avec le logiciel MacVector 3.5 acquis par le centre de recherche en virologie.

L'immunogénicité des 15 peptides couplés au BSA a été vérifiée chez la souris BALB/c. Aucun des peptides n'a induit d'anticorps pouvant neutraliser l'infectivité virale *in vitro* ou conférer une immunité suffisante pour protéger les souris d'une épreuve létale avec le virus MHV-A59. Cependant, les plasmas dirigés contre les peptides 1, 4 et 12 ont montré une réactivité avec la glycoprotéine S dénaturée en immunoempreinte (Figure 19). De plus, aucune réactivité spécifique des plasmas contre la glycoprotéine S native n'a pu être démontrée par la technique d'immunoprécipitation. D'autre part, nous avons évalué en ELISA la réactivité d'une banque d'AcMo dirigés contre la glycoprotéine S vis-à-vis chacun des peptides. Aucun des AcMo n'a réagi de façon spécifique avec les peptides non-couplés adsorbés aux plateaux. Il a toutefois été rapporté que des AcMo dirigés contre une protéine ne pouvaient reconnaître l'épitope présent sur un peptide synthétique que lorsque celui-ci



était couplé à une molécule porteuse (Mäkelä *et al.* 1989b). Nous avons donc repris les expériences en utilisant les peptides couplés au BSA et les résultats se sont avérés négatifs. Dans le but de mettre en évidence une différence d'antigénicité entre les peptides couplés au BSA ou au KLH et les peptides libres, nous avons comparé la réactivité en ELISA de l'AcMo 5B19.2 contre un peptide chevauchant l'épitope reconnu par cet anticorps (peptide A). Les résultats suggèrent que les peptides libres, couplés au BSA ou au KLH sont reconnus avec une affinité similaire par l'anticorps (Figure 22). De plus, au moins cinq AcMo différents peuvent réagir spécifiquement avec le peptide A libre (Figure 34).

Certains auteurs ont suggéré que des peptides synthétiques pouvaient induire fréquemment la synthèse d'anticorps réagissant avec la protéine native en ELISA et ainsi définir des épitopes pouvant être simulés par les peptides (Green *et al.* 1982; Lerner 1982, 1984). Cette haute fréquence de réactivité serait explicable par une dénaturation partielle de l'antigène adsorbé au plastique du plateau ELISA (Jemmerson et Blankenfeld 1989). Une attention particulière doit donc être apportée aux techniques utilisées pour évaluer l'antigénicité et l'immunogénicité des peptides étudiés et aux conclusions qui en sont déduites. Il est préférable, pour démontrer la réactivité d'anticorps anti-peptides avec la protéine native, d'utiliser une technique où la réaction antigène-anticorps s'effectue en phase liquide, tels l'immunoprécipitation ou le BIAcore<sup>MC</sup> (Zederlutz *et al.* 1993). L'inhibition d'une activité biologique de la protéine ou du virus demeure cependant la meilleure preuve d'une liaison d'un anticorps avec la structure native de l'épitope (Laver *et al.* 1990).



De nos résultats, nous pouvons conclure que les algorithmes employés n'ont pas été efficaces, dans les conditions expérimentales décrites, à prédire les structures linéaires de la glycoprotéine S potentiellement exposées ou immunogéniques *in vivo*. Deux études comparant l'efficacité de différents algorithmes à prédire les sites antigéniques de protéines pour lesquelles ces sites avaient été identifiés montrent que le taux de succès maximal est en moyenne de 50 à 57% (van Regenmortel et Daney de Marcillac 1988; Pellequer *et al.* 1991). Considérant les résultats obtenus sur la localisation d'épitopes (section 5 du chapitre Résultats), nous pouvons supposer que les épitopes linéaires sont restreints à quelques domaines précis de la glycoprotéine S native. Ainsi, il est moins étonnant que les méthodes de prédiction utilisées ne les aient pas détectés. D'ailleurs, près de 90% des épitopes reconnus par les anticorps seraient discontinus (Horsfall *et al.* 1991). De plus, les AcMo n'ont pu détecter de portion d'épitopes discontinus, bien qu'il ait été suggéré que jusqu'à 10% des anticorps reconnaissant des épitopes discontinus pouvaient réagir avec des peptides synthétiques portant une partie de l'épitope (Arnon et van Regenmortel 1992). Finalement, il est intéressant de noter que le domaine immunodominant identifié et le peptide A, qui chevauchent la portion N-terminale du peptide 8, apparaissent comme une région très peu antigénique (creux) avec tous les algorithmes employés (Figure 18).

Nous avons été étonnés de constater que seuls les plasmas anti-peptides 1, 4, et 12 reconnaissent la glycoprotéine S dénaturée en immunoempreinte (Figure 19). Par contre, le plasma anti-peptide 8, qui ne réagissait pas avec la glycoprotéine S dénaturée, reconnaît le fragment exprimé dans le vecteur pET. Ceci suggère un manque de sensibilité du test d'immunoempreinte ou des

conditions de détection sub-optimales pour l'antigène viral. Déjà, l'utilisation de l'antigène produit à pH 6,0 avait beaucoup augmenté la sensibilité du test. À noter que la réactivité des plasmas anti-peptides contre la banque de fragments exprimés dans le vecteur pEX a été vérifiée mais une trop grande dégradation des polypeptides de fusion a diminué la sensibilité du test et n'a pas permis la détection d'une réaction spécifique. La faible proportion de plasmas réagissant avec la protéine S dénaturée peut être expliquée par une plus grande flexibilité du peptide couplé que la région correspondante dans la protéine. De ce fait, les portions amino et carboxy-terminales des protéines sont généralement exposées à la surface des protéines et contiennent des épitopes linéaires qui peuvent être simulés par des peptides synthétiques (van Regenmortel *et al.* 1988).

Finalement, les résultats discordants obtenus avec le peptide MHV2/BSA par rapport à ceux obtenus par Talbot *et al.* (1988) avec le même peptide couplé au KLH nous ont amené à comparer l'immunogénicité des peptides couplés à l'un ou l'autre des porteurs. Le peptide A a également été utilisé dans l'étude comparative des deux molécules porteuses. Les titres anti-peptides des plasmas des souris immunisées avec les peptides couplés au BSA ou au KLH sont comparables et aucun n'a démontré d'activité neutralisante *in vitro* (Tableau VI). Toutefois, les souris immunisées avec le peptide A/KLH ont été protégées d'une épreuve létale avec le MHV-A59 tandis que celles immunisées avec le peptide A/BSA n'ont pas survécu à l'infection. Il est à noter que le plasma anti-peptide MHV2/KLH n'avait pas d'activité de neutralisation, que ce soit contre la souche MHV-A59 ou MHV-JHM. Les nouvelles expériences ont cependant été effectuées avec un nouveau lot de peptides et de nouveaux couplages. Talbot *et al.* (1988) ont suggéré qu'il existait une corrélation entre la protection

conférée par le MHV2 et un titre anti-peptide supérieur à 1/65 000. Bien que le test ELISA utilisé et la méthode de calcul du titre en anticorps diffèrent entre les deux expériences, nos résultats indiquent que le peptide couplé a été très immunogénique. Une différence dans les conjugués peptide-molécule porteuse, soit au niveau de la densité de peptides par porteur ou de la présentation du peptide à la surface du porteur pourrait expliquer la divergence des résultats observés. Sur ce point, mentionnons qu'un agent couplant différent, le succinimidyl 4-(*p*-maleimidophenyl) butyrate (SMPB), a été utilisé par Talbot *et al.* (1988).

Notre étude nous a permis de mettre en évidence une différence qualitative entre les réponses humorales dirigées contre le peptide A couplé au BSA ou au KLH. Le plasma anti-peptide A/KLH inhibe fortement la fixation d'AcMo réactifs avec le peptide A, tandis que le plasma dirigé contre le peptide couplé au BSA ne l'inhibe que très peu (Figure 21). De plus, nous pouvons supposer, d'une part, que ces AcMo reconnaissent la structure native de la protéine S puisque l'un de ces anticorps neutralise l'infectivité virale et les deux anticorps compétitionnent entre eux (Tableau VIII) et que, d'autre part, ces anticorps réagissent avec le peptide adoptant une structure similaire à celle retrouvée sur la protéine native. Il est donc probable que la proportion ou l'affinité des anticorps réactifs avec la structure native de la glycoprotéine S soit plus grande dans le plasma anti-peptide A/KLH que dans le plasma anti-peptide A/BSA. Il est aussi probable que le plasma anti-peptide A/KLH immunoprécipiterait la glycoprotéine S. Ceci reste par contre à être démontré expérimentalement. Les travaux de Koolen *et al.* (1990) ont montré que le peptide A couplé à un épitope T de l'hémagglutinine du virus influenza

(peptide A/HA) pouvait vacciner les souris BALB/c contre une épreuve létale avec le virus MHV-A59, tandis que le peptide couplé au KLH ne pouvait induire une telle réponse immunitaire. De plus, cette protection était conférée en absence d'anticorps neutralisants détectables. Les auteurs suggèrent qu'un mécanisme de cytotoxicité médié par les anticorps pourrait être responsable de la protection. Une relation directe a également été mise en évidence entre la protection et le titre en anticorps du plasma des souris immunisées avec le peptide A/HA. Un titre plus élevé des plasmas des souris immunisées avec le peptide A/KLH explique sans doute la protection observée lors de nos expériences.

#### 4. LOCALISATION D'ÉPITOPES SUR LA STRUCTURE PRIMAIRE DE LA PROTÉINE S

La seconde approche considérée pour identifier les régions de la glycoprotéine S importantes à l'immunité anti-virale a été celle de l'analyse de la réactivité d'une banque d'AcMo contre différentes portions de la protéine S exprimées dans le vecteur procaryotique pEX. Notre étude a permis de localiser un domaine dans la sous-unité S2 avec lequel réagit la majorité des AcMo neutralisants reconnaissant des épitopes continus (Figure 28). Ce domaine a été exprimé sous forme de protéine de fusion avec la protéine de capsid du phage T7 dans le vecteur pET 3x. Nous avons démontré que la protéine de fusion était fortement reconnue par des antisérums de souris, de rat et de lapin dirigés contre le MHV-A59 (Figure 32). L'ensemble des résultats obtenus indique que ce domaine est immunodominant. De plus, le modèle structural connu suggère qu'il serait situé dans la tige du péplomère (de Groot *et al.* 1987a). Une réponse immunitaire spécifique au MHV-A59 mais non-protectrice a été induite chez

les souris immunisées avec la protéine de fusion (Figure 33). Il a été rapporté que l'immunisation de souris avec le fragment 14 de la banque d'expression pEX protège contre une épreuve virale avec le MHV-A59 (Koolen *et al.* 1990), tandis que le fragment 4, qui correspond approximativement au fragment amplifié dans notre étude, ne confère aucune protection (W.J.M. Spaan, communication personnelle). Toutefois, ces trois protéines de fusion contiennent l'épitope A et le domaine immunodominant. Ces résultats suggèrent que certains acides aminés du côté carboxy-terminal des domaines III et IV pourraient être importants à l'induction d'une réponse immunitaire protectrice, soit directement dans la formation d'épitopes et/ou dans la stabilisation de conformations spécifiques permettant l'induction de clones de lymphocytes B dont les anticorps sécrétés possèdent une affinité suffisante pour avoir une activité biologique.

Une observation intéressante que nous avons faite concerne la réactivité de l'AcMo J.2.2, dont il a été démontré par immunoprécipitation qu'il est spécifique à la souche MHV-JHM (Fleming *et al.* 1983). Cet anticorps réagit par contre avec des fragments de la glycoprotéine S du MHV-A59 exprimés dans le vecteur pEX ou pET 3x (Figure 24 et 31) et avec la glycoprotéine S dénaturée en immunoempreinte (résultat non-présenté). L'utilisation de variants différents du MHV-A59 pourrait expliquer cette nouvelle observation, d'autant plus que ce virus a une fréquence de mutation élevée (Gallagher *et al.* 1990; Banner et Lai 1991). Il est également possible que l'épitope reconnu par cet anticorps sur la glycoprotéine S du MHV-JHM en immunoprécipitation soit inaccessible sur la protéine S native du MHV-A59 mais soit rendu accessible par la dénaturation en immunoempreinte. De plus, nous avons remarqué que l'AcMo J.2.2

réagissait avec des fragments de la banque d'expression pEX ne se chevauchant pas, ce qui pourrait être expliqué par une réactivité de l'anticorps avec des acides aminés distants sur la structure primaire de la protéine qui formerait un site antigénique discontinu.

La majorité des anticorps dont l'épitope a été localisé dans la région immunodominante ont une activité neutralisante *in vitro*. Par contre, deux anticorps, E17 et 5B207.5, qui ne sont ni neutralisants, ni protecteurs *in vivo* et qui n'ont pas d'activité d'inhibition de fusion reconnaissent ce domaine et compétitionnent entre eux (E17 et 5B19.2, Tableau VIII). Ces observations pourraient être expliquées par une différence d'affinité pour la protéine S entre les anticorps n'ayant pas d'activité biologique (E17 et 5B207.5) et les anticorps neutralisants. Les courbes de liaison de l'anticorps E17 en ELISA (Figures 10 et 34) de même que la réactivité de l'anticorps en immunoempreinte (Figure 7) et en immunoprécipitation (résultat non-présenté) nous suggèrent que l'affinité de l'AcMo E17 est comparable à celle des anticorps neutralisants. D'autre part, nous pouvons proposer l'hypothèse que la neutralisation associée à ce domaine dépend d'acides aminés situés à l'extérieur de cette région ou que les acides aminés essentiels à la liaison des anticorps non-neutralisants diffèrent de ceux essentiels à la liaison d'anticorps neutralisants. Ceci impliquerait donc que l'activité biologique médiée par ce domaine serait restreinte à quelques acides aminés importants. Nous pouvons émettre l'hypothèse que le mécanisme de neutralisation des anticorps reconnaissant le domaine immunodominant ne serait pas l'encombrement stérique mais possiblement un mécanisme plus complexe. Par exemple, la liaison des anticorps aux acides aminés importants pourrait induire un changement conformationnel de la protéine affectant

l'activité biologique du domaine immunodominant (Cepica *et al.* 1990). Un mécanisme similaire de déstabilisation de la structure des péplomères a d'ailleurs été proposé pour expliquer l'activité d'inhibition de fusion de certains anticorps (Gallagher *et al.* 1991). D'autres expériences devront être réalisées pour définir précisément le mécanisme de neutralisation des AcMo se liant au domaine immunodominant et pour déterminer les acides aminés participants à la liaison de ces anticorps. Les techniques de synthèses peptidiques sur tiges (PEPSCAN, Geysen *et al.* 1987) ou l'analyse des clones d'une banque de phages exprimant des peptides ayant différentes affinités (Devlin *et al.* 1990) seraient particulièrement utiles pour réaliser ce dernier objectif.

## 5. MODÈLE RELATIONNEL DE LA STRUCTURE ANTIGÉNIQUE DE LA GLYCOPROTÉINE S

Des études de compétitions entre les différents AcMo disponibles ont été réalisées au laboratoire concurremment aux travaux présentés dans cette thèse et les résultats obtenus sont résumés au Tableau IX. L'analyse de ces résultats et de ceux obtenus avec la banque d'expression pEX nous a permis de proposer un modèle suggérant une relation topographique entre les épitopes discontinus reconnus par certains AcMo intéressants (Tableau VIII) et les épitopes continus identifiés sur la structure primaire de la glycoprotéine S (Figure 35). La compétition entre les AcMo A1 et J.2.2 ou 5B207.5 permet de relier topographiquement le site A identifié par Wege *et al.* (1984) au domaine III, dans lequel est inclus le site A identifié par Talbot *et al.* (1984b). Les sites B (AcMo 5A13.5) et C (AcMo 4B11.6) de Talbot *et al.* (1984b) pourraient également être indirectement reliés au domaine III par compétition avec les AcMo A1 et



J.2.2, quoique le manque de réciprocité des compétitions observées nous recommande la prudence dans l'interprétation de tels résultats. De plus, les sites E identifiés par Wege *et al.* (1984) et Talbot *et al.* (1984b) se chevauchent probablement étant donné que les anticorps E17 et 5B207.5 réagissent tous deux avec le peptide A. Finalement, il est intéressant de constater que certains AcMo qui compétitionnent entre eux, tels D12 et D14 ou E16 et E17 (Wege *et al.* 1984), reconnaissent des épitopes très distants sur la structure primaire de la protéine S. Certains sites antigéniques de la glycoprotéine S native pourraient donc être formés d'épitopes, situés sur S1 et S2, qui seraient rapprochés sur la structure tertiaire de la protéine. Ainsi, le domaine linéaire immunodominant identifié pourrait être une composante d'un domaine discontinu dont ferait partie les épitopes reconnus par les AcMo 4B11.6 et A1. L'analyse par diffraction de rayons-X de complexes antigène-anticorps cristallisés montre d'ailleurs que les épitopes sont généralement discontinus et sont formés de 15 à 22 acides aminés qui peuvent interagir avec le paratope (Arnon et van Regenmortel 1992). La définition de la structure tri-dimensionnelle de la protéine S permettra éventuellement de vérifier les hypothèses émises précédemment.

Les travaux de Stühler *et al.* (1991) ont montré que les acides aminés 395 à 401 de la portion S1 feraient partie de l'épitope reconnu par l'AcMo A1, ce qui situerait cet épitope entre les domaines I et II de notre étude (Figure 28). Cette conclusion est tirée de l'observation d'une compétition entre les AcMo A1 et 30B, dont l'épitope linéaire a été localisé à cette position. Nos travaux ont cependant démontré que des anticorps compétitionnant entre eux pouvaient avoir des sites de liaison éloignés sur la structure primaire de la protéine. Ainsi, bien que l'épitope de l'anticorps 30B et le site immunodominant puissent être



TABLEAU IX

Résumé des compétitions observées entre des AcMo spécifiques au MHV

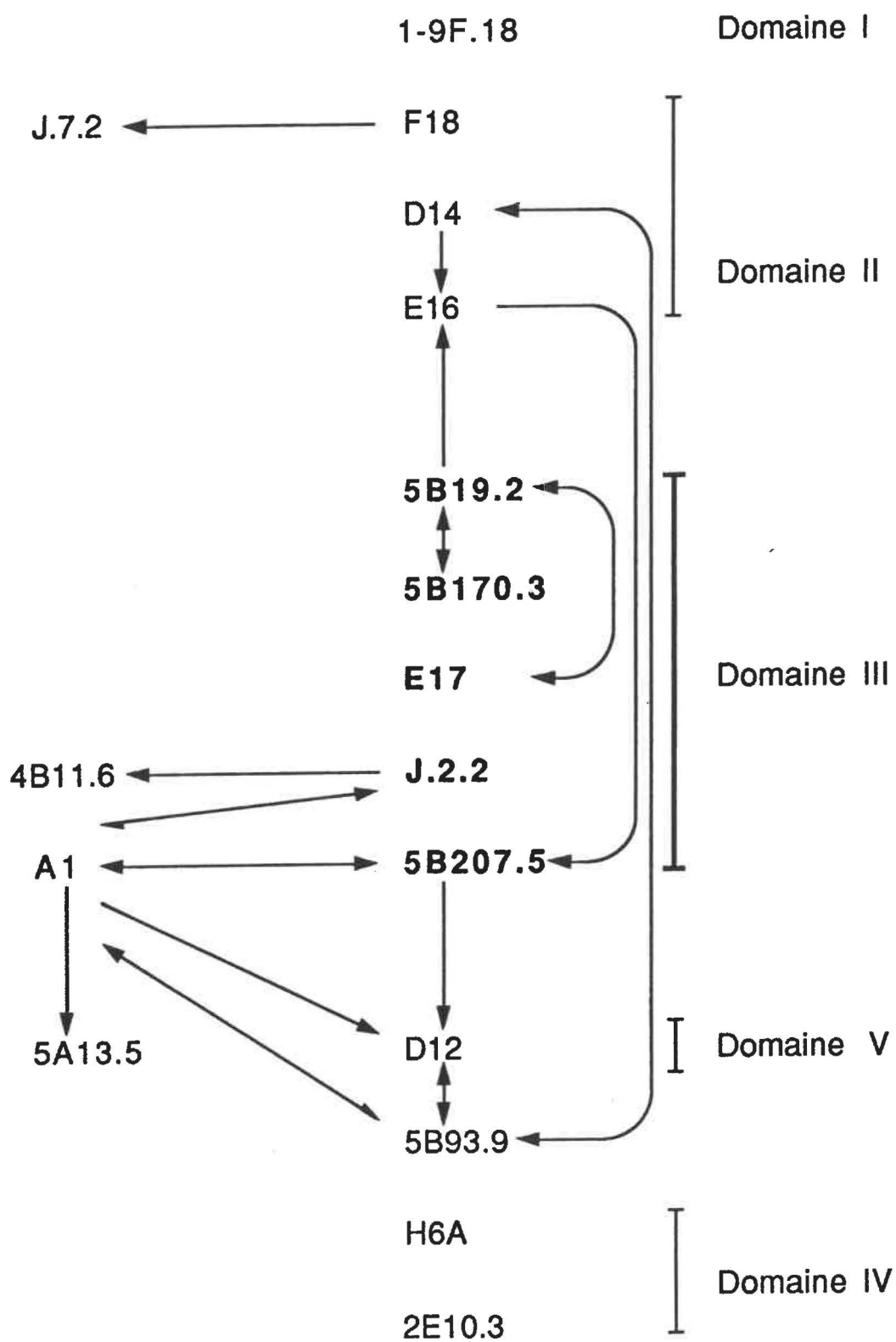
AcMo Compé- titeur	AcMo Biotinylé <sup>1</sup>																
	A1	B7	D12	D14	E16	E17	F18	J.2.2	J.7.2	J.7.5	J.7.6	5B19.2	5B170.3	5A13.5	4B11.6	5B93.9	5B207.5
A1	(+)	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+/-	+
A4	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B6	+/-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B7	-	(+)	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B35	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D12	-	-	(+)	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
D14	+/-	-	+	(+)	+	-	-	-	+/-	-	+	-	-	-	-	+	+/-
E16	+/-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	+
E17	+/-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+/-
F18	-	-	-	-	-	-	(+)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
J.7.18	+	+/-	-	-	-	-	-	+/-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
J.2.2	+/-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	+	-	-
J.7.2	+/-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	+	-	-	-	-	-	-	-
J.7.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J.1.16	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
J.2.5	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
J.7.5	+/-	-	+	-	+	-	-	-	+	(+)	+/-	-	-	-	-	-	+
J.7.6	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	(+)	-	-	+	-	-	-
J.2.6	+	-	-	-	+/-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
5B19.2	-	-	-	-	+	+	-	+/-	-	-	-	(+)	+	-	-	-	-
5B170.3	+/-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	+/-	+	(+)	-	-	-	-
5A13.5	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
4B11.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-
5B93.9	+	-	+	+	-	+/-	+/-	-	+/-	-	-	+/-	-	+	-	(+)	-
5B21.5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
5B207.5	+	-	+	+/-	-	-	-	-	+/-	-	+	-	-	-	-	+/-	(+)
5B216.8	+	+/-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+/-	+

<sup>1</sup> pourcentage de compétition entre l'AcMo compétiteur et l'AcMo biotinylé: +: >80% ; +/-: 35-75%; -: <20%; (+): homologue (cadre gras: compétitions réciproques +; cadre mince: compétitions réciproques + dans un sens mais +/- dans l'autre)

**Figure 35:** Modèle relationnel topographique d'épitopes continus et discontinus de la glycoprotéine S. Ce schéma résume les principaux résultats des études de compétition et de localisation d'épitopes. Les flèches à pointes entières représentent un pourcentage de compétition élevé (> 80%) par l'anticorps compétiteur. Une compétition partielle (35 à 75%) est représentée par une demi-pointe. Les anticorps réagissants avec le peptide A sont indiqués en caractères gras.

**Épitopes discontinus**

**Épitopes continus**



reliés topographiquement à l'épitope de l'anticorps A1, il est présomptueux d'établir le site de liaison de ce dernier à un endroit précis.

Récemment, les travaux de Wang *et al.* (1992) ont identifié les mutations présentes chez des variants ayant échappé à la neutralisation par des AcMo. Un variant sélectionné avec l'AcMo J.2.2 (variant 2.2-V-1) présentait une mutation ponctuelle au nucléotide 3340 dans la séquence du gène de la protéine S du MHV-JHM, position qui correspond au nucléotide 3184 pour le gène de la protéine S du MHV-A59 (Luytjes *et al.* 1987). Cette mutation est responsable du changement d'acide aminé leucine pour phénylalanine. La mutation observée est donc située plutôt loin du site de liaison de l'anticorps J.2.2, que nous avons identifié entre les nucléotides 2536 et 2574 du gène de la protéine S du MHV-A59, correspondant au peptide A (Figure 34). Cette mutation serait vraisemblablement responsable d'un changement conformationnel de la protéine rendant impossible la fixation de l'AcMo J.2.2 à son épitope. Toutefois, il demeure possible que la mutation soit située dans une portion d'un épitope discontinu ne pouvant être identifié par les techniques utilisées. L'analyse de variants de neutralisation obtenus en utilisant d'autres AcMo reconnaissant le peptide A permettrait possiblement d'établir une relation structurale entre les deux sites.

Un autre aspect intéressant des résultats obtenus par Wang *et al.* (1992) concerne l'analyse d'un révertant du variant 2.2-V-1. Ce révertant est demeuré partiellement sensible à la neutralisation par l'AcMo J.2.2 mais a conservé la pathogénie du variant 2.2-V-1, qui cause chez les souris infectées principalement une démyélinisation sans encéphalite létale. Étonnamment, le gène de la protéine S du révertant contenait la même mutation à la position

3340 que celui du variant 2.2-V-1 mais montrait une seconde mutation ponctuelle à la position 1994. De ces résultats, les auteurs ont suggéré d'une part que des sites sur les glycopeptides S1 et S2 pouvaient interagir et d'autre part, que les sites de fixation des anticorps et les sites biologiquement actifs sur la glycoprotéine S pouvaient être dissociés. Les résultats obtenus avec les anticorps topographiquement reliés, tel E16 et E17, corroborent la première hypothèse. De plus, l'ensemble des résultats suggèrent que la neutralisation et l'échappement à la neutralisation seraient médiés par des changements conformationnels de la protéine S, ce qui supporte la deuxième hypothèse. Rappelons que suite à la protection passive avec des AcMo dont l'épitope a été localisé dans le domaine III, ou à l'infection avec des variants de neutralisation sélectionnés avec ces anticorps, les souris survivent à l'infection mais présentent des signes d'infection démyélinisante (Buchmeier *et al.* 1984; Dalziel *et al.* 1986; Fleming *et al.* 1986), impliquant surtout les oligodendrocytes, et non les cellules neuronales. Les changements conformationnels de la glycoprotéine S affecteraient donc le tropisme pour les cellules neuronales sans affecter le tropisme pour les cellules gliales.

Les perspectives d'avenir faisant suite aux observations effectuées lors des travaux présentés dans cette thèse sont nombreuses. Une des premières études devant être réalisée serait l'identification du site de liaison des AcMo reconnaissant les domaines I, II, IV et V. Une localisation approximative pourrait être faite en utilisant le vecteur pET pour exprimer des banques de fragments de la protéine S obtenus par digestion par enzymes de restriction ou par délétions uni-directionnelles de fragments initialement réactifs. Le site de liaison des AcMo devrait par la suite être défini plus précisément à l'aide, entre

autres, de techniques de synthèse de peptides sur tiges (Geysen *et al.* 1987). La séquence complète d'une région de la protéine peut être synthétisée en peptides de différentes longueurs ne se chevauchant que par un acide aminé et ainsi définir la séquence minimale d'acides aminés nécessaires à la liaison de l'anticorps. Le remplacement de chaque acide aminé dans cette séquence permet par la suite de définir les acides aminés essentiels pour la reconnaissance de l'anticorps, soient ceux énergétiquement importants (Geysen *et al.* 1989). Ces techniques peuvent également être employées pour déterminer et comparer la spécificité des plasmas anti-peptides. L'élucidation des mécanismes de neutralisation et de protection des AcMo possédant ces activités est également prioritaire pour comprendre la fonction réelle du domaine immunodominant identifié. Il serait notamment important de savoir si les anticorps neutralisants empêchent l'adsorption du virus aux cellules ou une étape ultérieure du cycle de réplication (Suñé *et al.* 1990). De plus, l'utilisation de systèmes cellulaires plus représentatifs des tissus cibles *in vivo* pourrait s'avérer nécessaire. L'hypothèse de changements conformationnels proposée pourrait être vérifiée par un test ELISA récemment décrit (Cepica *et al.* 1990).

Éventuellement, l'analyse de variants de neutralisation ou d'autres types de variants ayant des variations dans la glycoprotéine S faciliterait la définition des domaines importants dans la pathogénie du virus ou dans la préservation de la conformation native de la protéine. Sur ce point, il est étonnant que des variants du MHV ayant des délétions de plus de 140 acides aminés conservent leur potentiel pathogène (Parker *et al.* 1989b). La construction de variants, par des techniques de recombinaison d'ARN (Koetzner *et al.* 1992), ayant des

modifications pré-déterminées s'avérerait un outil très puissant pour la poursuite de telles analyses.

Toutes ces techniques ont cependant une limite qui sera atteinte relativement rapidement et la structure antigénique et fonctionnelle réelle de la glycoprotéine S ne sera vraisemblablement connue que lorsque la structure tri-dimensionnelle de la protéine aura été déterminée.

Finalement, nous devons mentionner qu'au niveau de l'immunité anti-coronavirale, le champ d'étude que constitue l'immunité cellulaire ne commence qu'à être exploré comme en fait foi le peu de publications sur ce sujet. Les quelques résultats obtenus sur les populations de lymphocytes T activés lors de l'infection aiguë et de l'infection chronique sont particulièrement intéressants pour l'utilisation du coronavirus murin comme modèle animal d'étude de maladie neurologique (Körner *et al.* 1991; Mobley *et al.* 1992).

## CONCLUSION



Nous avons démontré que la glycoprotéine S purifiée par chromatographie d'immunoaffinité pouvait induire chez les souris immunisées la synthèse d'anticorps neutralisants et vacciner celles-ci contre une épreuve létale avec le MHV-A59, et ce malgré une dénaturation partielle de la protéine S. Nous avons également caractérisé deux épitopes discontinus faisant partie d'un même site antigénique mais dont les interactions nécessaires au maintien de la structure diffèrent. Nous avons utilisé l'approche des peptides synthétiques pour identifier les sites antigéniques de la protéine S. Aucun nouveau site biologiquement important n'a été identifié. Une différence d'immunogénicité des peptides couplés au KLH ou au BSA a cependant été mise en évidence. Finalement, une banque de fragments de la glycoprotéine S exprimés dans le vecteur d'expression procaryotique pEX a permis de localiser les sites de liaison d'anticorps monoclonaux sur la structure primaire de la S. Cinq domaines ont été identifiés, dont un site immunodominant associé à la neutralisation formé d'épitopes continus situés dans une portion de la sous-unité S2. Un fragment du gène de la protéine S comprenant le domaine immunodominant a été amplifié par réaction de polymérisation en chaîne et exprimé en fusion avec la protéine de capsid du phage T7 dans le vecteur pET. Des antisérums contre le MHV-A59 produits chez différentes lignées de souris, chez le rat ou le lapin, réagissent fortement avec ce domaine. Par contre, les souris immunisées avec la protéine de fusion n'ont pas été protégées contre une épreuve avec le MHV-A59. De plus, bien que la plupart des anticorps reconnaissant ce site neutralisent l'infectivité virale *in vitro*, d'autres sont dépourvus d'activité biologique. Ces résultats suggèrent un mécanisme de neutralisation impliquant l'induction d'un changement conformationnel de la protéine S.

## REMERCIEMENTS

En premier lieu, je désire remercier le docteur Pierre Talbot pour avoir accepté la direction de mes études graduées et pour la confiance qu'il m'a toujours témoignée. Je le remercie également pour l'opportunité offerte de m'intégrer à la communauté scientifique nationale et internationale par les participations aux congrès.

Je tiens à remercier madame Lidia Morelli, le docteur Lise Frappier-Davignon, le docteur Rolph Morosoli et le docteur Laurent Berthiaume pour avoir brisé le moule de l'immobilisme en acceptant mon passage au doctorat. Je suis aussi redevable au Dr Pierre Talbot sans qui cette initiative n'aurait pu être possible et qui m'a soutenu tout au cours de ma démarche.

Je remercie également les membres du laboratoire du Dr Talbot pour leur amitié, et plus particulièrement madame Francine Lambert et le Dr Samir Mounir pour le soutien occasionnel qu'ils m'ont fourni.

Je voudrais remercier monsieur Jean Pellerin, du service informatique de l'Institut pour la conception du logiciel d'analyse de séquences et monsieur Marc Vaillancourt pour les analyses au HPLC.

Un gros merci à la communauté étudiante de l'Institut, en particulier aux joueurs de hockey bottines avec qui j'ai pu me défouler le midi.

Enfin, j'adresse mes remerciements au Fond de formation des chercheurs et d'aide à la recherche, au Conseil de recherche en sciences naturelles et en

génie, ainsi qu'au Fond de recherche en santé du Québec pour m'avoir octroyé les bourses d'études qui m'ont permis de poursuivre ces études.

## BIBLIOGRAPHIE

- ARNON, R. et M.H.V. VAN REGENMORTEL. 1992. Structural basis of antigenic specificity and design of new vaccines. *FASEB J.* 6: 3265-3274.
- ARPIN, N. 1988. Identification et caractérisation des protéines structurales du coronavirus humain 229E. Mémoire de maîtrise en virologie, Institut Armand-Frappier.
- BAILEY, G.S. 1984. Immunodiffusion in gels. In: "*Methods in molecular biology. Proteins*". Walker, J. M. (Ed.), Humana Press, Clifton, NJ, pp. 301-310.
- BAKER, S.C. et M.M.C. LAI. 1990. An *in vitro* system for the leader-primed transcription of coronavirus messenger RNAs. *EMBO J.* 9: 4173-4179.
- BANNER, L.R., J.G. KECK et M.M.C. LAI. 1990. A clustering of RNA recombination sites adjacent to a hypervariable region of the peplomer gene of murine coronavirus. *Virology* 175: 548-555.
- BANNER, L.R. et M.M.C. LAI. 1991. Random nature of coronavirus RNA recombination in the absence of selection pressure. *Virology* 185: 441-445.
- BARIC, R.S., K. FU, M.C. SCHAAD et S.A. STOHLMAN. 1990. Establishing a genetic recombination map for murine coronavirus strain A59 complementation groups. *Virology* 177: 646-656.
- BARIC, R.S., S.A. STOHLMAN, M.K. RAZAVI et M.M.C. LAI. 1985. Characterization of leader-related small RNAs in coronavirus-infected cells: further evidence for leader-primed mechanism of transcription. *Virus Res.* 3: 19-33.
- BINNS, M.M., M.E.G. BOURSNEILL, F.M. TOMLEY et T.D.K. BROWN. 1986. Comparaison of the spike precursor sequence of coronavirus IBV strains M41 and 6/82 with that of IBV Beaudette. *J. Gen. Virol.* 67: 2825-2831.
- BOOTS, A.M.H., J.G. KUSTERS, B.A.M. VAN DER ZEIJST et HENSEN E.J. 1990. The nucleocapsid protein of IBV comprises immunodominant determinants recognized by T-cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 276: 189-197.

- BOURGEOIS, C., C. CORVAISIER, J.B. BOUR, E. KOHLI et P. POTHIER. 1991. Use of synthetic peptides to locate neutralizing antigenic domains on the fusion protein of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 72: 1051-1058.
- BOURSNELL, M.E.G., T.D.K. BROWN, I.J. FOULDS, P.F. GREEN, F.M. TOMLEY et M.M. BINNS. 1987. Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. *J. Gen. Virol.* 68: 57-77.
- BOYLE, J.F., D.G. WEISMILLER et K.V. HOLMES. 1987. Genetic resistance to mouse hepatitis virus correlates with absence of virus-binding activity on target tissues. *J. Virol.* 61: 185-189.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- BROWN, L.E., J.M. MURRAY, D.O. WHITE et D.C. JACKSON. 1990. An analysis of the properties of monoclonal antibodies directed to epitopes on the influenza virus hemagglutinin. *Arch. Virol.* 114: 1-26.
- BUCHMEIER, M.J., H.A. LEWICKI, P.J. TALBOT et R.L. KNOBLER. 1984. Murine hepatitis virus-4 (strain JHM)-induced neurologic disease is modulated *in vivo* by monoclonal antibody. *Virology* 132: 261-270.
- BUKOWSKI, J.F., B.A. WODA, S. HABU, K. OKUMURA et R.M. WELSH. 1983. Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis *in vivo*. *J. Immunol.* 131: 1531-1538.
- BURKS, J.S., B.L. DEVALD, L.D. JANKOVSKY et J.C. GERDES. 1980. Two coronaviruses isolated from central nervous system tissues of two multiple sclerosis patients. *Science* 209: 933-934.
- CALLEBAUT, P., I. CORREA, M. PENSAERT, G. JIMÉNEZ et L. ENJUANES. 1988. Antigenic differentiation between transmissible gastroenteritis virus of swine and a related porcine respiratory coronavirus. *J. Gen. Virol.* 69: 1725-1730.
- CAVANAGH, D. 1983. Coronavirus IBV: structural characterization of the spike protein. *J. Gen. Virol.* 64: 2577-2583.
- CAVANAGH, D., D.A. BRIAN, L. ENJUANES, K.V. HOLMES, M.M.C. LAI, H. LAUDE, S.G. SIDDELL, W. SPAAN, F. TAGUCHI et P.J. TALBOT. 1990.

Recommendations of the coronavirus study group for the nomenclature of the structural proteins, messenger RNAs, and genes of coronaviruses. *Virology* 176: 306-307.

CAVANAGH, D. et P.J. DAVIS. 1986. Coronavirus IBV - Removal of spike glycopolypeptide S1 by urea abolishes infectivity and hemagglutination but not attachment to cells. *J. Gen. Virol.* 67: 1443-1448.

CAVANAGH, D., P.J. DAVIS, J.H. DARBYSHIRE et R.W. PETERS. 1986. Coronavirus IBV - Virus retaining spike glycopolypeptide S2 but not S1 is unable to induce virus-neutralizing or hemagglutination-inhibiting antibody or induce chicken tracheal production. *J. Gen. Virol.* 67: 1435-1442.

CAVANAGH, D. et M.C. HORZINEK. 1993. Genus torovirus assigned to the *Coronaviridae*. *Arch. Virol.* 128: 395-396.

CEPICA, A., C. YASON et G. RALLING. 1990. The use of ELISA for detection of the antibody-induced conformational change in a viral protein and its intermolecular spread. *J. Virol. Methods* 28: 1-14.

CHALONER-LARSSON, G. et C.M. JOHNSON-LUSSENBERG. 1981. Establishment and maintenance of a persistent infection of L132 cells by human coronavirus strain 229E. *Arch. Virol.* 69: 117-129.

CHARLEY, B. et H. LAUDE. 1988. Induction of alpha interferon by transmissible gastroenteritis coronavirus: role of transmembrane glycoprotein E1. *J. Virol.* 62: 8-11.

CHEEVER, F.S., J.B. DANIELS, A.M. PAPPENHEIMER et O.T. BAILEY. 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.

CHIRGWIN, J.M., A.E. PRZYBYLA, R.J. MACDONALD et W.J. RUTTER. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18: 5294-5299.

COLLINS, A.R., R.L. KNOBLER, H. POWELL et 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* 119: 358-371.

- COMPTON, S.R., D.B. ROGERS, K.V. HOLMES, D. FERTSCH, J. REMENICK et J.J. MCGOWAN. 1987. *In vitro* replication of mouse hepatitis virus strain A59. *J. Virol.* 61: 1814-1820.
- CORREA, I., F. GEBAUER, M.J. BULLIDO, C. SUNE, M.F.D. BAAY, K.A. ZWAAGSTRA, W.P.A. POSTHUMUS, J.A. LENSTRA et L. ENJUANES. 1990. Localization of antigenic sites of the E2 glycoprotein of transmissible gastroenteritis coronavirus. *J. Gen. Virol.* 71: 271-279.
- CORREA, I., G. JIMENEZ, C. SUNE, M.J. BULLIDO et L. ENJUANES. 1988. Antigenic structure of the E2 glycoprotein from transmissible gastroenteritis coronavirus. *Virus Res.* 10: 77-94.
- DALZIEL, R.G., P.W. LAMPERT, P.J. TALBOT et M.J. BUCHMEIER. 1986. Site specific alteration of murine hepatitis virus type-4 (MHV-4) peplomer glycoprotein E2 results in reduced neurovirulence. *J. Virol.* 59: 463-471.
- DANIEL, C. et P.J. TALBOT. 1987. Physico-chemical properties of murine hepatitis virus, strain A59. *Arch. Virol.* 96: 241-248.
- DANIEL, C. et P.J. TALBOT. 1990. Protection from lethal coronavirus infection by affinity-purified spike glycoprotein of murine hepatitis virus, strain A59. *Virology* 174: 87-94.
- DE GROOT, R.J., W. LUYTJES, M.C. HORZINEK, B.A.M. VAN DER ZEIJST, W.J.M. SPAAN et J.A. LENSTRA. 1987a. Evidence for a coiled-coil structure in the spike proteins of coronaviruses. *J. Mol. Biol.* 196: 963-966.
- DE GROOT, R.J., J. MADURO, JA LENSTRA, M.C. HORZINEK, B.A.M. VAN DER ZEIJST et W.J.M. SPAAN. 1987b. cDNA cloning and sequence analysis of the gene encoding the peplomer protein of feline infectious peritonitis virus. *J. Gen. Virol.* 68: 2639-2646.
- DEA, S., S. GARZON et P. TIJSSSEN. 1989. Intracellular synthesis and processing of the structural glycoproteins of turkey enteric coronavirus. *Arch. Virol.* 106: 239-259.
- DEA, S., G. MARSOLAIS, J. BEAUBIEN et R. RUPPANNER. 1986. Coronaviruses associated with outbreaks of transmissible enteritis (Bluecomb) of turkeys in Quebec: hemagglutination properties and cell cultivation. *Avian Dis.* 30: 319-326.

- DEA, S. et P. TIJSSEN. 1989. Antigenic and polypeptide structure of turkey enteric coronaviruses as defined by monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* **70**: 1725-1741.
- DEA, S. et P. TIJSSEN. 1988. Identification of the structural proteins of turkey enteric coronavirus. *Arch. Virol.* **99**: 173-186.
- DEA, S., A.J. VERBEEK et P. TIJSSEN. 1990. Antigenic and genomic relationships among turkey and bovine enteric coronaviruses. *J. Virol.* **64**: 3112-3118.
- DELMAS, B., J. GELFI, R. L'HARIDON, L.K. VOGEL, H. SJÖSTRÖM, O. NORÉN et H. LAUDE. 1992. Aminopeptidase N is a major receptor for the enteropathogenic coronavirus TGEV. *Nature* **357**: 417-420.
- DELMAS, B., J. GELFI et H. LAUDE. 1986. Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus. 2. Domain in the peplomer glycoprotein. *J. Gen. Virol.* **67**: 1405-1418.
- DELMAS, B. et H. LAUDE. 1990. Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression. *J. Virol.* **64**: 5367-5375.
- DELMAS, B., D. RASSCHAERT, M. GODET, J. GELFI et H. LAUDE. 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.
- DENISON, M.R. et S. PERLMAN. 1987. Identification of a putative polymerase gene product in cells infected with murine coronavirus A59. *Virology* **157**: 565-568.
- DENISON, M.R. et S. PERLMAN. 1986. Translation and processing of mouse hepatitis virus virion RNA in a cell-free system. *J. Virol.* **60**: 12-18.
- DEREGT, D. et L.A. BABIUK. 1987. Monoclonal antibodies to bovine coronavirus : characteristics and topographical mapping of neutralizing epitopes on the E2 and E3 glycoproteins. *Virology* **161**: 410-420.
- DEVLIN, J.J., L.C. PANGANIBAN et P.E. DEVLIN. 1990. Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. *Science* **249**: 404-406.



- DOYLE, L.P. et L.M. HUTCHINGS. 1946. A transmissible gastroenteritis in pigs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 108: 257-259.
- DUBOIS-DALCQ, M.E., E.W. DOLLER, M.V. HASPEL et K.V. HOLMES. 1982. Cell tropism and expression of mouse hepatitis viruses (MHV) in mouse spinal cord cultures. *Virology* 119: 317-331.
- DVEKSLER, G.S., M.N. PENSIERO, C.B. CARDELLICCHIO, R.K. WILLIAMS, G.S. JIANG, K.V. HOLMES et C.W. DIEFFENBACH. 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.
- EMINI, E.A., J.V. HUGHES, D.S. PERLOW et J. BOGER. 1985. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J. Virol.* 55: 836-839.
- FLEMING, J.O., R.A. SHUBIN, M.A. SUSSMAN, N. CASTEEL et S.A. STOHLMAN. 1989. Monoclonal antibodies to the matrix (E1) glycoprotein of mouse hepatitis virus protect mice from encephalitis. *Virology* 168: 162-167.
- FLEMING, J.O., S.A. STOHLMAN, R.C. HARMON, M.M.C. LAI, J.A. FRELINGER et L.P. WEINER. 1983. Antigenic relationships of murine coronaviruses: Analyses using monoclonal antibodies to JHM (MHV-4) virus. *Virology* 131: 296-307.
- FLEMING, J.O., M.D. TROUSDALE, F.A.K. EL-ZAATARI, S.A. STOHLMAN et L.P. WEINER. 1986. Pathogenicity of antigenic variants of murine coronavirus JHM selected with monoclonal antibodies. *J. Virol.* 58: 869-875.
- FLEURY, H.J.A., R.D. SHEPPARD, M.B. BORNSTEIN et C.S. RAINE. 1980. Further ultrastructural observations of virus morphogenesis and myelin pathology in JHM virus encephalomyelitis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 6: 165-179.
- FRANA, M.F., J.N. BEHNKE, L.S. STURMAN et K.V. HOLMES. 1985. Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus: host-dependent differences in proteolytic cleavage and cell fusion. *J. Virol.* 56: 912-920.
- GALLAGHER, T.M., C. ESCARMIS et M.J. BUCHMEIER. 1991. Alteration of the pH dependence of coronavirus-induced cell fusion: Effect of mutations in the spike glycoprotein. *J. Virol.* 65: 1916-1928.

- GALLAGHER, T.M., S.E. PARKER et M.J. BUCHMEIER. 1990. Neutralization-resistant variants of a neurotropic coronavirus are generated by deletions within the amino-terminal half of the spike glycoprotein. *J. Virol.* **64**: 731-741.
- GEBAUER, F., W.P.A. POSTHUMUS, I. CORREA, C. SUNE, C. SMERDOU, C.M. SANCHEZ, J.A. LENSTRA, R.H. MELOEN et L. ENJUANES. 1991. Residues involved in the antigenic sites of transmissible gastroenteritis coronavirus S glycoprotein. *Virology* **183**: 225-238.
- GERDES, J.C., I. KLEIN, B. DEVALD et J.S. BURKS. 1981. Coronavirus isolates SK and SD from multiple sclerosis patients are serologically related to murine coronavirus A59 and JHM and human coronavirus OC43 but not to human coronavirus 229E. *J. Virol.* **38**: 231-238.
- GERNA, G., N. PASSARANI, M. BATTAGLIA et E.G. RONDANELLI. 1985. Human enteric coronaviruses: antigenic relatedness to human coronavirus OC43 and possible etiologic role in viral gastroenteritis. *J. Infect. Dis.* **151**: 796-803.
- GEYSEN, H.M., S.J. RODDA, T.J. MASON, G. TRIBBICK et P.G. SCHOOF. 1987. Strategies for epitope analysis using peptide synthesis. *J. Immunol. Methods* **102**: 259-274.
- GEYSEN, H.M., T.J. MASON et S.J. RODDA. 1989. Cognitive features of continuous antigenic determinants. In: *"Synthetic Peptides: Approaches to Biologic Problems"*. Alan R. Liss, pp. 19-30.
- GILMORE, W., J.O. FLEMING, S.A. STOHLMAN et L.P. WEINER. 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., R. L'HARIDON, J.-F. VAUTHEROT et H. LAUDE. 1992. TGEV coronavirus ORF4 encodes a membrane protein that is incorporated into virions. *Virology* **188**: 666-675.
- GREEN, N., H. ALEXANDER, A. OLSON, S. ALEXANDER, T.M. SHINNICK, J.G. SUTCLIFFE et R.A. LERNER. 1982. Immunogenic structure of the influenza virus hemagglutinin. *Cell* **28**: 477-487.
- GUESDON, J.L., T. TERNYNCK et S. AVRAMEAS. 1979. The use of avidin biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J. Histochem. Cytochem.* **27**: 1131-1139.

- HANAHAHAN, D. 1985. Techniques for transformation of *E. coli*. In: "DNA cloning, a practical approach". Glover, D. M. (Ed.), IRL Press, Oxford, England, pp. 109-135.
- HARLOW, E. et D. LANE. 1988. Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- HASONY, H.J. et M.R. MACNAUGHTON. 1981. Antigenicity of mouse hepatitis virus strain 3 subcomponents in C57 strain mice. *Arch. Virol.* 69: 33-41.
- HATEFI, Y. et W.G. HANSTEIN. 1969. Solubilization of particulate proteins and nonelectrolytes by chaotropic agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62: 1129-1136.
- HAWKES, R.A. 1979. General principles underlying laboratory diagnosis of viral infections. In: "Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections". Lennette, E. H., Schmidt, N. J. (Ed.), American Public Health Association, Washington, DC, pp. 34-35.
- HIRANO, N., K. FUJIWARA, S. HINO et M. MATUMOTO. 1974. Replication and plaque formation of mouse hepatitis virus (MHV-2) in mouse cell line DBT culture. *Arch. Ges. Virusforsch* 44: 298-302.
- HOFMANN, M.A., P.B. SETHNA et D.A. BRIAN. 1990. Bovine coronavirus mRNA replication continues throughout persistent infection in cell culture. *J. Virol.* 64: 4108-4114.
- HOLMES, K.V. 1990. Coronaviridae and their replication. In: "Virology". Fields, B., Knipe, D. M., Chanock, R. M., Hirsch, M. S., Melnick, J. L., Monath, T. P., Roizman, B. (Ed.), Raven Press Ltd, New York, pp. 841-856.
- HOLMES, K.V., R.M. WELSH et M.V. HASPEL. 1986. Natural cytotoxicity against mouse hepatitis virus infected target cells. I. Correlation of cytotoxicity with virus binding to leukocytes. *J. Immunol.* 136: 1446-1453.
- HOPP, T.P. 1986. Protein surface analysis. Methods for identifying antigenic determinants and other interaction sites. *J. Immunol. Methods* 88: 1-18.
- HOPP, T.P. et K.R. WOODS. 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 3824-3828.

- HORSFALL, A.C., F.C. HAY, A.J. SOLTYS et M.G. JONES. 1991. Epitope mapping. *Immunol. Today* 12: 211-213.
- JANIN, J. 1979. Surface and inside volumes in globular proteins. *Nature* 277: 491-492.
- JEMMERSON, R. et R. BLANKENFELD. 1989. Affinity consideration in the design of synthetic vaccines intended to elicit antibodies. *Mol. Immunol.* 26: 301-307.
- JOUVENNE, P., C.D. RICHARDSON, S.S. SCHREIBER, M.M.C. LAI et P.J. TALBOT. 1990. Sequence analysis of the membrane protein gene of human coronavirus 229E. *Virology* 174: 608-612.
- KAIGHN, M.E. et W.H.J. DOUGLAS. 1973. Isolation of clonal lines from normal rat lung with lung specific properties. *J. Cell Biol.* 59: 160a.
- KARPLUS, P.A. et G.E. SCHULZ. 1985. Prediction of chain flexibility in proteins. *Naturwissenschaften* 72: 212-213.
- KECK, J.G., G.K. MATSUSHIMA, S. MAKINO, J.O. FLEMING, D.M. VANNIER, S.A. STOHLMAN et M.M.C. LAI. 1988. *In vivo* RNA-RNA recombination of coronavirus in mouse brain. *J. Virol.* 62: 1810-1813.
- KING, B., B.J. POTTS et D.A. BRIAN. 1985. Bovine coronavirus hemagglutinin protein. *Virus Res.* 2: 53-59.
- KLENK, H.D. et R. ROTT. 1981. Cotranslational and post-translational processing of viral glycoproteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 90: 19-48.
- KOCH, G., L. HARTOG, A. KANT et D.J. VAN ROOZELAAR. 1990. Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: correlation with biological functions. *J. Gen. Virol.* 71: 1929-1935.
- KOETZNER, C.A., M.M. PARKER, C.S. RICARD, L.S. STURMAN et P.S. MASTERS. 1992. Repair and mutagenesis of the genome of a deletion mutant of the coronavirus mouse hepatitis virus by targeted RNA recombination. *J. Virol.* 66: 1841-1848.
- KOOI, C., M. CERVIN et R. ANDERSON. 1991. Differentiation of acid-pH-dependent and acid-pH-independent entry pathways for mouse hepatitis virus. *Virology* 180: 108-119.

- KOOI, C., L. MIZZEN, C. ALDERSON, M. DAYA et R. ANDERSON. 1988. Early events of importance in determining host cell permissiveness to mouse hepatitis virus infection. *J. Gen. Virol.* 69: 1125-1135.
- KOOLEN, M.J.M., M.A.J. BORST, M.C. HORZINEK et 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: 6270-6273.
- KOOLEN, M.J.M., S. LOVE, W. WOUUDA, J. CALAFAT, M.C. HORZINEK et B.A.M. VAN DER ZEIJST. 1987. Induction of demyelination by a temperature-sensitive mutant of the coronavirus MHV-A59 is associated with restriction of viral replication in the brain. *J. Gen. Virol.* 68: 703-714.
- KÖRNER, H., A. SCHLIEPHAKE, J. WINTER, F. ZIMPRICH, H. LASSMANN, J. SEDGWICK, S. SIDDELL et H. WEGE. 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.
- KRYSTYNIAK, K. et J.M. DUPUY. 1981. Early interaction between mouse hepatitis virus 3 and cells. *J. Gen. Virol.* 57: 53-61.
- KUSTERS, J.G., E.J. JAGER, J.A. LENSTRA, G. KOCH, W.P.A. POSTHUMUS, R.H. MELOEN et B.A.M. VAN DER ZEIJST. 1989. Analysis of an immunodominant region of infectious bronchitis virus. *J. Immunol.* 143: 2692-2698.
- KYTE, J. et R.F. DOOLITTLE. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132.
- KYUWA, S., K. YAMAGUCHI, Y. TOYODA et K. FUJIWARA. 1991. Induction of self-reactive T-cells after murine coronavirus infection. *J. Virol.* 65: 1789-1795.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- LAI, M.M.C. 1986. Coronavirus leader-RNA-primed transcription: an alternative mechanism to RNA splicing. *BioEssays* 5: 257-260.

- LAI, M.M.C. 1990. Coronavirus - Organization, replication and expression of genome. *Ann. Rev. Microbiol.* **44**: 303-333.
- LAI, M.M.C., C.D. PATTON, R.S. BARIC et S.A. STOHLMAN. 1983. Presence of leader sequences in the mRNA of mouse hepatitis virus. *J. Virol.* **46**: 1027-1033.
- LAI, M.M.C. et S.A. STOHLMAN. 1981. Comparative analysis of RNA genomes of mouse hepatitis viruses. *J. Virol.* **38**: 661-670.
- LAMARRE, A. et P.J. TALBOT. 1989. Effect of pH and temperature on the infectivity of human coronavirus 229E. *Can. J. Microbiol.* **35**: 972-974.
- LAMONTAGNE, L. et J.-M. DUPUY. 1984. Persistent infection with mouse hepatitis virus type 3 in mouse lymphoid cell line. *Infect. Immun.* **44**: 716-723.
- LAMPERT, P.W., J.K. SIMS et A.J. KNIASOFF. 1973. Mechanism of demyelination in JHM virus encephalomyelitis. *Acta Neuropathol.* **24**: 76-85.
- LAUDE, H., J. GELFI, L. LAVENANT et B. CHARLEY. 1992. Single amino acid changes in the viral glycoprotein M affect induction of alpha-interferon by the coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *J. Virol.* **66**: 743-749.
- LAVIER, W.G., G.M. AIR, R.G. WEBSTER et S.J. SMITHGILL. 1990. Epitopes on protein antigens: misconceptions and realities. *Cell* **61**: 553-556.
- LAVI, E., D.H. GILDEN, Z. WROBLEWSKA, L.B. RORKE et S.R. WEISS. 1984. Experimental demyelination produced by the A59 strain of mouse hepatitis virus. *Neurology* **34**: 597-603.
- LAVI, E., E.M. MURRAY, S. MAKINO, S.A. STOHLMAN, M.M.C. LAI et S.R. WEISS. 1990. Determinants of coronavirus MHV pathogenesis are localized to 3' portions of the genome as determined by ribonucleic acid-ribonucleic acid recombination. *Lab. Invest.* **62**: 570-578.
- LECOMTE, J., V. CAINELLI-GEHARA, G. MERCIER, S. MANSOUR, P.J. TALBOT, G. LUSSIER et D. OTH. 1987. Protection from mouse hepatitis virus type 3-induced acute disease by an anti-nucleoprotein monoclonal antibody. *Arch. Virol.* **97**: 123-130.

- LEE, H.J., C.K. SHIEH, A.E. GORBALENYA, E.V. KOONIN, N. LAMONICA, J. TULER, A. BAGDZHADZHIAN et M.M.C. LAI. 1991. The complete sequence (22 kilobases) of murine coronavirus gene 1 encoding the putative proteases and RNA polymerase. *Virology* 180: 567-582.
- LEIBOWITZ, J.L., S. PERLMAN, G. WEINSTOCK, J.R. DEVRIES, C. BUDZILOWICZ, J.M. WEISSEMANN et S.R. WEISS. 1988. Detection of a murine coronavirus nonstructural protein encoded in a downstream open reading frame. *Virology* 164: 156-164.
- LENSTRA, J.A., J.G. KUSTERS, G. KOCH et B.A.M. VAN DER ZEIJST. 1989. Antigenicity of the peplomer protein of infectious bronchitis virus. *Mol. Immunol.* 26: 7-15.
- LERNER, R.A. 1984. Antibodies of predetermined specificity in biology and medicine. *Adv. Immunol.* 36: 1-44.
- LERNER, R.A. 1982. Tapping the immunological repertoire to produce antibodies of predetermined specificity. *Nature* 299: 592-596.
- LIU, D.X., D. CAVANAGH, P. GREEN et S.C. INGLIS. 1991. A polycistronic mRNA specified by the coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology* 184: 531-544.
- LIU, D.X. et S.C. INGLIS. 1991. Association of the infectious bronchitis virus 3c protein with the virion envelope. *Virology* 185: 911-917.
- LUYTJES, W., P.J. BREDENBEEK, A.F.H. NOTEN, M.C. HORZINEK et W.J.M. SPAAN. 1988. Sequence of mouse hepatitis virus A59 mRNA2: indications for RNA recombination between coronaviruses and influenza C virus. *Virology* 166: 415-422.
- LUYTJES, W., D. GEERTS, W. POSTHUMUS, R. MELOEN et W. SPAAN. 1989. Amino acid sequence of a conserved neutralizing epitope of murine coronaviruses. *J. Virol.* 63: 1408-1412.
- LUYTJES, W., L.S. STURMAN, P.J. BREDENBEEK, J. CHARITE, B.A.M. VAN DER ZEIJST, M.C. HORZINEK et W.J.M. SPAAN. 1987. Primary structure of the glycoprotein E2 of coronavirus MHV-A59 and identification of the trypsin cleavage site. *Virology* 161: 479-487.



- MACHAMER, C.E. et J.K. ROSE. 1987. A specific transmembrane domain of a coronavirus E1 glycoprotein is required for its retention in the Golgi region. *J. Cell Biol.* 105: 1205-1214.
- MÄKELÄ, M.J., G.A. LUND et A. SALMI. 1989a. Antigenicity of the measles virus haemagglutinin studied by using synthetic peptides. *J. Gen. Virol.* 70: 603-.
- MÄKELÄ, M.J., A.A. SALMI, E. NORRBY et T.F. WILD. 1989b. Monoclonal antibodies against measles virus haemagglutinin react with synthetic peptides. *Scand. J. Immunol.* 30: 225-231.
- MAKINO, S., J.O. FLEMING, J.G. KECK, S.A. STOHLMAN et M.M.C. LAI. 1987. RNA recombination of coronaviruses: Localization of neutralizing epitopes and neuropathogenic determinants on the carboxyl terminus of peplomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6567-6571.
- MAKINO, S., C.-K SHIEH, J.G. KECK et M.M.C. LAI. 1988. Defective-interfering particles of murine coronaviruses: mechanisms of synthesis of defective viral RNAs. *Virology* 163: 104-111.
- MAKINO, S., S.A. STOHLMAN et M.M.C. LAI. 1986. Leader sequences of murine coronavirus mRNAs can be freely reassorted: evidence for the role of free leader RNA in transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4204-4208.
- MANCINI, G., A.D. CARBONARA et J.F. HEREMANS. 1965. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2: 235-254.
- MANIL, L., P. MOTTÉ, P. PERRAS, F. TROALEN, C. BOHUON et D. BELLET. 1986. Evaluation of protocols for purification of mouse monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods* 90: 25-37.
- MASSA, P.T., R. DÖRRIES et V. TER MEULEN. 1986. Viral particles induce Ia antigen expression on astrocytes. *Nature* 320: 543-546.
- MASSA, P.T., R. BRINKMANN et V. TER MEULEN. 1987. Inducibility of Ia antigen on astrocytes by murine coronavirus JHM is rat strain dependent. *J. Exp. Med.* 166: 259-264.



- MCFARLIN, D.E. et H.F. MCFARLAND. 1982. Multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 307: 1246-1251.
- MCINTOSH, K. 1974. Coronaviruses. A comparative review. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 63: 85-129.
- MENDELMAN, P.M., L.D. JANKOVSKY, R.S. MURRAY, P. LICARI, B. DEVALD, J.C. GERDES et J.S. BURKS. 1983. Pathogenesis of coronavirus SD in mice. I. Prominent demyelination in the absence of infectious virus production. *Arch. Neurol.* 40: 493-498.
- MOBLEY J, EVANS G, DAILEY MO et PERLMAN S. 1992. Immune response to a murine coronavirus: identification of a homing receptor-negative CD4+ T cell subset that responds to viral glycoproteins. *Virology* 187: 443-52.
- MOCKETT, A.P.A. 1985. Envelope proteins of avian infectious bronchitis virus: purification and biological properties. *J. Virol. Methods* 12: 271-278.
- MOCKETT, A.P., D. CAVANAGH et T.D. BROWN. 1984. Monoclonal antibodies to the S1 spike and membrane proteins of avian infectious bronchitis coronavirus strain Massachusetts M41. *J. Gen. Virol.* 65: 2281-2286.
- MOUNIR, S. et P.J. TALBOT. 1993a. Human coronavirus OC43 RNA-4 lacks 2 open reading frames located downstream of the S gene of bovine coronavirus. *Virology* 192: 355-360.
- MOUNIR, S. et P.J. TALBOT. 1993b. Molecular characterization of the S protein gene of human coronavirus OC43. *J. Gen. Virol.* (sous presse).
- MOUNIR, S. et P.J. TALBOT. 1992. Sequence analysis of the membrane protein gene of human coronavirus OC43 and evidence for O-glycosylation. *J. Gen. Virol.* 73: 2731-2736.
- MURRAY, R.S., B. BROWN, D. BRIAN et G.F. CABIRAC. 1992a. Detection of coronavirus RNA and antigen in multiple sclerosis brain. *Ann. Neurol.* 31: 525-33.
- MURRAY, R.S., G.Y. CAI, K. HOEL, J.Y. ZHANG, K.F. SOIKE et G.F. CABIRAC. 1992b. Coronavirus infects and causes demyelination in primate central nervous system. *Virology* 188: 274-284.

- NAKANAGA, K., K. YAMANOUCHI et K. FUJIWARA. 1986. Protective effect of monoclonal antibodies on lethal mouse hepatitis virus infections in mice. *J. Virol.* 59: 168-171.
- NODA, M., H. YAMASHITA, et F. KOIDE. 1987. Hemagglutination with transmissible gastroenteritis virus. *Arch. Virol.* 96: 109-115.
- OAKLEY, B.R., D.R. KIRSCH et N.R. MORRIS. 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 105: 361-363.
- PARKER, J.M.R., D. GUO et R.S. HODGES. 1986. A new hydrophilicity scale derived from HPLC peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray derived accessible sites. *Biochemistry* 25: 5425-5432.
- PARKER, M.D., G.J. COX, D. DEREGT, D.R. FITZPATRICK et L.A. BABIUK. 1989a. Cloning and *in vitro* expression of the gene for the E3 haemagglutinin glycoprotein of bovine coronavirus. *J. Gen. Virol.* 70: 155-164.
- PARKER, M.D., D. YOO, G.J. COX et L.A. BABIUK. 1990. Primary structure of the S peplomer gene of bovine coronavirus and surface expression in insect cells. *J. Gen. Virol.* 71: 263-270.
- PARKER, S.E., T.M. GALLAGHER et M.J. BUCHMEIER. 1989b. Sequence analysis reveals extensive polymorphism and evidence of deletions within the E2 glycoprotein gene of several strains of murine hepatitis virus. *Virology* 173: 664-673.
- PEDERSEN, N.C. 1987. Virologic and immunologic aspects of feline infectious peritonitis virus infection. *Adv. Exp. Med. Biol.* 218: 529-550.
- PELLEQUER, J.L., E. WESTHOF et M.H.V. VAN REGENMORTEL. 1991. Overview of methods for predicting the location of continuous epitopes in proteins from their primary structures. *Meth. Enzymol.* 203: 176-201.
- PIKE, B.V. et D.J. GARWES. 1977. Lipids of transmissible gastroenteritis virus and their relation to those of two different host cells. *J. Gen. Virol.* 34: 531-535.

- RAABE, T., B. SCHELLEPRINZ et S.G. SIDDELL. 1990. Nucleotide sequence of the gene encoding the spike glycoprotein of human coronavirus HCV-229E. *J. Gen. Virol.* 71: 1065-1073.
- RASSCHAERT, D., B. DELMAS, B. CHARLEY, J. GROSCLAUDE, J. GELFI et H. LAUDE. 1987. Surface glycoproteins of transmissible gastro enteritis virus: functions and sequence. *Adv. Exp. Med. Biol.* 218: 109-116.
- RASSCHAERT, D., M. DUARTE et H. LAUDE. 1990. Porcine respiratory coronavirus differs from transmissible gastroenteritis virus by a few genomic deletions. *J. Gen. Virol.* 71: 2599-2607.
- ROSE, G.D., A.R. GESELOWITZ, G.J. LESSER, R.H. LEE et M.H. ZEHFUS. 1985. Hydrophobicity of amino acid residues in globular proteins. *Science* 229: 834-838.
- ROTTIER, P., J. ARMSTRONG et D.I. MEYER. 1985. Signal recognition particle-dependent insertion of coronavirus E1, an intracellular membrane glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 260: 4648-4652.
- ROTTIER, P.J.M., J.K. LOCKER, M.C. HORZINEK et W.J.M. SPAAN. 1990. Expression of MHV-A59 M glycoprotein: effects of deletions on membrane integration and intracellular transport. *Adv. Exp. Med. Biol.* 276: 127135.
- ROTTIER, P.J.M. et J.K. ROSE. 1987. Coronavirus E1 glycoprotein expressed from cloned cDNA localizes in the Golgi region. *J. Virol.* 61: 2042-2045.
- ROTTIER, P.J.M., G.W. WELLING, S. WELLING-WESTER, H.G.M. NIESTERS, J.A. LENSTRA et B.A.M. VAN DER ZEIJST. 1986. Predicted membrane topology of the coronavirus protein E1. *Biochemistry* 25: 1339-1346.
- ROUTLEDGE, E., R. STAUBER, M. PFLEIDERER et S.G. SIDDELL. 1991. Analysis of murine coronavirus surface glycoprotein functions by using monoclonal antibodies. *J. Virol.* 65: 254-262.
- ROUTLEDGE, E.G., M.M. WILLCOCKS, A.C.R. SAMSON, L. MORGAN, R. SCOTT, J.J. ANDERSON et G.L. TOMS. 1988. The purification of four respiratory syncytial virus proteins and their evaluation as protective agents against experimental infection in BALB/c mice. *J. Gen. Virol.* 69: 293-303.

- SALMI, A., B. ZIOLA, T. HOVI et M. REUNANEN. 1982. Antibodies to coronaviruses OC43 and 229E in multiple sclerosis patients. *Neurology* 32: 292-295.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH et T. MANIATIS. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- SAWICKI, S.G. 1987. Characterization of a small plaque mutant of the A59 strain of mouse hepatitis virus defective in cell fusion. *Adv. Exp. Med. Biol.* 218: 169-174.
- SAWICKI, S.G. et D.L. SAWICKI. 1990. Coronavirus transcription - subgenomic mouse hepatitis virus replicative intermediates function in RNA synthesis. *J. Virol.* 64: 1050-1056.
- SCHALK, A. et M.C. HAWN. 1931. An apparently new respiratory disease of baby chicks. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 78: 413-422.
- SCHEID, A. et P.W. CHOPPIN. 1977. Two disulfide-linked polypeptide chains constitute the active F protein of paramyxoviruses. *Virology* 80: 54-66.
- SCHMIDT, I., M. SKINNER et S. SIDDELL. 1987. Nucleotide sequence of the gene encoding the surface projection glycoprotein of coronavirus MHV-JHM. *J. Gen. Virol.* 68: 47-56.
- SCHULTZE, B., H.J. GROSS, R. BROSSMER et G. HERRLER. 1991a. The S protein of bovine coronavirus is a hemagglutinin recognizing 9-O-acetylated sialic acid as a receptor determinant. *J. Virol.* 65: 6232-6237.
- SCHULTZE, B., K. WAHN, H.D. KLENK et G. HERRLER. 1991b. Isolated HE-protein from hemagglutinating encephalomyelitis virus and bovine coronavirus has receptor-destroying and receptor-binding activity. *Virology* 180: 221-228.
- SCHWARZ, B., E. ROUTLEDGE et S.G. SIDDELL. 1990. Murine coronavirus nonstructural protein ns2 is not essential for virus replication in transformed cells. *J. Virol.* 64: 4784-4791.
- SETHNA, P.B., S.-L HUNG et D.A. BRIAN. 1989. Coronavirus subgenomic minus-strand RNAs and the potential for mRNA replicons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5626-5630.

- SHESHBERADARAN, H. 1991. Exposure to acidic pH causes irreversible conformational changes in the measles virus hemagglutinin. *Arch. Virol.* **117**: 305-311.
- SIDDELL, S.H., H. WEGE et V. TER MEULEN. 1983. The biology of coronaviruses. *J. Gen. Virol.* **64**: 761-776.
- SIDDELL, S., H. WEGE et V. TER MEULEN. 1982. The structure and replication of coronaviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **99**: 131-163.
- SMITH, M.S., R.E. CLICK et P.G.W. PLAGEMANN. 1984. Control of MHV replication in macrophages by a recessive gene on chromosome 7. *J. Immunol.* **133**: 428-432.
- SPAAN, W., D. CAVANAGH et M.C. HORZINEK. 1990. Coronaviruses. *In: "Immunochemistry of viruses II. The basis for serodiagnosis and vaccines"*. van Regenmortel, M. V. H., Neurath, A. R. (Ed.), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, pp. 359-379.
- SPAAN, W.J.M., H. VENNEMA, R. DE GROOT, M.C. HORZINEK, D. HARBOUR ET T. GRUFFRYDD-JONES. 1989. Early death after challenge with feline infectious peritonitis virus of kittens immunized with a recombinant vaccine virus expressing the FIPV spike protein. *In: "Vaccines '89: modern approaches to new vaccines including prevention of AIDS"*. Lerner, R. A., Ginsberg, H., Chanock, R. M., Brown, F. (Ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 491-496.
- STAUBER, R., M. PFLEIDERERA et S. SIDDELL. 1993. Proteolytic cleavage of the murine coronavirus surface glycoprotein is not required for fusion activity. *J. Gen. Virol.* **74**: 183-191.
- STEWART, J.N., S. MOUNIR et P.J. TALBOT. 1992. Human coronavirus gene expression in the brains of multiple sclerosis patients. *Virology* **191**: 502-5.
- STOHLMAN, J.A., R.S. BARIC, G.N. NELSON, L.H. SOE, L.M. WELTER et R.J. DEANS. 1988. Specific interaction between coronavirus leader RNA and nucleocapsid protein. *J. Virol.* **62**: 4288-4295.
- STOHLMAN, S.A., G.R. MATSUSHIMA, N. CASTEEL et L.P. WEINER. 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.

- STORZ, J., R. ROTT et G. KALUZA. 1981. Enhancement of plaque formation and cell fusion of an enteropathogenic coronavirus by trypsin treatment. *Infect. Immun.* 31: 1214-1222.
- STRYNADKA, N.C.J., M.J. REDMOND, J.M.R. PARKER, D.G. SCRABA et R.S. HODGES. 1988. Use of synthetic peptides to map the antigenic determinants of glycoprotein D of herpes simplex virus. *J. Virol.* 62: 3474-3483.
- STUDIER, F.W., A.H. ROSENBERG, J.J. DUNN et J.W. DUBENDORFF. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct the expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185: 60-89.
- STÜHLER, A., H. WEGE et S.G. SIDDELL. 1991. Localization of antigenic sites on the surface glycoprotein of mouse hepatitis virus. *J. Gen. Virol.* 72: 1655-1658.
- STURMAN, L.S., C.S. RICARD et K.V. HOLMES. 1990. Conformational change of the coronavirus peplomer glycoprotein at pH 8.0 and 37°C correlates with virus aggregation and virus-induced cell fusion. *J. Virol.* 64: 3042-3050.
- STURMAN, L.S., C.S. RICARD et K.V. HOLMES. 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.
- SUGIYAMA, K., R. ISHIKAWA et N. FUKUHARA. 1986. Structural polypeptides of the murine coronavirus DVIM. *Ach Virol* 89: 245-254.
- SUGRUE, R.J. et A.J. HAY. 1991. Structural characteristics of the M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel. *Virology* 180: 617-624.
- SUÑÉ, C., G. JIMENEZ, I. CORREA, M.J. BULLIDO, F. GEBAUER, C. SMERDOU et L. ENJUANES. 1990. Mechanisms of transmissible gastroenteritis coronavirus neutralization. *Virology* 177: 559-569.
- SUZUMURA, A., E. LAVI, S.R. WEISS et D.H. SILBERBERG. 1986. Coronavirus infection induces H-2 antigen expression on oligodendrocytes and astrocytes. *Science* 232: 991-993.
- TAGUCHI, F. 1993. Fusion formation by the uncleaved spike protein of murine coronavirus JHMV variant cl-2. *J. Virol.* 67: 1195-1202.

- SUZUMURA, A., E. LAVI, S.R. WEISS et D.H. SILBERBERG. 1986. Coronavirus infection induces H-2 antigen expression on oligodendrocytes and astrocytes. *Science* 232: 991-993.
- TAGUCHI, F. 1993. Fusion formation by the uncleaved spike protein of murine coronavirus JHMV variant cl-2. *J. Virol.* 67: 1195-1202.
- TAKASE-YODEN, S., T. KIKUCHI, S.G. SIDDELL et F. TAGUCHI. 1991. Localization of major neutralizing epitopes on the S1 polypeptide of the murine coronavirus peplomer glycoprotein. *Virus Res.* 18: 99-107.
- TALBOT, P.J. 1989. Technique d'injection des animaux. In: "*Manuel de techniques virologiques*". Payment, P., Trudel, M. (Ed.), Presses de l'Université du Québec, Québec, pp. 57-60.
- TALBOT, P.J. et M.J. BUCHMEIER. 1985. Antigenic variation among murine coronaviruses: evidence for polymorphism on the peplomer glycoprotein E2. *Virus Res.* 2: 317-328.
- TALBOT, P.J. et C. DANIEL. 1987. Influence of the cell cycle on the infectious titer of murine hepatitis virus, strain A59. *Adv. Exp. Med. Biol.* 218: 267-268.
- TALBOT, P.J. et P. JOUVENNE. 1992. Le potentiel neurotrope des coronavirus. *Médecine/Sciences* 8: 119-125.
- TALBOT, P.J., G. DIONNE et M. LACROIX. 1988. Vaccination against lethal coronavirus-induced encephalitis with a synthetic decapeptide homologous to a domain in the predicted peplomer stalk. *J. Virol.* 62: 3032-3036.
- TALBOT, P.J., R.L. KNOBLER et M.J. BUCHMEIER. 1984a. Western and dot immunoblotting analysis of viral antigens and antibodies: application to murine hepatitis virus. *J. Immunol. Methods* 73: 177-188.
- TALBOT, P.J., A.A. SALMI, R.L. KNOBLER et M.J. BUCHMEIER. 1984b. Topographical mapping of epitopes on the glycoproteins of murine hepatitis virus-4 (strain JHM): correlation with biological activities. *Virology* 132: 250-260.
- TANAKA, R., Y. IWASAKI et H.J. KOPROWSKI. 1976. Intracisternal virus-like particles in the brain of a multiple sclerosis patient. *J. Neurol. Sci.* 28: 121-.



- TYRRELL, D.A.J., J.D. ALMEIDA, D.M. BERRY, C.H. CUNNINGHAM, D. HAMRE, M.S. HOFSTAD, L. MALLUCCI et K. MCINTOSH. 1968. Coronaviruses. *Nature* 220: 650.
- TYRRELL, D.A.J., J.D. ALMEIDA, C.H. CUNNINGHAM, W.R. DOWDLE, M.S. HOFSTAD, K. MCINTOSH, M. TEJIMA, L.Y.A. ZAKSTELSKAYA, B.C. EASTERDAY, A.Z. KAPIKIAN et R.W. BINGHAM. 1975. *Coronaviridae*. *Intervirology* 5: 76-82.
- TYRRELL, D.A.J. et M.L. BYNOE. 1965. Cultivation of a novel type of common-cold virus in organ cultures. *Br. Med. J.* 1: 1467-1470.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V. 1989. Structural and functional approaches to the study of protein antigenicity. *Immunol. Today* 10: 266-272.
- VAN REGENMORTEL, M.V.H. et G. DANNEY DE MARCILLAC. 1988. An assessment of prediction methods for locating continuous epitopes in proteins. *Immunol. Lett.* 17: 95-108.
- VENNEMA, H., L. HEIJNEN, A. ZIJDERVELD, M.C. HORZINEK et W.J.M. SPAAN. 1990. Intracellular transport of recombinant coronavirus spike proteins: Implications for virus assembly. *J. Virol.* 64: 339-346.
- VERBEEK, A. et P. TIJSSEN. 1991. Sequence analysis of the turkey enteric coronavirus nucleocapsid and membrane protein genes: a close genomic relationship with bovine coronavirus. *J. Gen. Virol.* 72: 1659-1666.
- VLASAK, R., W. LUYTJES, J. LEIDER, W. SPAAN et P. PALESE. 1988a. The E3 protein of bovine coronavirus is a receptor-destroying enzyme with acetylsterase activity. *J. Virol.* 62: 4686-4690.
- VLASAK, R., W. LUYTJES, W. SPAAN et P. PALESE. 1988b. Human and bovine coronaviruses recognize sialic acid-containing receptors similar to those of influenza C viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4526-4529.
- VON HIPPEL, P.H. et K.-Y WONG. 1964. Neutral salts: The generality of their effects on the stability of macromolecular conformations. *Science* 145: 577-580.
- WANG, F.I., J.O. FLEMING et M.M.C. LAI. 1992. Sequence analysis of the spike protein gene of murine coronavirus variants: Study of genetic sites affecting neuropathogenicity. *Virology* 186: 742-749.



- WANG, F.I., S.A. STOHLMAN et J.O. FLEMING. 1990. Demyelination induced by murine hepatitis virus JHM strain (MHV-4) is immunologically mediated. *J. Neuroimmunol.* 30: 31-41.
- WATANABE, R., H. WEGE et V. TER MEULEN. 1983. Adoptive transfer of EAE-like lesions from rats with coronavirus-induced demyelinating encephalomyelitis. *Nature* 305: 150-153.
- WEGE, H., R. DORRIES et H. WEGE. 1984. Hybridoma antibodies to the murine coronavirus JHM: characterization of epitopes on the peplomer protein (E2). *J. Gen. Virol.* 65: 1931-1942.
- WEGE, H., S.H. SIDDELL et V. TER MEULEN. 1982. The biology and pathogenesis of coronaviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 99: 165-200.
- WEGE, H., J. WINTER et R. MEYERMANN. 1988. The peplomer protein E2 of coronavirus JHM as a determinant of neurovirulence: Definition of critical epitopes by variant analysis. *J. Gen. Virol.* 69: 87-98.
- WEINER, L.P. 1973. Pathogenesis of demyelination induced by a mouse hepatitis virus (JHM). *Arch. Neurol.* 28: 298-303.
- WEISMILLER, D.G., L.S. STURMAN, M.J. BUCHMEIER, J.O. FLEMING et K.V. HOLMES. 1990. Monoclonal antibodies to the peplomer glycoprotein of coronavirus mouse hepatitis virus identify two subunits and detect a conformational change in the subunit released under mild alkaline conditions. *J. Virol.* 64: 3051-3055.
- WEISS, S. 1983. Coronaviruses SD and SK share extensive nucleotide homology with murine coronavirus MHV-A59 more than that shared between human and murine coronaviruses. *Virology* 126: 669-677.
- WELLING, G.W., W.J. WEIJER, R. VAN DER ZEE et S. WELLING-WESTER. 1985. Prediction of sequential antigenic regions in proteins. *FEBS Lett.* 188: 215-218.
- WELSH, R.M., M.V. HASPEL, D.C. PARKER et K.V. HOLMES. 1986. Natural cytotoxicity against mouse hepatitis virus-infected cells. II. A cytotoxic effector cell with a B lymphocyte phenotype. *J. Immunol.* 136: 1454-1460.
- WHITE, J.M. 1990. Viral and cellular membrane fusion proteins. *Ann. Rev. Physiol.* 52: 675-697.

- WILLIAMSON, J.S.P. et S.A. STOHLMAN. 1990. Effective clearance of mouse hepatitis virus from the central nervous system requires both CD4+ and CD8+ T-cells. *J. Virol.* 64: 4589-4592.
- WILLIAMS, R.K., G.S. JIANG et 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: 5533-5536.
- WOODS, R.D., R.D. WESLEY et P.A. KAPKE. 1987. Complement-dependent neutralization of transmissible gastroenteritis virus by monoclonal antibodies. *Adv. Exp. Med. Biol.* 218: 493-500.
- YAMAGUCHI, K., N. GOTO, S. KYUWA, M. HAYAMI et Y. TOYODA. 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: 1-9.
- YEAGER, C.L., R.A. ASHMUN, R.K. WILLIAMS, C.B. CARDELLICHIO, L.H. SHAPIRO, A.T. LOOK et K.V. HOLMES. 1992. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature* 357: 420-422.
- YOKOMORI K, S.C. BAKER, S.A. STOHLMAN et M.M.C. LAI. 1992. Hemagglutinin-esterase-specific monoclonal antibodies alter the neuropathogenicity of mouse hepatitis virus. *J. Virol.* 66: 2865-74.
- YOKOMORI, K., N. LA MONICA, S. MAKINO, C.-K SHIEH et M.M.C. LAI. 1989. Biosynthesis, structure, and biological activities of envelope protein gp65 of murine coronavirus. *Virology* 173: 683-691.
- YOO, D., M.D. PARKER et L.A. BABIUK. 1991a. The S2 subunit of the spike glycoprotein of bovine coronavirus mediates membrane fusion in insect cells. *Virology* 180: 395-399.
- YOO, D.W., M.D. PARKER, J.Y. SONG, G.J. COX, D. DEREGT et L.A. BABIUK. 1991b. Structural analysis of the conformational domains involved in neutralization of bovine coronavirus using deletion mutants of the spike glycoprotein S1 subunit expressed by recombinant baculoviruses. *Virology* 183: 91-98.
- ZEDERLUTZ, G., D. ALTSCHUH, H.M. GEYSEN, E. TRIFILIEFF, G. SOMMERMEYER et M.H.V. VAN REGENMORTEL. 1993. Monoclonal antipeptide antibodies - affinity and kinetic rate constants measured for the

peptide and the cognate protein using a biosensor technology. *Mol. Immunol.* 30: 145-155.

## COMMUNICATIONS

- Daniel, C., R. Anderson, M.J. Buchmeier, J.O. Fleming, W.J.M. Spaan, H. Wege et P.J. Talbot. 1991. Identification of an immunodominant linear neutralization domain on the S2 portion of the murine coronavirus spike glycoprotein. 10<sup>e</sup> réunion annuelle de la Société Américaine de Virologie (ASV), Fort Collins, Colorado, États-Unis.
- Daniel, C., S. Mounir et P.J. Talbot. 1991. Mapping of linear antigenic determinants on the murine coronavirus spike glycoprotein using prokaryotic expression vectors. 41<sup>e</sup> Congrès de la Société Canadienne des Microbiologistes, London, Ontario.
- Daniel, C., A. Lamarre et P.J. Talbot. 1991. Enhanced antigenicity of murine coronavirus spike glycoprotein produced at pH 6. 41<sup>e</sup> Congrès de la Société Canadienne des Microbiologistes, London, Ontario.
- Talbot, P.J., M. Lacroix et C. Daniel. 1991. Vaccin sous-unitaire ou synthétique contre l'encéphalite coronavirale. 32<sup>e</sup> réunion annuelle du Club de recherches cliniques du Québec, Manoir Richelieu, Pointe-au-Pic, Québec.
- Daniel, C., M. Trudel et P.J. Talbot. 1989. Protection of mice from lethal coronavirus MHV-A59 infection by monoclonal antibody affinity-purified spike glycoprotein. IV<sup>e</sup> Symposium international sur les Coronavirus, King's College, Cambridge, Angleterre.
- Daniel, C., P.J. Talbot, J. Lapierre, R. Dugré et P. Trépanier. 1989. Production du coronavirus murin en culture cellulaire adaptée aux microporteurs. 39<sup>e</sup> Congrès de la Société Canadienne des Microbiologistes, Laval, Québec.
- Daniel, C., M. Trudel et P.J. Talbot. 1988. Protection from lethal coronavirus encephalitis by affinity-purified E2 glycoprotein. 38<sup>e</sup> Congrès de la Société Canadienne des Microbiologistes, Windsor, Ontario.
- Daniel, C., M. Trudel et P.J. Talbot. 1987. Purification of the spike glycoprotein E2 of murine coronavirus MHV-A59 by monoclonal antibody affinity chromatography. VII<sup>e</sup> Congrès International de Virologie, Edmonton, Alberta.

Talbot, P.J. et C. Daniel. 1986. Influence of the cell cycle and other culture conditions of the infectious titer of MHV-A59. III<sup>e</sup> Symposium International sur les Coronavirus, Pacific Grove, Californie, États-Unis.

Daniel, C. et P.J. Talbot. 1986. Études de stabilité du coronavirus de l'hépatite murine (MHV-A59). 54<sup>e</sup> Congrès de l'Association canadienne-française pour l'avancement des sciences, Montréal, Québec.

## ANNEXE II

Daniel, C. et P.J. Talbot. 1987. Physico-chemical properties of murine hepatitis virus, strain A59. Arch. Virol. 96: 241-248.

---

Daniel, C., M. Lacroix et P.J. Talbot. 1993. 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. (en préparation).

---

## ANNEXE VI

Talbot, P.J. et C. Daniel. 1987. Influence of the cell cycle on the infectious titer of murine hepatitis virus, strain A59. *Adv. Exp. Med. Biol.* **218**: 267-268.

---



