

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

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

PAR

ALAIN LAMARRE

CARACTÉRISATION DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE PROTECTRICE
CONTRE L'INFECTION CORONAVIRALE À L'AIDE DE FRAGMENTS
D'ANTICORPS ET DU RÉSEAU IDIOTYPIQUE

NOVEMBRE 1996

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	ii
LISTE DES TABLEAUX.....	v
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
SOMMAIRE	xi
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
1. MODÈLE CORONAVIRAL.....	6
1.1. Généralités.....	7
1.2. Propriétés structurelles du virus.....	8
1.3. Réplication virale	9
1.4. Pathogénicité et immunité.....	12
2. ANTICORPS ANTI-IDIOTYPIQUES	14
2.1. Antigénicité des immunoglobulines.....	14
2.2. Classification des anticorps anti-idiotypiques.....	15
2.3. Concept du réseau idiotypique	16
2.4. Applications des anticorps anti-idiotypiques.....	17
2.4.1. Antigènes parasitaires.....	17
2.4.2. Antigènes bactériens.....	18
2.4.3. Antigènes viraux.....	19
2.5. Études structurelles	22
2.6. Mimétisme moléculaire.....	23
3. ANTICORPS RECOMBINANTS ET BANQUES DE PHAGES.....	24

CHAPITRE 2: ÉTUDE DES MÉCANISMES DE PROTECTION CONTRE L'INFECTION CORONAVIRALE À L'AIDE DE FRAGMENTS D'ANTICORPS.....	27
ARTICLE I: Protection from lethal coronavirus infection by immunoglobulin fragments	29
ARTICLE II: A recombinant single chain antibody neutralizes coronavirus but fails to protect mice: perspectives for antiviral immunotherapy	66
CHAPITRE 3: ÉTUDE DE L'INDUCTION D'UNE RÉPONSE IMMUNITAIRE PROTECTRICE CONTRE LE CORONAVIRUS MURIN PAR VACCINATION ANTI-IDIOTYPIQUE	89
ARTICLE III: Antiidiotypic vaccination against murine coronavirus infection	91
ARTICLE IV: Phage-displayed anti-idiotypic antibody fragments partially protect against murine coronavirus infection without apparent structural homology to virus.....	124
DISCUSSION.....	141
1. PROTECTION CONTRE L'INFECTION CORONAVIRALE SUITE À L'ADMINISTRATION DE FRAGMENTS D'ANTICORPS.....	142
1.1. Étude des mécanismes de protection contre l'infection coronavirale à l'aide de fragments F(ab') ₂ et Fab.....	142
1.2. Construction et expression chez <i>E. coli</i> d'un anticorps recombinant à chaîne unique (scFv) et évaluation de ses propriétés protectrices	147

2. INDUCTION D'UNE RÉPONSE IMMUNITAIRE PROTECTRICE CONTRE LE CORONAVIRUS MURIN PAR VACCINATION ANTI- IDIOTYPIQUE.....	149
2.1. Production et caractérisation d'anticorps anti-idiotypiques polyclonaux.....	149
2.2. Isolement de fragments d'anticorps anti-idiotypiques exprimés à la surface de phages filamenteux.....	154
CONCLUSION.....	158
REMERCIEMENTS.....	161
RÉFÉRENCES.....	163
ANNEXE 1: Liste des publications et des communications.....	192
ANNEXE 2: Copie des articles publiés.....	197

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I	Constantes de la cinétique de liaison de l'Ac complet 7-10A et de ses fragments $F(ab')_2$ et Fab à l'anti-Id mesuré par résonance plasmonique de surface. (<i>TABLE I: Kinetic constants of whole mAb 7-10A, $F(ab')_2$ and Fab fragments determined by surface plasmon resonance using immobilized anti-idiotypic antibodies</i>).....	52
TABLEAU II	Titres de neutralisation de l'Ac complet et de ses fragments $F(ab')_2$ et Fab. (<i>TABLE II: Viral neutralization titers of whole immunoglobulin, $F(ab')_2$ and Fab fragments</i>).....	53
TABLEAU III	Demi-vie <i>in vivo</i> de l'Ac complet et de ses fragments $F(ab')_2$ et Fab. (<i>TABLE III: Biological half-lives of whole immunoglobulin, $F(ab')_2$ and Fab fragments</i>).	54
TABLEAU IV	Titres viraux dans le cerveau et le foie des souris immunisées avec l'Ac complet et ses fragments $F(ab')_2$ et Fab deux jours post-infection. (<i>TABLE IV: Virus titers in brain and liver of mice immunized with whole immunoglobulin, $F(ab')_2$ and Fab fragments two days post-infection</i>).	55
TABLEAU V	Inhibition de la neutralisation virale par l'Ac2. (<i>TABLE V: Inhibition of virus-neutralization with Ab2</i>).....	111
TABLEAU VI	Production d'anticorps neutralisants anti-MHV-A59 après immunisation avec l'Ac2. (<i>TABLE VI: Induction of MHV-A59 neutralizing antibodies by Ab2 immunization</i>).	112
TABLEAU VII	Séquence de la région hypervariable 3 et segments VH des clones anti-idiotypiques sélectionnés de la banque de phages. (<i>TABLE VII: CDR3 sequences and VH segments of the selected anti-idiotypic clones isolated from the phage-display library</i>)	137

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1:	Analyse sur gel de polyacrylamide de l'AcMo 7-10A complet et de ses fragments $F(ab')_2$ et Fab. (<i>FIGURE 1: SDS-PAGE analysis of purified whole mAb 7-10A, $F(ab')_2$ and Fab fragments</i>).....	57
FIGURE 2:	Comparaison de la réactivité de l'AcMo 7-10A complet et de ses fragments $F(ab')_2$ et Fab pour l'antigène viral MHV-A59 ou anti-idiotypique. (<i>FIGURE 2: Comparison of the reactivity of the whole mAb 7-10A, $F(ab')_2$ and Fab fragments for MHV-A59 antigen or specific anti-idiotypic antibodies</i>).....	58
FIGURE 3:	Inhibition de l'attachement de l'AcMo 7-10A complet à l'antigène viral MHV-A59 ou anti-idiotypique par les fragments $F(ab')_2$ et Fab. (<i>FIGURE 3: Inhibition of whole mAb 7-10A binding to MHV-A59 antigen or anti-idiotypic antibodies by $F(ab')_2$ or Fab fragments</i>).....	59
FIGURE 4:	Interaction entre l'immunoglobuline complète ou ses fragments $F(ab')_2$ et Fab avec des anticorps anti-idiotypiques immobilisés. (<i>FIGURE 4: Sensorgram showing the interactions of the whole immunoglobulin molecule, $F(ab')_2$ and Fab fragments with immobilized anti-idiotypic antibodies</i>).....	60
FIGURE 5:	Courbes représentatives de dégradation de l'immunoglobuline complète (A) ou de ses fragments $F(ab')_2$ et Fab (B). (<i>FIGURE 5: Representative turnover curves of the whole immunoglobulin (A) or $F(ab')_2$ and Fab fragments (B)</i>)	61
FIGURE 6:	Protection de souris contre l'infection par le MHV-A59 par transfert passif de l'immunoglobuline complète ou de ses fragments $F(ab')_2$ et Fab. (<i>FIGURE 6: Protection of mice from MHV-A59 infection by passive transfer of whole immunoglobulin, $F(ab')_2$ and Fab fragments</i>)	62
FIGURE 7:	Protection de souris contre l'infection par le MHV-A59 avec différentes quantités d'immunoglobuline complète ou de ses fragments $F(ab')_2$ et Fab. (<i>FIGURE 7: Protection of mice from MHV-A59 infection by different quantities of whole immunoglobulin, $F(ab')_2$ and Fab fragments</i>).....	63

FIGURE 8:	Gel d'agarose coloré au bromure d'éthide montrant l'assemblage par PCR des régions V _H et V _K . (<i>FIGURE 8: EtBr-stained agarose gel showing the assembly PCR of the V_H and V_K regions</i>)	82
FIGURE 9:	Séquences nucléotidique et déduite en acides aminés du scFv. (<i>FIGURE 9: Nucleotide and deduced amino acid sequences of the scFv</i>).....	83
FIGURE 10:	Analyse sur gel de polyacrylamide et par empreinte de type "Western" des fragments scFv purifiés. (<i>FIGURE 10: SDS-PAGE and Western blot analysis of purified scFv fragments</i>)	85
FIGURE 11:	Détection par ELISA de la liaison des scFv sur l'antigène viral. (<i>FIGURE 11: Reactivity of the scFv fragments for MHV antigen</i>)	86
FIGURE 12:	Inhibition de l'attachement de l'anticorps parental sur l'antigène viral par les scFv purifiés. (<i>FIGURE 12: Inhibition of parental antibody binding to MHV antigen by purified scFv fragments</i>).	87
FIGURE 13:	Protection de souris contre l'infection du MHV-A59 par transfert passif de fragments scFv. (<i>FIGURE 13: Protection of mice from MHV-A59 infection by passive transfer of scFv fragments</i>).	88
FIGURE 14:	Détection d'anti-I _d dans le sérum de lapin et évaluation de leur degré de pureté. (<i>FIGURE 14: Detection of anti-I_d in rabbit serum and assessment of their purification</i>).....	114
FIGURE 15:	Évaluation de la spécificité de l'anti-I _d par ELISA. (<i>FIGURE 15: ELISA for determining anti-I_d specificity</i>).....	115
FIGURE 16:	Détection de l'I _d dans des sérums antiviraux syngéniques (souris BALB/c), allogéniques (souris AKR, SJL et C57BL/6) et xénogéniques (rat et lapin). (<i>FIGURE 16: Detection of I_d in syngeneic (BALB/c mice), allogeneic (AKR, SJL and C57BL/6 mice) and xenogeneic (rat and rabbit) antiviral serum</i>).....	116
FIGURE 17:	Détection de l'I _d chez des AcMo spécifiques pour le MHV-A59. (<i>FIGURE 17: Detection of I_d on MHV-A59-specific mAb</i>).....	117
FIGURE 18:	Inhibition de l'attachement de l'I _d à l'antigène par l'anti-I _d (Ac2). (<i>FIGURE 18: Inhibition of binding of I_d to antigen by anti-I_d (Ab2)</i>).	118

FIGURE 19:	Détection d'anticorps anti-anti-idiotypiques spécifiques pour le MHV-A59. (<i>FIGURE 19: Detection of MHV-A59-specific antiantiidiotypic antibodies</i>).....	119
FIGURE 20:	Protection de souris contre l'infection par le MHV-A59 par vaccination anti-idiotypique. (<i>FIGURE 20: Protection of mice against MHV-A59 infection by anti-Id vaccination</i>).....	120
FIGURE 21:	Liaison de phages polyclonaux à l'anticorps 7-10A ou au KLH. (<i>FIGURE 21: Binding of polyclonal phage populations to mAb 7-10A or to KLH</i>).....	138
FIGURE 22:	Liaison de clones phagiques obtenus après cinq rondes de sélection, sur chacun des trois anticorps antiviraux. (<i>FIGURE 22: Binding of individual phage clones after five rounds of selection for either one of three antiviral mAbs</i>).....	139
FIGURE 23:	Protection partielle des souris BALB/c et C57BL/6 contre l'infection par le MHV-A59 par vaccination avec des fragments d'anticorps anti-idiotypiques exposés à la surface de phages. (<i>FIGURE 23: Partial protection from MHV-A59 infection of BALB/c or C57BL/6 mice vaccinated with anti-idiotypic antibody fragments displayed on phage surface</i>)	140

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ab1 ou Ac1	: anticorps idiotypique(s) ou Id
Ab2 ou Ac2	: anticorps anti-idiotypique(s) ou anti-Id
Ab3 ou Ac3	: anticorps anti-anti-idiotypique(s) ou anti-anti-Id
Ac	: anticorps
AcMo	: anticorps monoclonal(aux)
ADCC	: lyse cellulaire dépendante des anticorps
Ag	: antigène(s)
BNHS	: biotinyI-N-hydroxysuccinimide
C	: complément
CEA	: antigène carcino-embryonnaire
CFA	: adjuvant complet de Freund
EDTA	: acide éthylène diamine tétra-acétique
ELISA	: "Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay"
FCS	: sérum de veau foetal
h	: heure(s)
HA	: hémagglutinine
HE	: protéine hémagglutinine-estérase
i.c.	: intra-cérébrale
Id	: idioType(s)
IFA	: adjuvant incomplet de Freund
Ig	: immunoglobuline(s)
i.p.	: intra-péritonéale
kDa	: kilodalton
KLH	: hémocyanine de patelle

LD₅₀	: dose létale 50%
M	: protéine de la membrane
mAb	: anticorps monoclonal(aux)
MEM	: milieu essentiel minimal
MHV	: virus de l'hépatite murine
N	: protéine de la nucléocapside
NRlg	: immunoglobulines normales de lapin
PAGE	: électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PBS	: tampon salin phosphaté
PBS-T	: tampon salin phosphaté contenant 0.1% (v/v) de Tween 20
PCR	: réaction de polymérisation en chaîne
PFU	: unité formatrice de plaque
RU	: unité de résonance
S	: protéine de surface
ScFv	: anticorps à chaîne unique
SDS	: dodécyl sulfate de sodium
TGEV	: virus de la gastro-entérite transmissible du porc
U	: unité

SOMMAIRE

Le virus de l'hépatite murine (MHV) est un membre de la famille des *Coronaviridae* qui cause, chez la souris, une infection du système nerveux central présentant des lésions semblables à celles rencontrées dans la sclérose en plaques chez l'être humain. Le MHV est utilisé dans notre laboratoire comme modèle animal de maladies neurologiques ayant une étiologie virale. Les mécanismes de protection contre l'infection par le MHV restent à ce jour mal connus, mais les anticorps y jouent probablement un rôle majeur. Dans le but de mieux définir les mécanismes impliqués dans la protection de la souris contre le MHV, nous avons testé la capacité protectrice des fragments d'un anticorps monoclonal (AcMo) spécifique à la protéine de surface (S) des coronavirus, et évalué le potentiel vaccinal d'anticorps anti-idiotypiques. Tout d'abord, les fragments $F(ab')_2$ et Fab de l'AcMo 7-10A ont été obtenus par digestion enzymatique à la pepsine ou à la papaïne. Nous avons constaté par ELISA et par résonance plasmonique de surface, que les fragments de l'anticorps 7-10A ont gardé la capacité de lier les antigènes viraux et les anticorps anti-idiotypiques. De plus, les deux fragments ont conservé la propriété qu'a l'anticorps complet de neutraliser l'infection virale, mais toutefois, à un degré moindre. En effet, la quantité de fragments Fab nécessaire pour neutraliser 50% de l'inoculum viral est 65 fois supérieure à celle requise pour l'anticorps complet. De façon similaire, les fragments ont conservé les propriétés protectrices de l'anticorps parental mais, encore une fois, de façon réduite. Parallèlement, un anticorps à chaîne unique (scFv) constitué des régions variables des chaînes lourdes et légères de l'anticorps 7-10A a été construit et exprimé chez *Escherichia coli*. Tout comme les

fragments de 7-10A obtenus par digestion enzymatique, le scFv a conservé la propriété de lier l'antigène viral, et avait même de plus grandes capacités d'inhibition de l'attachement de l'anticorps complet et de neutralisation, que les fragments Fab, suggérant une plus grande affinité. Cependant, contrairement au fragment Fab, le scFv n'a pu induire une protection significative des souris contre l'infection coronavirale, probablement à la suite d'une dégradation *in vivo* plus rapide. Dans l'ensemble, ces résultats démontrent que l'anticorps 7-10A utilise des mécanismes de neutralisation et de protection indépendants du fragment Fc des immunoglobulines. Ceci suggère que la lyse dépendante du complément et la lyse cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) ne sont pas impliquées dans ces mécanismes. De plus, ces travaux pourront servir de modèle pour l'éventuelle utilisation de fragments d'anticorps pour l'immunothérapie antivirale.

Nous avons également vérifié le potentiel vaccinal d'anticorps anti-idiotypiques obtenus par l'immunisation de lapins avec l'AcMo 7-10A. Dans un premier temps, leur spécificité pour l'AcMo 7-10A a été confirmée par double immunodiffusion et par ELISA, et leur capacité d'inhiber les propriétés de liaison au virus et de neutralisation virale de l'anticorps idiotypique a ensuite été analysée. L'incapacité des anticorps anti-idiotypiques purifiés à détecter l'idiotype 7-10A dans des sérums xénogéniques antiviraux, nous suggère qu'il s'agirait d'anticorps ne mimant pas la structure tridimensionnelle de l'antigène. L'injection des anticorps anti-idiotypiques purifiés à des souris BALB/c, a induit la production d'anticorps antiviraux neutralisants, et a pu protéger ces souris contre une épreuve virale généralement fatale. Des anticorps anti-idiotypiques recombinants, dirigés contre trois AcMo antiviraux,

ont également été isolés à partir d'une banque de phages filamenteux exprimant à leur surface, des anticorps à chaîne unique (scFv) humains. Malgré la grande spécificité des anticorps recombinants sélectionnés, aucun n'a induit une production significative d'anticorps antiviraux chez les souris BALB/c et C57BL/6. Cependant, une protection partielle des deux lignées de souris a été observée avec trois des sept clones utilisés pour la vaccination. Dans l'ensemble, ces résultats démontrent le potentiel vaccinal des anticorps anti-idiotypiques, et suggèrent que l'utilisation de banques phagiques pour leur isolement, pourrait éventuellement remplacer la production d'hybridomes par la technique conventionnelle de fusion cellulaire.

INTRODUCTION

Les coronavirus sont responsables de plusieurs maladies respiratoires, gastro-intestinales et neurologiques chez l'humain et les animaux, dont certaines entraînent des pertes économiques importantes. L'étude du virus de l'hépatite murine (MHV) a permis d'obtenir plusieurs informations essentielles sur la pathogenèse coronavirale et sur les mécanismes de défense de l'hôte. Certaines souches de MHV causent, chez le rat et la souris, une maladie chronique démyélinisante semblable à la sclérose en plaques. Le MHV constitue pour cette raison un excellent modèle animal de maladies humaines du système nerveux central.

Encore aujourd'hui, bien peu de données sont disponibles concernant les mécanismes de protection contre l'infection coronavirale. On sait toutefois que les anticorps jouent probablement un rôle important dans la protection, puisque le transfert passif d'anticorps monoclonaux (AcMo) spécifiques pour chacune des quatre protéines majeures des coronavirus, confère aux souris une protection contre l'infection virale (Buchmeier *et al.*, 1984, Lecomte *et al.*, 1987, Fleming *et al.*, 1989, Daniel et Talbot, 1990, Yokomori *et al.*, 1992). Cependant, le mode d'action précis des anticorps dans la protection coronavirale reste encore mal connu. Par ailleurs, une protection contre divers virus à l'aide d'anticorps anti-idiotypiques a déjà été rapportée par plusieurs équipes de recherche (Sharpe *et al.*, 1984, Kennedy *et al.*, 1986, Oosterlaken *et al.*, 1991, Escobar *et al.*, 1992) Ce projet de recherche s'inscrit donc dans une démarche globale de caractérisation des mécanismes de protection contre l'infection par le coronavirus murin, mais plus précisément dans le but de mieux définir le mode d'action d'un anticorps spécifique pour la glycoprotéine de surface (S) de la souche A59 du MHV, et d'évaluer le

potentiel vaccinal des anticorps anti-idiotypiques dans ce système. Pour répondre au premier objectif, des fragments $F(ab')_2$ et Fab de l'AcMo 7-10A ainsi qu'un anticorps à chaîne unique (scFv) ont été générés et leurs propriétés biologiques *in vitro* et *in vivo* ont été comparées à celles de l'anticorps complet. Le second objectif a demandé la production d'anticorps anti-idiotypiques chez le lapin, et leur isolement à partir d'une banque de phages exprimant à leur surface, des scFv humains recombinants. Des souris ont été vaccinées avec ces anticorps anti-idiotypiques, et le développement d'une réponse immunitaire anti-MHV-A59 a été vérifié par des tests de neutralisation virale *in vitro* et de protection *in vivo*.

Les résultats obtenus lors de ce projet de doctorat sont présentés sous forme d'articles scientifiques qui remplacent les sections Matériels et Méthodes et Résultats de la thèse conventionnelle. Deux articles ont déjà été publiés et deux ont été soumis pour publication. Ces articles ont toutefois été légèrement modifiés pour uniformiser la présentation de la thèse. Afin de pouvoir y référer plus facilement, les figures et les tableaux contenus dans chacun de ces articles ont été regroupés à la suite de l'article correspondant, et renumérotés du début à la fin de la thèse. Les références ont également été regroupées à la fin de la thèse. Les sections majeures de cette thèse sont présentées en trois chapitres distincts. Le premier chapitre présente une revue générale et succincte de la littérature se rapportant aux sujets touchés dans ce projet de recherche, puisque l'introduction de chaque article, contient déjà une revue spécifique au sujet dont il traite. Le second chapitre fait état de l'étude des mécanismes de protection contre l'infection coronavirale à l'aide de fragments d'anticorps, et contient deux articles se rapportant à cet objectif.

Enfin, le troisième chapitre traite de l'étude de l'induction d'une réponse immunitaire protectrice contre le coronavirus murin par vaccination anti-idiotypique, et contient également deux articles liés à cet objectif. La thèse se termine par une discussion et une conclusion générales, qui reprennent les principaux résultats obtenus lors de ce projet de doctorat, et qui en font une brève analyse.

CHAPITRE 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. MODÈLE CORONAVIRAL

L'infection par le coronavirus murin cause, chez le rat et la souris, une démyélinisation au niveau du système nerveux qui ressemble aux manifestations pathologiques qui sont associées à la sclérose en plaques (Siddell *et al.*, 1983b). L'étiologie de la sclérose en plaques demeure à ce jour inconnue, mais plusieurs travaux suggèrent une implication des virus dans la maladie, et le coronavirus figure dans la liste des nombreux candidats dont l'implication est suspectée (Talbot, 1995). Plusieurs observations viennent supporter l'hypothèse de l'implication des coronavirus dans l'étiologie de cette maladie. Des particules ayant l'apparence de coronavirus ont été observées dans le cerveau d'un patient mort de sclérose en plaques (Tanaka *et al.*, 1976). Par ailleurs, des anticorps spécifiques aux coronavirus humains OC43 et 229E ont été retrouvés dans le liquide céphalo-rachidien de patients atteints de sclérose en plaques (Salmi *et al.*, 1982). Les coronavirus ont également la capacité de se répliquer et même de persister dans des cellules nerveuses et gliales d'origine humaine (Pearson et Mims, 1985, Talbot *et al.*, 1994, Bonavia *et al.*, sous presse, Arbour *et al.*, manuscrit en préparation). De plus, la présence d'ARN coronaviral a été démontrée dans le cerveau de patients décédés de la sclérose en plaques, par hybridation *in situ* en utilisant des sondes générées à partir de séquences d'ARN de coronavirus murins (Murray *et al.*, 1992a). La présence d'ARN des deux sérotypes de coronavirus humains a également pu être détectée par PCR dans le cerveau de patients décédés de sclérose en plaques et ce, dans une plus grande proportion que dans celui de témoins (Stewart *et al.*, 1992, Arbour *et al.*, manuscrit en préparation). Il a également été démontré qu'il était possible de

causer une démyélinisation dans le système nerveux central de primates, à la suite d'une infection avec certains coronavirus murins (Murray *et al.*, 1992b). Finalement, des lymphocytes T montrant une réaction croisée pour la protéine basique de la myéline et le coronavirus humain 229E, ont été isolés en plus grande proportion chez des patients atteints de sclérose en plaques que chez des personnes saines (Talbot *et al.*, 1996). Toutes ces observations font du coronavirus un candidat potentiel dans l'étiologie de la sclérose en plaques, et du coronavirus murin, un excellent modèle animal pour l'étude de maladies du système nerveux central d'étiologie virale.

1.1. Généralités

La première description d'une maladie causée par un coronavirus a probablement été celle de la péritonite infectieuse féline, vers 1912 (Siddell, 1995). Par ailleurs, les maladies associées à la bronchite aviaire, la gastro-entérite transmissible du porc et l'hépatite murine étaient toutes connues avant 1950 (Schalk et Hawn, 1931, Doyle et Hutchings, 1946, Cheever *et al.*, 1949), mais c'est seulement vers le milieu des années 60 que le coronavirus a été associé à une maladie humaine, le rhume (Tyrrell et Bynoe, 1965). En 1968, les coronavirus ont été reconnus comme un groupe distinct de virus enveloppés, composés d'un génome d'ARN (Tyrrell *et al.*, 1968), et leur appartenance à une famille séparée de virus, les *Coronaviridae*, a été approuvée en 1975 par le comité international de taxonomie virale (Tyrrell *et al.*, 1975). Aujourd'hui, la famille des *Coronaviridae* compte deux genres, les coronavirus et les torovirus (Cavanagh *et al.*, 1995). Le genre coronavirus contient quant à lui, 13 espèces virales différentes (Cavanagh *et al.*, 1995). Le

nom "coronavirus" vient de l'apparence de couronne de ces virus lorsque observés au microscope électronique.

1.2. Propriétés structurelles du virus

Les coronavirus sont des particules enveloppées, pléomorphes, d'un diamètre variant de 60 à 200 nm et présentant une frange de projections de surface d'une longueur d'environ 20 nm chacune (Siddell, 1995). Une seconde rangée de plus courts spicules se retrouve sur certains coronavirus, dont le coronavirus bovin, le coronavirus de la dinde, le coronavirus humain OC43, et certaines souches de coronavirus murins (Siddell, 1995). Une nucléocapside allongée, de symétrie hélicoïdale englobe un ARN viral non-segmenté, de polarité positive et d'environ 30 000 nucléotides. De trois à cinq protéines structurales composent le virion. La protéine de la nucléocapside N, d'une masse moléculaire variant entre 50 et 60 kDa, est une phosphoprotéine associée à l'ARN viral formant ainsi la nucléocapside. La glycoprotéine membranaire M, de 20 à 30 kDa, est essentielle pour la formation de l'enveloppe et serait impliquée dans le bourgeonnement du virus au niveau des membranes intracellulaires. La glycoprotéine de surface S (180 à 200 kDa) forme les projections de surface du coronavirus et est responsable de l'attachement au récepteur cellulaire (Williams *et al.*, 1991). Elle est également responsable de la fusion cellulaire induite par le virus et est la cible principale de la réponse immunitaire de l'hôte (Holmes et Lai, 1996). La glycoprotéine HE, qui forme la seconde rangée de spicules rencontrée chez certains coronavirus, est un dimère de 130 à 140 kDa composé de deux sous-unités d'environ 65 kDa reliées par des ponts disulfures. Cette glycoprotéine a la capacité de se lier aux résidus d'acide acétyl-neuraminique sur les

glycoprotéines et glycolipides de la membrane cellulaire, et pourrait permettre l'adsorption initiale de certains virus la possédant. Cependant, une interaction subséquente de la glycoprotéine S avec le récepteur cellulaire serait nécessaire pour qu'il y ait fusion avec la membrane cytoplasmique, et pénétration (Holmes et Lai, 1996). Finalement, une petite protéine hydrophobe (sM), de fonction inconnue, a récemment été reconnue comme faisant partie de la structure virale de certains coronavirus (Liu et Inglis, 1991, Godet *et al.*, 1992, Yu *et al.*, 1994).

1.3. Réplication virale

La première étape du cycle de réplication viral est l'attachement au récepteur cellulaire. Comme il a été mentionné précédemment, les coronavirus qui expriment la glycoprotéine HE, comme par exemple le coronavirus bovin, peuvent s'attacher à la membrane cellulaire sur les résidus d'acide acétyl-neuraminique via la HE, ou par un récepteur spécifique de la glycoprotéine de surface. Plusieurs récepteurs auxquels la glycoprotéine S du coronavirus peut s'attacher ont été identifiés. Le virus de l'hépatite murine utilise plusieurs glycoprotéines apparentées à l'antigène carcino-embryonnaire, qui fait lui-même partie de la superfamille des immunoglobulines (Dveksler *et al.*, 1991, Williams *et al.* 1991, Dveksler *et al.*, 1993, Chen *et al.*, 1995). Cependant, l'expression de ces récepteurs est très faible dans le cerveau. Il a été démontré que la souche A59 du MHV utilise comme récepteur alternatif, une protéine spécifique de la grossesse exprimée majoritairement dans le cerveau et faisant également partie de la famille des antigènes carcino-embryonnaires (Chen *et al.*, 1995). Le tropisme tissulaire du MHV s'explique donc, en partie, par l'expression spécifique de certains

membres des antigènes carcino-embryonnaires dans divers tissus de l'organisme, les rendant ainsi sensibles à l'infection virale. Les coronavirus humains 229E et de la gastro-entérite transmissible du porc utilisent tous deux comme récepteur cellulaire, l'aminopeptidase N de leur espèce respective, une métalloprotéase présente au niveau de la membrane des cellules épithéliales des systèmes respiratoire et digestif (Delmas *et al.*, 1992, Yeager *et al.* 1992).

Suivant l'attachement du virion à son récepteur cellulaire, la pénétration virale se produit suite à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cytoplasmique ou endosomale (Gallagher *et al.*, 1991, Kooi *et al.*, 1991). Il y a alors libération de la nucléocapside dans le cytoplasme cellulaire, et synthèse d'une polymérase d'ARN dépendante de l'ARN encodée par le gène 1 du génome viral. Par la suite, la polymérase nouvellement synthétisée, transcrit l'ARN génomique en un ARN complémentaire de polarité négative qui servira de gabarit pour la synthèse des ARN messagers coiffés et polyadénylés et des nouveaux ARN génomiques. Les ARN messagers du coronavirus, dont le nombre varie de 5 à 7 selon le coronavirus, ont tous une extrémité 3' co-terminale identique, et seule la partie 5' unique de chacun est traduite. Le mode de synthèse des ARN messagers sous-génomiques des coronavirus est complexe. En effet, encore aujourd'hui le mécanisme utilisé par le coronavirus pour synthétiser ses ARN messagers fait l'objet de controverses. Trois modèles distincts ont été proposés pour expliquer les observations faites sur la synthèse de ces ARN messagers. Le premier, généralement le mieux accepté, est celui de la transcription initiée par amorce d'ARN (Lai, 1990). D'après ce modèle, il y aurait transcription de séquences de têtes ("leader") à

partir de l'extrémité 3' de l'ARN complémentaire de polarité négative. Il y aurait, par la suite, dissociation de la séquence de tête du gabarit d'ARN, soit seule ou complexée à la polymérase, et réassociation sur des séquences intergéniques situées en amont de chaque gène encodé par l'ARN génomique. Les séquences de têtes serviraient alors d'amorces pour la transcription des ARN messagers. Le second modèle postule que la transcription de l'ARN de polarité négative serait discontinu (Sawicki et Sawicki, 1990). En effet, pendant la synthèse de l'ARN négatif à partir de l'ARN génomique, la polymérase ferait des pauses aux régions intergéniques pour ensuite sauter à l'extrémité 3' de la séquence de tête près de l'extrémité 5' du génome viral, générant des ARN sous-génomiques de polarité négative pouvant se répliquer sans la contribution du génome viral. Finalement, le troisième modèle à la fois le plus simple et le plus controversé, est basé sur la détection d'ARN messagers sous-génomiques encapsidés à l'intérieur de particules de coronavirus bovin. Ces ARN messagers positifs, aussitôt qu'ils ont pénétré dans la cellule, seraient transcrits en ARN sous-génomiques négatifs qui serviraient à leur tour de gabarit pour la synthèse de nouveaux ARN positifs (Sethna et al., 1989).

La synthèse des protéines M, S et HE s'effectue au niveau du réticulum endoplasmique rugueux, alors que celle de la protéine de la nucléocapside et des protéines non-structurales s'effectue dans le cytosol, par l'intermédiaire de polysomes. De plus, c'est également à cet endroit que la protéine de la nucléocapside est rapidement phosphorylée. Les glycoprotéines S et HE sont glycosylées de façon co-translationnelle par l'incorporation de sucres *N*-liés. Quant à elle, la protéine M serait glycosylée pendant sa traduction, avec des

sucres *N*-liés pour certains coronavirus, comme le virus de la bronchite aviaire, ou par l'ajout post-traductionnel de sucres *O*-liés dans l'appareil de Golgi pour d'autres coronavirus, comme le virus de l'hépatite murine (Holmes et Lai, 1996).

L'interaction entre la protéine N et les ARN génomiques nouvellement synthétisés forme la nucléocapside, qui s'associe à la glycoprotéine M ancrée à la surface de membranes intracellulaires, pour ainsi déterminer le site de bourgeonnement viral. Les glycoprotéines de surfaces S et HE sont incorporées dans la structure du virion au moment du bourgeonnement, qui s'effectue dans l'appareil de Golgi. Les nouveaux virions sont relargués dans l'espace intercellulaire par l'intermédiaire de vésicules à parois lisses qui se fusionnent avec la membrane cytoplasmique (Holmes et Lai, 1996).

1.4. Pathogénicité et immunité

Les coronavirus produisent un large éventail de manifestations pathologiques chez plusieurs espèces animales et chez l'humain. Chez ce dernier, les coronavirus causent une infection des voies respiratoires supérieures ayant les caractéristiques du rhume. Jusqu'à 30% des rhumes pourraient être causés par les deux sérotypes du coronavirus humain, soit 229E et OC43 (Myint, 1995). Plus rarement, les coronavirus ont été impliqués dans des infections des voies respiratoires inférieures, dans des pancréatites et péricardites et même dans certaines mononucléoses infectieuses (Myint, 1995). Chez la souris, le virus de l'hépatite murine, lorsque inoculé par voie intranasale, cause une infection des voies respiratoires qui s'étend au système nerveux central par le nerf olfactif, puis se dissémine dans plusieurs

organes, dont le foie (Dales et Anderson, 1995). L'infection au niveau du système nerveux central provoque, chez la souris, une encéphalite avec infection des neurones, des cellules gliales, des astrocytes, des oligodendrocytes et probablement les cellules de la microglie, suivie de symptômes paralytiques. La majorité des souris succombent à l'infection aiguë. Cependant dans certains cas, des souris survivent, et développent une infection chronique présentant des foyers de démyélinisation et de remyélinisation au niveau du cerveau et de la moelle épinière, qui sont habituellement caractéristiques de la sclérose en plaques (Talbot, 1995). De plus, l'administration d'anticorps antiviraux avant l'infection virale, atténue l'infection aiguë et provoque chez les souris traités une maladie chronique caractérisée par une infection des oligodendrocytes. Certains travaux suggèrent une origine auto-immune à la maladie causée par le coronavirus. En effet, le transfert adoptif de lymphocytes T de rats infectés par le coronavirus à des animaux sains, peut induire le développement d'une encéphalite allergique expérimentale ayant comme cible la protéine basique de la myéline (Watanabe et al., 1983). De plus, les souris infectées avec le MHV montrent une proportion élevée de cellules autoréactives (Kyuwa *et al.*, 1991).

Les mécanismes de défense contre l'infection par le coronavirus sont multiples, mais l'immunité humorale semble y jouer un rôle prédominant. La cible principale de la réponse immunitaire humorale est sans aucun doute la glycoprotéine de surface S. La protéine S induit chez la souris la production d'anticorps neutralisants et protecteurs (Collins *et al.*, 1982, Talbot *et al.*, 1984, Wege *et al.*, 1984, Gilmore *et al.*, 1987, Talbot *et al.*, 1988, Daniel et Talbot,

1990). Une région immunodominante a d'ailleurs été identifiée dans la portion C-terminale de la protéine (Daniel *et al.*, 1993). De plus, l'administration de glycoprotéine S immunopurifiée protège les souris contre l'infection virale (Daniel et Talbot, 1990). Les trois autres protéines structurales du coronavirus murin peuvent également induire la production d'anticorps protecteurs (Lecomte *et al.*, 1987, Fleming *et al.*, 1989, Yokomori *et al.* 1992). Les cellules NK semblent aussi jouer un rôle dans l'immunité anti-coronavirale puisque la pathogénicité induite par l'infection coronavirale est plus sévère chez les souris qui en sont dépourvues (Bukowski *et al.*, 1983). Le coronavirus entraîne également le développement d'une réponse à médiation cellulaire. En ce sens, l'induction de lymphocytes T CD4+ et CD8+ spécifiques au coronavirus murin a été rapportée à plusieurs reprises (Stohlman *et al.*, 1986, Williamson et Stohlman, 1990, Körner *et al.*, 1991, Yamagushi *et al.*, 1991, Mobley *et al.*, 1992, Flory *et al.*, 1993, Castro et Perlman, 1995, Stohlman *et al.*, 1995, Bergmann *et al.*, 1996). Toutefois, la contribution de chacun de ces mécanismes à la protection contre l'infection naturelle reste à être déterminée.

2. ANTICORPS ANTI-IDIOTYPIQUES

2.1. Antigénicité des immunoglobulines

La grande diversité moléculaire des immunoglobulines et des récepteurs des cellules T est une caractéristique intrinsèque des molécules du système immunitaire responsables de la liaison des antigènes. Cette même diversité leur confère un vaste éventail de spécificités et est à l'origine de l'antigénicité de régions spécifiques dans la structure même des immunoglobulines et des récepteurs des cellules T. Les premiers travaux ayant reconnu la capacité des

anticorps d'induire une réponse immunitaire furent ceux de Kunkel *et al.* (Kunkel *et al.*, 1963), et de Oudin et Michel (Oudin et Michel, 1963). Ces derniers définirent les régions antigéniques des anticorps comme étant des déterminants idiotypiques ou idiotopes, et l'ensemble de ces déterminants, l'idiotype. À l'origine, l'idiotypie des anticorps était considérée comme une propriété unique à chaque immunoglobuline. Maintenant on sait qu'il existe au moins deux groupes d'idiotopes. Les idiotopes uniques ou privés, sont portés par une seule immunoglobuline alors que l'idiotope à réaction croisée ou public, est partagé par divers anticorps. Par opposition, les anticorps dirigés contre ces déterminants idiotypiques sont appelés anticorps anti-idiotypiques.

2.2. Classification des anticorps anti-idiotypiques

Les anticorps anti-idiotypiques ou Ac2 peuvent être regroupés en plusieurs catégories (Bona et Kohler, 1984). Les Ac2 de type α sont dirigés contre des idiotopes situés hors du site de liaison de l'antigène (paratope) de l'anticorps porteur de l'idiotype, soit l'Ac1. Ce type d'Ac2 n'est donc pas en mesure d'inhiber l'attachement de l'Ac1 à l'antigène. Les Ac2 de type β sont probablement les anticorps anti-idiotypiques les plus recherchés car ils reconnaissent des idiotopes situés dans le site de liaison de l'antigène de l'Ac1, ils ont donc la capacité d'inhiber spécifiquement la liaison de l'Ac1 à l'antigène. Les Ac2 β sont également appelés "images internes" de l'Ac1 car ils peuvent adopter une conformation complémentaire au paratope de l'Ac1. Par conséquent, certaines régions de l'Ac2 ont le potentiel de mimer la conformation de l'épitope reconnu par l'Ac1. Finalement, les anticorps anti-

idiotypiques de type γ , comme les Ac2 β , interagissent avec des idiotopes situés dans le paratope de l'Ac1 ou à proximité de celui-ci, mais contrairement aux Ac2 β , ils ne représentent pas l'image interne de l'Ac1. Comme les Ac2 β , ils peuvent inhiber la liaison de l'Ac1 à l'antigène mais par un mécanisme encore mal défini. Deux hypothèses principales sont maintenant reconnues pour expliquer cette inhibition (Voss *et al.*, 1992). La première implique un encombrement stérique du paratope de l'Ac1, l'empêchant ainsi de lier l'antigène. La seconde fait intervenir un changement conformationnel dans la structure du paratope de l'Ac1. De toute évidence, ces deux mécanismes ne sont pas mutuellement exclusifs.

2.3. Concept du réseau idiotypique

En 1974, Niels Jerne (Jerne, 1974) proposait la théorie du réseau idiotypique par laquelle il postulait que le répertoire complet d'épitopes étrangers se trouve représenté à l'intérieur de l'organisme, par un vaste répertoire d'idiotopes présents sur les anticorps et les récepteurs des cellules T. Par ailleurs, il proposa également que le système immunitaire est gouverné par des interactions idio-anti-idiotype qui maintiennent l'équilibre entre les divers anticorps d'une réponse immunitaire. Prenons l'exemple d'un système où existe un équilibre entre un Ac1 et un Ac2. L'introduction de l'antigène reconnu par l'Ac1 dans un tel système viendrait rompre l'équilibre Ac1-Ac2 et restreindre l'activité suppressive de l'Ac2, et par conséquent, favoriser la prolifération et la différenciation des cellules sécrétrices de l'Ac1. Chaque Ac1 a la capacité d'induire la production d'Ac2 qui régularise l'expression de l'Ac1 par des interactions avec les cellules B sécrétrices de

cet anticorps. Conséquemment, l'Ac2 peut à son tour induire le développement d'anticorps anti-anti-idiotypiques (Ac3) qui gouvernent l'expression de l'Ac2. Comme il existe plusieurs idiotopes sur chaque immunoglobuline et que chacun d'entre eux peut induire la production d'Ac2, il y a donc formation d'un vaste réseau d'anticorps qui interagissent entre eux. C'est ce que Jerne a baptisé le réseau idiotypique. Mais cette cascade anti-idiotypique n'est pas sans fin puisque la concentration d'idiotopes diminue éventuellement sous le seuil d'immunogénicité.

2.4. Applications des anticorps anti-idiotypiques

La propriété qu'ont les anticorps anti-idiotypiques de mimer un antigène étranger que ce soit de façon structurelle ou fonctionnelle, a généré une multitude de travaux visant à exploiter ce potentiel. Il existe plusieurs avantages à utiliser des anticorps anti-idiotypiques pour induire une réponse immunitaire en remplacement de l'antigène natif. Par exemple, dans le cas où l'antigène est peu ou non disponible, qu'il est difficile ou trop coûteux à produire, qu'il pose un risque pathologique ou toxique ou qu'il est peu immunogène en soi, comme les polysaccharides ou les lipides. Les anticorps anti-idiotypiques ont également été utilisés pour identifier le récepteur spécifique de certains ligands, qu'ils soient viraux, chimiques ou hormonaux.

2.4.1. Antigènes parasitaires

La première vaccination contre un agent infectieux à l'aide d'anticorps anti-idiotypiques fut rapportée par Sacks *et al.* en 1982, avec le parasite *Trypanosoma brucei rhodesiense*, l'agent causal de la maladie du sommeil (Sacks *et al.*, 1982). Dans cette étude, une immunité protectrice a été

observée chez des souris immunisées avec des anticorps anti-idiotypiques polyclonaux de souris. Ces anticorps anti-idiotypiques étaient dirigés contre deux anticorps protecteurs spécifiques pour la glycoprotéine de surface majeure du parasite. Le même groupe a également vérifié le potentiel des anticorps anti-idiotypiques à induire une réponse immunitaire contre des polysaccharides du parasite *Trypanosoma cruzi* (Sacks *et al.*, 1985). Un Ac2 β a induit une réponse immunitaire spécifique pour un déterminant polysaccharidique chez plusieurs espèces animales, sans toutefois pouvoir protéger la souris contre l'infection. Par contre, une protection contre le parasite *Schistosoma mansoni* a été induite chez des rats vaccinés avec des anticorps anti-idiotypiques monoclonaux de rat, spécifiques pour un anticorps dirigé contre une glycoprotéine de surface du parasite (Grzych *et al.*, 1985). De plus, dans le même système, des anticorps anti-idiotypiques (Ac2) et anti-anti-idiotypiques (Ac3) ont été isolés à partir du même individu, immunisé avec un anticorps spécifique au parasite (Percy *et Ham*, 1988). Cette expérience démontre la présence des différents palliers du réseau idiotypique dans l'organisme, et par conséquent, la validité de la théorie de Jerne.

2.4.2. Antigènes bactériens

La vaccination anti-idiotypique suscite un grand intérêt dans le domaine de l'immunité anti-bactérienne. Le développement de la réponse immunitaire spécifique aux antigènes bactériens polysaccharidiques, se produit plus tardivement dans l'ontogénie comparativement aux antigènes protéiques, ayant pour conséquence que la vaccination des enfants contre les pathogènes bactériens, à l'aide de préparations vaccinales classiques, est souvent inefficace (Stein, 1985). Pour ces raisons, les anticorps anti-

idiotypiques représentent une alternative envisageable aux vaccins conventionnels.

L'utilisation d'antigènes bactériens pour l'étude du réseau idiotypique figure parmi les premiers travaux dans ce domaine. Déjà en 1975, Eichmann et Rajewsky avaient démontré que l'administration d'anticorps anti-idiotypiques de cobayes pouvait augmenter la réponse immunitaire cellulaire et humorale contre les polysaccharides du streptocoque du groupe A. Stein et Söderström ont rapporté que la réponse immunitaire de souris nouveaux-nés contre un antigène polysaccharidique d'*Escherichia coli* K13 pouvait être amorcée par l'administration d'anticorps anti-idiotypiques (Stein et Söderström, 1984). Une immunité protectrice contre *Streptococcus pneumoniae* a également été obtenue par l'administration d'anticorps anti-idiotypiques monoclonaux couplés au KLH (McNamara *et al.*, 1984).

2.4.3. Antigènes viraux

Plusieurs travaux ont porté sur la capacité des anticorps anti-idiotypiques à induire une réponse immunitaire antivirale. Cette abondance d'études est probablement la conséquence de l'absence de vaccins efficaces contre plusieurs infections virales. Un modèle qui a été très bien caractérisé est celui du réovirus du type III. L'hémagglutinine (HA) du réovirus est responsable du tropisme cellulaire du virus et est la cible principale de la réponse immunitaire cellulaire et humorale anti-réovirus. Un anticorps anti-idiotypique monoclonal, dirigé contre un anticorps anti-HA du réovirus, a été produit et caractérisé en détail par le groupe de Greene *et al.* (Nepom *et al.*, 1982). Cet anticorps anti-idiotypique répond à tous les critères essentiels pour être classifié comme un

Ac2 β . Il mime de façon fonctionnelle la HA du réovirus du type III en se liant spécifiquement à son récepteur cellulaire (Noseworthy *et al.*, 1983). Il peut également inhiber l'infection du réovirus en empêchant son attachement aux cellules cibles (Dichter *et al.*, 1986). Il induit la production d'anticorps antiviraux chez plusieurs espèces animales (Gaulton *et al.*, 1986), et le développement d'une immunité cellulaire chez des souris non préalablement sensibilisées (Sharpe *et al.*, 1984). Les bases moléculaires impliquées dans le mimétisme de cet anticorps ont également été élucidées. En effet, une homologie entre la séquence nucléotidique d'une région de la HA du réovirus, et une portion de la région variable de la chaîne légère de cet anticorps, a été identifiée (Bruck *et al.*, 1986).

Le virus de l'hépatite B a également fait l'objet de plusieurs travaux impliquant les anticorps anti-idiotypiques. Un anticorps anti-idiotypique polyclonal produit chez le lapin, a induit la production d'anticorps neutralisants antiviraux chez la souris. Cet anticorps réagit avec plusieurs anticorps spécifiques de l'antigène de surface du virus, provenant de différentes espèces animales, ce qui suggère son appartenance à la catégorie des Ac2 β (Kennedy *et al.*, 1983). De plus, cet anticorps a la capacité d'induire la production d'une réponse immunitaire protectrice chez le chimpanzé (Kennedy *et al.*, 1986) qui, avec l'homme, est la seule espèce animale susceptible au virus de l'hépatite B.

Un anticorps anti-idiotypique syngénique a été produit contre un anticorps protecteur spécifique pour le poliovirus du type II (Uytdehaag et Osterhaus, 1985). Cet anticorps réagit avec un idiotope public présent sur

plusieurs anticorps anti-poliovirus du type II. L'immunisation de souris avec cet anticorps anti-idiotypique a induit la production d'Ac3 spécifiques pour le poliovirus et capables de neutraliser faiblement l'infection virale *in vitro*. Malgré la présence d'anticorps faiblement neutralisants dans le sérum des souris immunisées avec cet anticorps, aucune protection significative n'a été observée suite à une épreuve virale avec une dose létale de virus.

Le potentiel antigénique des anticorps anti-idiotypiques a également été étudié chez le virus de la gastro-entérite transmissible du porc (TGEV), un membre de la famille des *Coronaviridae*. Dans une première étude, un anticorps anti-idiotypique polyclonal a été produit chez le porc, suite à l'injection d'un anticorps monoclonal murin capable de neutraliser l'infection par le TGEV (Hariharan *et al.*, 1989). Après purification, cet anti-idiotypique s'est avéré capable d'inhiber l'attachement de l'Ac1 à l'antigène. De plus, son injection à des souris a déclenché la production d'anticorps spécifiques au TGEV, et capables de neutraliser l'infection virale *in vitro*. Par contre, l'apparition d'anticorps neutralisants a nécessité sept injections de l'anticorps, dont trois injections intraveineuses.

Dans une étude plus récente, six anticorps anti-idiotypiques monoclonaux ont été sélectionnés pour leur capacité d'inhiber l'attachement d'un anticorps anti-TGEV à l'antigène viral (Sune *et al.*, 1991). Quatre de ces anticorps ont été classés dans la catégorie des Ac2 γ alors que les deux autres, réagissant avec des sérums anti-TGEV provenant de deux espèces différentes, ont été identifiés comme étant des Ac2 β . La présence d'anticorps spécifiques au TGEV a été détectée chez toutes les souris injectées avec les

deux Ac2 β , alors que seulement 25 à 50% des souris ayant reçu les Ac2 γ ont développé de tels anticorps. Finalement, les deux types d'Ac2 ont induit la production d'Ac3 neutralisants dirigés contre la protéine de surface (S) du TGEV.

2.5. Études structurelles

Les premiers efforts de compréhension des bases structurelles des interactions idiotype-anti-idiotype étaient basés sur des tests sérologiques. Les résultats de ces travaux ont démontré que l'idiotype est généralement formé des régions variables de chacune des deux chaînes des anticorps, et que la plupart des idiotopes sont localisés à proximité du site de liaison de l'antigène. Cette dernière constatation est basée sur la capacité qu'ont certains haptènes d'inhiber l'attachement de l'anti-idiotype à l'idiotype (Greenspan et Bona, 1993).

D'autres travaux s'appuient sur la corrélation entre l'expression d'un idiotype donné, et sa séquence en acides aminés. Ces études ont permis de définir certains concepts sur la structure des idiotypes: 1- la troisième région hypervariable des immunoglobulines semble jouer un rôle prédominant dans l'expression de l'idiotype; 2- toutes les régions hypervariables d'un anticorps peuvent contribuer à l'idiotype; 3- des mutations qui ne semblent avoir aucun effet sur l'expression d'un idiotope, peuvent potentialiser les effets d'autres mutations lorsque introduites simultanément (Greenspan et Bona, 1993). Une approche alternative fait appel à des peptides synthétiques, synthétisés généralement à partir des régions hypervariables d'un anticorps idiotypique,

pour l'induction d'anticorps anti-idiotypiques de spécificité prédéfinie (McMillan *et al.*, 1983).

L'approche la plus fiable pour déterminer les bases moléculaires des interactions idiotype-anti-idiotype est sans aucun doute la cristallographie. L'étude pionnière de Bentley *et al.* sur le modèle du lysozyme a démontré de façon éclatante les propriétés de mimétisme structurel des anticorps anti-idiotypiques (Bentley *et al.*, 1990, Fields *et al.*, 1995). La structure tridimensionnelle d'un complexe idiotope-anti-idiotope cristallisé a été comparée à celle du complexe idiotope-antigène, et a montré que l'anticorps anti-idiotypique et l'antigène se chevauchent parfaitement au site de liaison de l'idiotope. Environ la moitié des acides aminés impliqués dans l'interaction avec l'antigène font également partie de l'idiotope reconnu par l'anticorps anti-idiotypique.

2.6. Mimétisme moléculaire

Les propriétés de mimétisme antigénique que possèdent les anticorps anti-idiotypiques, qu'elles soient fonctionnelles, séquentielles ou structurelles, ont été observées dans plusieurs systèmes, et par différentes approches. L'exemple le mieux caractérisé est probablement celui du réovirus de type 3, qui a été décrit précédemment (Bruck *et al.*, 1986). Dans cette étude, une région d'homologie entre la chaîne légère d'un anticorps anti-idiotypique et une région de l'hémagglutinine du réovirus, a été mise en évidence. De plus, un peptide synthétique correspondant à la région de la chaîne légère présentant l'homologie, avait la capacité de se lier à divers anticorps antiviraux, et au récepteur β -adrénergique. Dans une autre étude, une région

d'homologie partielle entre une région hypervariable d'un anticorps anti-idiotypique et un épitope de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B, a été observée (Pride *et al.*, 1992, Rajadhyaksha et Thanavala, 1995, Yang et Thanavala, 1995). De plus, un peptide comprenant l'homologie identifiée, stimule la production de lymphocytes T et B capables de se lier à l'anticorps anti-idiotypique complet, et à l'antigène viral. Un autre exemple, qui illustre bien le caractère superposable des différents palliers d'anticorps du réseau idiotypique est celui du système de l'angiotensine II (Garcia *et al.*, 1992). Dans cette étude, la comparaison des séquences des régions variables des Ac1 et Ac3 a dévoilé une identité presque parfaite, ce qui suggère fortement que l'Ac2 qui a servi à la production de l'Ac3 possédait une structure similaire à l'antigène. Finalement, des patients porteurs de tumeurs exprimant l'antigène carcino-embryonnaire (CEA) ont été vaccinés avec un anticorps anti-idiotypique monoclonal mimant un épitope du CEA (Foon *et al.*, 1995). La vaccination anti-idiotypique a pu briser la tolérance immunitaire, normalement observée pour le CEA, ce qui a entraîné une nette amélioration de l'état des patients traités. Cette étude illustre brillamment le potentiel des anticorps anti-idiotypiques pour la vaccination humaine.

3. ANTICORPS RECOMBINANTS ET BANQUES DE PHAGES

La première description de l'expression de fragments d'anticorps fonctionnels dans un système procaryotique a été rapportée simultanément par deux groupes en 1988 (Better *et al.*, 1988, Skerra et Plückthun, 1988). Skerra et Plückthun ont obtenu l'expression d'un fragment Fv fonctionnel, chez *E. coli*, comprenant uniquement les régions variables des chaînes lourdes et légères d'un anticorps anti-phosphorylcholine. L'équipe de Better a

quant à elle exprimé, également chez *E. coli*, le fragment Fab d'un anticorps anti-carcinome. La plus grande révolution dans le domaine de l'expression d'anticorps recombinants est survenue lorsque le clonage du répertoire d'immunoglobuline dans le phage lambda a été rendu possible (Huse *et al.*, 1989). Dans ce système, les gènes des régions variables des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines sont amplifiés par PCR et combinés aléatoirement pour être ensuite exprimés chez *E. coli*. Cette approche a été raffinée par McCafferty *et al.* qui ont utilisé la technique développée par Smith en 1985, qui permet d'exprimer des peptides à la surface de phages filamenteux (Smith, 1985). Ils ont remplacé le peptide par des fragments d'anticorps fonctionnels permettant ainsi de sélectionner uniquement les anticorps capables de lier l'antigène (McCafferty *et al.*, 1990). Aujourd'hui, des banques de phages d'une très grande diversité permettent d'exprimer le répertoire complet d'immunoglobulines à la surface de phages filamenteux, offrant la possibilité d'isoler des anticorps de diverses spécificités sans même avoir à cloner le répertoire d'anticorps spécifiques à l'antigène (Marks *et al.*, 1991, Griffiths *et al.*, 1994, Nissim *et al.*, 1994).

L'expression de fragments d'anticorps antiviraux, par des techniques conventionnelles de clonage ou par sélection à partir de banques de phages, a été décrite à plusieurs reprises. Certains de ces fragments possédaient même la propriété de neutraliser l'infection virale (Condra *et al.*, 1990, Barbas III *et al.*, 1992a, Barbas III *et al.*, 1992b, Cheung *et al.*, 1992, Jiang *et al.*, 1994). L'expression de fragments d'anticorps antiviraux à l'intérieur des cellules peut également protéger contre l'infection du virus. Cette stratégie a été utilisée contre un virus des plantes (Tavladoraki *et al.*, 1993), contre le

virus de l'immunodéficience acquise (Marasco *et al.*, 1993, Duan *et al.*, 1994) et contre un flavivirus (Jiang *et al.*, 1995). Le transfert passif d'un anticorps recombinant complet, spécifique pour le virus de l'herpès simplex et dérivé d'un fragment Fab, isolé d'une banque de phages filamenteux, a pu protéger des souris "nude" contre l'infection virale (Sanna, *et al.*, 1996). Cette étude démontre le potentiel des banques phagiques pour l'isolement d'anticorps antiviraux ayant des applications pour l'immunothérapie antivirale. Cependant, aucune étude n'a vérifié le potentiel protecteur *in vivo* de fragments d'anticorps recombinants.

CHAPITRE 2

ÉTUDE DES MÉCANISMES DE PROTECTION CONTRE L'INFECTION CORONAVIRALE À L'AIDE DE FRAGMENTS D'ANTICORPS

Introduction à l'article I

Dans le but de mieux définir les mécanismes de protection contre l'infection coronavirale par les anticorps, et plus précisément d'évaluer le rôle que jouent la bivalence et le fragment Fc des immunoglobulines dans cette protection, les fragments $F(ab')_2$ et Fab de l'AcMo 7-10A ont été produits et leur capacité protectrice évaluée chez la souris. L'AcMo 7-10A avait déjà été produit et partiellement caractérisé avant mon arrivée au laboratoire (Daniel et Talbot, 1990). Il s'agit d'une IgG2a spécifique pour la glycoprotéine de surface du coronavirus murin MHV-A59. Cet anticorps a la capacité d'inhiber la fusion cellulaire induite par l'infection virale, de fortement neutraliser le virus *in vitro* et de protéger les souris contre l'infection *in vivo*.

Les résultats obtenus pour cette partie de mon projet de doctorat ont été publiés dans "The Journal of Immunology" et constituent la première partie de ce chapitre. Ces travaux ont permis de constater que le fragment Fc de l'AcMo 7-10A n'était pas essentiel pour son activité protectrice, puisque les fragments $F(ab')_2$ avaient des titres de neutralisation et de protection similaires à ceux de l'anticorps complet. De plus, la bivalence a également été démontrée comme étant non essentielle pour la protection puisque les fragments Fab de l'AcMo 7-10A ont pu protéger les souris contre l'infection coronavirale, mais toutefois, avec une moins grande efficacité que l'anticorps complet ou ses fragments $F(ab')_2$. Ces résultats suggèrent l'utilisation, par l'anticorps 7-10A, de mécanismes de protection qui seraient indépendants du fragment Fc et de la bivalence mais probablement fortement influencés par l'affinité de l'anticorps. De plus, il s'agit de la première description de protection contre une infection virale par transfert passif de fragments Fab.

ARTICLE I

**PROTECTION FROM LETHAL CORONAVIRUS INFECTION BY
IMMUNOGLOBULIN FRAGMENTS**

Alain LAMARRE et Pierre J. TALBOT

Virology Research Center, Institut Armand-Frappier, Université du Québec,
Laval, Québec, CANADA, H7N 4Z3

Article publié dans: *The Journal of Immunology* (1995), **154**: 3975-3984.

ABSTRACT

Molecular mechanisms of *in vitro* and *in vivo* virus neutralization by specific antibody remain largely undefined. Murine coronaviruses provide an excellent animal model for such studies. In order to determine the role of antibody bivalency and the contribution of its Fc portion in the neutralization of viral infectivity and passive protection of mice by an *in vitro* neutralizing and *in vivo* protective monoclonal antibody (7-10A), F(ab')₂ and Fab fragments were generated and their biological properties were examined. The two fragments reacted in ELISA like the whole antibody against viral antigen or specific anti-idiotypic antibodies. The affinity constants of the different antibody preparations were determined by surface plasmon resonance using immobilized anti-idiotypic antibodies. The apparent affinity constant of the whole antibody molecule was $7.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ and was reduced 2-fold for F(ab')₂ fragments and 14-fold for Fab molecules. Like whole antibody, both F(ab')₂ and Fab fragments could neutralize virus *in vitro* and passively protect mice *in vivo*. However, the efficiency of *in vivo* neutralization by Fab fragments was reduced compared to the bivalent molecules, despite almost identical half lives of both types of antibody fragments. These results demonstrate that *in vitro* and *in vivo* virus neutralization mechanisms by this antibody are independent of Fc-mediated functions and bivalency, but are probably influenced by antibody avidity. Also, this is the first report of *in vivo* protection against a viral infection by Fab fragments of antiviral antibody.

INTRODUCTION

Coronaviruses are implicated in a number of human and animal infections of the respiratory, gastrointestinal and neurological systems (Wege *et al.*, 1982, Spaan *et al.*, 1990). Valuable information about coronavirus pathogenicity has been obtained from the study of murine hepatitis virus (MHV) infection mechanisms. Some neurotropic strains of MHV can induce chronic diseases in rodents that resemble human disorders such as multiple sclerosis (Siddell *et al.*, 1983b) and provide excellent models of virus-induced central nervous system diseases.

Alteration of MHV pathogenicity by antiviral immune components has been the subject of a number of studies. Some murine anti-viral mAb are known to passively protect mice against acute coronavirus-induced encephalitis or hepatitis. Although the mechanisms of passive protection by mAb often remain unclear, protection from MHV infection has been reported with mAb specific for all four major structural proteins of coronaviruses: S, M, N and HE (Buchmeier *et al.*, 1984, Lecomte *et al.*, 1987, Fleming *et al.*, 1989, Daniel and Talbot, 1990, Yokomori *et al.*, 1992) and modulation of MHV-induced pathology from acute encephalitis to chronic demyelination resulting in substantial neuron sparing was observed in several instances (Buchmeier *et al.*, 1984, Fleming *et al.*, 1989, Yokomori *et al.*, 1992). Interestingly, *in vitro* neutralization of viral infectivity, which usually targets the S glycoprotein, does not always correlate with *in vivo* protection, which suggests that antibody-mediated viral clearance can involve processes that go beyond *in vivo* neutralization, such as complement-mediated cytolysis of infected cells or antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) (Fleming *et al.*, 1989, Koolen *et al.*, 1990, Yokomori *et al.*, 1992, Daniel *et al.*, 1993, Talbot and Lemieux

unpublished observations). However, the importance of these antibody-dependent processes in passive protection has never been specifically demonstrated in a coronavirus system. On the other hand, the role of the Fc fragment in antibody-mediated pathogen clearance has been studied in different infection models. For example, antibody-mediated clearance of respiratory syncytial virus from the lungs of Cotton rats could occur in the absence of the Fc portion of IgG, suggesting a complement-independent, cell-independent viral-clearance mechanism (Prince *et al.*, 1990). In contrast, it was shown that rabbit anti-herpes simplex virus F(ab')₂ antibody fragments retained their capacity to neutralize infection *in vitro* despite their inability to mediate complement-mediated cytolysis. However, when F(ab')₂ fragments were passively transferred 8 h after infection, no protection was observed, which suggested the importance of the Fc portion of antibody in mediating recovery from infection (Oakes and Lausch, 1981). In addition, it was reported that F(ab')₂ fragments of a protective mAb were as effective as the intact IgG in preventing relocalization of *Streptococcus mutans*, but that the Fab fragments failed to do so, suggesting that bivalency of intact IgG and F(ab')₂ may be an essential criterion for the protective effect of this mAb (Ma *et al.*, 1990).

The aim of the present study was to use a well-characterized and biologically active anti-coronavirus antibody (mAb 7-10A) to determine, for the first time in a coronavirus experimental system, the contribution of the Fc portion of an antibody and the importance of antibody bivalency in *in vitro* neutralization and passive *in vivo* protection of mice against MHV-induced encephalitis. For that purpose, the biological activities of F(ab')₂ and Fab fragments of mAb 7-10A were compared to that of the whole immunoglobulin molecule.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Male or female, 6- to 7-week-old, MHV-seronegative BALB/c mice (Charles River, St-Constant, Québec, Canada) were used in all experiments.

Virus and cells. The A59 strain of MHV (MHV-A59) was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD), plaque-purified twice, and passaged on DBT cells as described previously (Daniel and Talbot, 1987).

mAb, F(ab')₂ and Fab fragments. The production and characterization of the murine neutralizing mAb 7-10A, specific for the S (spike) glycoprotein of MHV-A59, has been described elsewhere (Daniel and Talbot, 1990). Purification of mAb 7-10A was carried out by standard Protein-A-Sepharose chromatography (Manil et al., 1986). F(ab')₂ fragments of mAb 7-10A were obtained by pepsin digestion. Briefly, purified mAb 7-10A at a concentration of 2 mg/ml was dialyzed against citrate buffer, pH 4.0, and mixed with pepsin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) dissolved in citrate buffer, pH 3.5, at a ratio of 100 units of pepsin per mg of antibody. The mixture was incubated for 7 h at 37°C and the reaction stopped with 1/10 volume of 3 M Tris-HCl buffer, pH 8.8. Undigested antibodies were eliminated by Protein-A-Sepharose chromatography. Purified F(ab')₂ fragments were dialyzed against PBS, pH 7.4, and stored at -20°C until use. Fab fragments were obtained after digestion of 10 mg of purified mAb 7-10A in 0.1 M acetate and 3 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) buffer, pH 5.5, with 0.5 mg papain (Sigma) preactivated with 20 mM cysteine (Sigma) for 8 h at 37°C. The reaction was stopped by adding 30 mM iodoacetamide (Sigma). The reaction mixture was then passed through a Protein-A-Sepharose column to eliminate Fc fragments and undigested antibodies. Purified Fab fragments were

dialyzed against PBS, pH 7.4, and stored at -20°C until use. The purity of the fragments was evaluated by standard sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under non-reducing conditions and Coomassie blue staining (Laemmli, 1970), followed by densitometry with a GS-670 laser densitometer (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada).

ELISA for the determination of the activities of mAb, F(ab')₂ and Fab fragments. All incubations were performed at room temperature (about 25°C). Each well of 96-well microtiter plates was coated with 15 ng of affinity-purified anti-idiotypic antibodies prepared as described previously from a rabbit immunized with mAb 7-10A (Lamarre *et al.*, 1991), or 500 ng of viral antigen prepared from MHV-A59-infected cells, as described previously (Talbot *et al.*, 1984). After overnight incubation, the remaining binding sites in the wells were blocked with PBS containing 10% (v/v) fetal calf serum (FCS) and 0.2% (v/v) Tween-20 for 90 min. Serial three-fold dilutions of purified mAb 7-10A, F(ab')₂ or Fab fragments were added to the wells and incubated for 90 min. The wells were washed 5 times with PBS containing 0.1% (v/v) Tween-20 (PBS-T) and peroxidase-labeled goat anti-mouse IgG (Fab specific) antibodies (Sigma) were then added and the plates incubated for another 90 min. The plates were washed 5 times with PBS-T and the bound peroxidase revealed by incubation with *O*-phenylenediamine and hydrogen peroxide. The reaction was stopped with 1 N HCl and the absorbance read at 492 nm using an SLT EAR 400 AT plate reader.

ELISA for detection of inhibition of binding of mAb 7-10A by F(ab')₂ and Fab fragments. The wells of 96-well microtiter plates were coated with viral antigen or anti-idiotypic antibodies as described above and incubated overnight. Serial three-fold dilutions of purified F(ab')₂ or Fab fragments were added to the wells and incubated for 90 min, after which the wells were

emptied and purified mAb 7-10A added without any previous washing. After incubation for another 90 min, peroxidase-labeled goat anti-mouse IgG (Fc specific) (ICN Biomedicals, Mississauga, Ontario, Canada) was added and the plates incubated for 90 min. All subsequent steps were performed as described above. The amount of purified mAb 7-10A added in this test was determined in a binding ELISA in which an absorbance value at 492 nm of about 1.0 was achieved in the absence of inhibition by antibody fragments.

Measurement of binding kinetic constants. The molecular interactions of mAb 7-10A and of its F(ab')₂ or Fab fragments with a specific anti-idiotypic antibody were measured using the BIAcore™ system (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden). The dextran matrix was activated with N-ethyl N-(3 diethyl aminopropyl)-carbodiimide (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) before immobilization of anti-idiotypic antibody, which was followed by saturation of the matrix surface with 1 M ethanolamine. In three separate experiments, from 3400 to 7100 resonance units (RU) of the anti-idiotypic antigen were immobilized by injecting 35 µl of a 25 µg/ml antibody solution in formic acid buffer, pH 4.0, using a flow rate of 5 µl/min. A mouse monoclonal antibody of irrelevant specificity and of the same isotype as 7-10A was used as a control antibody (mAb 1B5B1, a generous gift of J. Lecomte, Institut Armand-Frappier). To measure the kinetic binding constants of mAb 7-10A and its F(ab')₂ and Fab fragments, different concentrations of each molecule in HBS buffer [10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, 0.05% (v/v) Tween-20], pH 7.4, ranging from 4.4 to 75 nM for calculation of the association constant and 750 nM for the calculation of the dissociation constant were injected at a continuous flow rate of 3 µl/min. The surface was regenerated between each injection with 10 ml of 100 mM HCl. The kinetic constants were calculated using the BIAevaluation software. Immobilization of virus was

performed directly with concentrated virus (132 µg/ml) in formic acid buffer at pH 3.0 and indirectly by capture of this virus with covalently linked virus-specific mAb 7-10A.

Virus-neutralization assay. Duplicate serial dilutions of purified mAb 7-10A, F(ab')₂ or Fab fragments were incubated with approximately eighty plaque-forming units (PFU) of MHV-A59 for 1 h at 37°C. In one experiment, 5 µl of goat anti-mouse IgG (Fab specific) antisera (Sigma) was added to each dilution of Fab fragments 10 min after addition of the virus and were incubated for another 50 min at 37°C. The mixtures were transferred onto 12-well plates containing confluent monolayers of DBT cells. After an adsorption period of 1 h at 37°C, the virus-antibody mixtures were removed and cells were overlaid with 1.5% (w/v) agarose in Earle's minimum essential medium/Hank's M199 (1:1, v/v) (Gibco Canada, Burlington, Ontario) supplemented with 5% (v/v) FCS. Plates were incubated for 48 h at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% (v/v) CO₂, after which the cells were fixed with formaldehyde and stained with crystal violet. Viral neutralization titers are expressed as the quantity of antibody neutralizing 50% of input viral infectivity.

Biological half-lives of mAb, F(ab')₂ and Fab fragments. Possible aggregates of purified mAb 7-10A were eliminated by centrifugation at 100 000 x g for 60 min in a Beckman L5-65 ultracentrifuge using a SW 50.1 rotor spun at 33000 rpm. Concentrations of deaggregated mAb 7-10A and of the different antibody fragments were determined by absorbance at 280 nm and 300 µg of each preparation was injected intraperitoneally into each BALB/c mouse in a group of five. Immediately prior and 1, 3, 7, 15, 21, and 28 days after injection of the whole 7-10A antibody or 2, 4, 6, 8, 10, 12, and 24 h after F(ab')₂ and Fab injections, small blood samples were obtained by bleeding

individual animals from the retro-orbital plexus. After centrifugation at 14 000 x g for 20 min, plasma samples were stored at -20°C until assayed by ELISA.

ELISA for determination of biological half-lives of mAb, F(ab')₂ and Fab fragments. Wells of 96-well microtiter plates were coated with MHV-A59-infected DBT cell lysates and blocked as described above. Serial five-fold dilutions of mouse plasmas were added to the wells and incubated for 90 min. The wells were washed 5 times with PBS containing 0.1% (v/v) Tween-20 (PBS-T) and peroxidase-labeled goat anti-mouse IgG antibodies (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc, Gaithersburg, MD) for the whole antibody and goat anti-mouse Fab for the F(ab')₂ and Fab fragments (Sigma) were added and the plates incubated for 90 min. All subsequent steps were performed as described above. Virus-specific antibody titers were determined for each time point as the plasma dilution that yielded an arbitrary optical density of 0.4.

Passive immunizations. BALB/c mice (Charles River) were injected intraperitoneally with 150 µg of purified 7-10A mAb, F(ab')₂ or Fab fragments 2 h prior to challenge with 5 x 10⁵ PFU (10 LD₅₀) of MHV-A59 injected intracerebrally. The F(ab')₂ group of mice received a second injection of F(ab')₂ fragments 4 h after viral challenge whereas Fab fragments were injected 4 and 10 h post-challenge. Control animals received only MHV-A59 without antibody injections. In a second experiment, a group of five mice received 150 µg of purified Fab fragments 2 h before viral challenge. Mice received additional daily injections of 300 µg of purified Fab fragments for 5 days. In a third experiment, a group of five mice were injected with 3 µg of purified F(ab')₂ fragments 2 h before viral challenge and received additional daily injections with 6 µg of the same preparation. In a fourth experiment, groups of five to eight mice received 1, 10, 50, 150 or 500 µg of purified 7-10A mAb or F(ab')₂ fragments, or 500 µg of Fab fragments. In this experiment, viral

replication in brain and liver of mice that had received 500 μg of whole antibody or its fragments was quantitated by plaque assay as described below.

Determination of virus titers in tissues of infected mice. Brains and livers of infected animals were dissected out under a laminar flow hood and brought to 10% (w/v) in sterile PBS. Tissues were homogenized with a Polytron homogenizer (Brinkmann Instruments, Inc., Rexdale, Ontario) and diluted 10-fold in Earle's minimum essential medium/Hank's M199 (1:1, v/v) (Gibco) supplemented with 5% (v/v) FCS. The dilutions of tissue homogenates were transferred onto 12-well plates containing confluent monolayers of DBT cells. All subsequent steps were performed as described above for the virus-neutralization assay.

RESULTS

The mAb 7-10A was purified by standard Protein-A-Sepharose chromatography. F(ab')₂ and Fab fragments were obtained by digestion with pepsin and papain, respectively, as described in *Materials and Methods* and their purity was evaluated by analysis with SDS-PAGE (Fig. 1). Densitometric scanning showed that the antibody fragments were more than 90% pure (data not shown).

To determine if F(ab')₂ and Fab fragments of mAb 7-10A had the same reactivity as the whole antibody molecule, their binding properties for viral antigen or specific anti-idiotypic antibodies was determined by ELISA. Representative results presented in Fig. 2 show that the whole 7-10A molecule and both fragments bound similarly to the MHV-A59 viral preparation when detected by peroxidase-labeled anti-mouse Fab antibodies. In addition, the three antibody preparations bound equally well to the specific anti-idiotypic antibodies, although the signal was much higher compared to viral antigen. The much steeper slope profiles of the ELISA binding curves for the antibodies binding to the anti-idiotypic antibodies suggests a higher affinity for this surrogate antigen. No reaction was detected when a peroxidase-labeled anti-mouse Fc antibody was used for detection of bound antibody fragments, confirming the absence of intact 7-10A mAb in the purified fragment preparations (data not shown). This experiment demonstrated that the digestion procedure had no significant effect on the binding of mAb to viral antigen or anti-idiotypic antibodies.

As a preliminary test of their relative avidities for antigen, the ability of the 7-10A fragments to inhibit the attachment of intact antibody to viral antigen or anti-idiotypic antibodies was examined. As shown in Fig. 3, F(ab')₂ fragments

pl of the ligand, which probably denatured this enveloped coronavirus and inhibited antibody binding, despite immobilization of about 1000 RU of viral material. We were also successful in trapping MHV-A59 virions by a virus-specific mAb covalently linked to the matrix. About 3500 RU of virus were captured by this method. However, substantial interactions of the captured virus with mAb 7-10A or the fragments were not observed.

To verify if bivalency or the Fc portion of the antibody was needed for neutralization of viral infection, eighty plaque-forming units (PFU) of MHV-A59 were incubated for 1 h at 37°C with dilutions of purified 7-10A mAb or the F(ab')₂ and Fab fragments and the residual infectivity was tested on DBT murine fibroblast cells. Viral neutralization titers are shown in Table II and represent the concentration of antibody neutralizing 50% of viral infectivity. Neutralization titers for the whole antibody molecule and the F(ab')₂ fragments were similar, indicating that the Fc portion of the antibody does not play a critical role in the *in vitro* neutralization process of MHV-A59 by mAb 7-10A. In contrast, Fab fragments showed neutralization activity reduced by 66 to 30-fold in comparison with the intact 7-10A antibody or the F(ab')₂ fragments, respectively. This reduction in the neutralizing capacity of the Fab fragments could possibly be attributed to a weaker avidity of the monovalent molecule as demonstrated above by the inhibition of mAb 7-10A binding to antigen (Fig. 3) and by the affinity constants obtained by surface plasmon resonance (Table I). To determine if the addition of anti-Fab fragments antibodies would cross-link Fab molecules and simulate bivalent binding, dilutions of Fab fragments were incubated with MHV-A59 in the presence of goat anti-mouse Fab-specific antisera and residual infectivity was detected on DBT cells. Fifty-percent neutralization titer of MHV-A59 by Fab fragments was increased by about 19-fold to a level almost comparable to that shown by F(ab')₂ fragments. Even

though a low level of non-specific viral neutralization was observed with the anti-Fab antiserum alone, this would account for a maximum 2-fold increase of the neutralization titer of Fab fragments and did not affect neutralization levels observed with bivalent antibodies (data not shown). Moreover, 100% viral neutralization observed with bivalent molecules could only be achieved with Fab fragments when these had reacted with anti-Fab antibodies (data not shown).

To determine if the *in vitro* neutralization titers would correlate with *in vivo* neutralization, the different fragments were tested for their ability to protect BALB/c mice from a normally lethal MHV-A59 intracerebral challenge. Biological half-lives of the different antibody preparations were first determined to rule out any differences in survival due to different *in vivo* turnover rates. Groups of five MHV-A59-seronegative BALB/c mice received 300 μ g each of purified mAb 7-10A, F(ab')₂ or Fab fragments intraperitoneally. Plasma samples taken at different times after injection were analyzed for MHV-A59 binding by ELISA. Virus-specific antibody titers of each mice were determined for each time-point. Fig. 5 shows representative turnover curves of one mouse for each group and Table III presents the intravascular half-lives of the three antibody preparations calculated from such curves. Biological half-lives of the F(ab')₂ and Fab fragments were very similar whereas the whole 7-10A molecule showed much higher *in vivo* stability, demonstrating that the Fc fragment is mainly responsible for reduced *in vivo* clearance and that monovalency and the lower molecular weight of the Fab when compared to the F(ab')₂ fragments does not accelerate its turnover rate.

The capacity of purified mAb 7-10A, F(ab')₂ and Fab fragments to passively protect mice from an otherwise lethal virus infection was then evaluated (Fig. 6). A single 150- μ g administration of the intact 7-10A antibody

protected all animals from lethal encephalitis whereas 80% of mice that received 150 μg of purified $\text{F}(\text{ab}')_2$ fragments before and after viral challenge survived. In contrast, all animals that received three 150- μg injections of Fab fragments died within 6 days whereas mice that received no antibody injections before or after viral challenge died in about 4 days. To verify whether the observed 2-day delay in mortality following Fab injections could be increased by injecting more Fab for a longer period of time, a second experiment was performed where mice were injected with 150 μg of Fab fragments 2 h before viral challenge and received 300- μg daily injections of the same preparation for five days. All animals survived the viral infection (Fig. 6). To exclude the possibility that trace amounts of $\text{F}(\text{ab}')_2$ fragments contaminating the Fab preparation (Fig. 1) could be responsible for the protection observed, a third experiment was undertaken. The proportion of $\text{F}(\text{ab}')_2$ fragments in the Fab preparation was estimated by laser densitometry to be about 2 % of total proteins using a peak enhancement method which gives an overestimation of the actual quantity in order to increase the resolution of very faint bands. The maximum estimated quantity of purified $\text{F}(\text{ab}')_2$ fragments that would contaminate the Fab preparation was administered to a group of five mice following the same injection protocol as the second experiment described above. All animals died from viral challenge, demonstrating that the contaminating $\text{F}(\text{ab}')_2$ fragments could not account for the observed protection by repeated injections of Fab fragments (data not shown).

To determine if the protection observed with the different antibody preparations correlated with reduced viral replication in infected animals, mice were injected with a single 500- μg dose of whole antibody, $\text{F}(\text{ab}')_2$ or Fab fragments and challenged 2 h later with virus. Two days post-infection, at

which time control untreated animals started to die and therefore represented a peak in viral replication, virus levels in the brains and livers, two major target organs for this virus, were determined by a plaque assay and compared to viral titers in control animals (Table IV). No virus was detected in brain and liver of two mice that received the whole antibody molecule. Reduced amounts of infectious virus were detected in the brain of only one animal injected with F(ab')₂ fragments whereas no virus could be detected in a second animal. In comparison, control mice showed high infectious virus titers in brain and liver. Interestingly, virus titers in the brains of mice immunized with 500 µg of purified Fab fragments were significantly reduced compared to controls and very little hepatic involvement was observed.

To quantitate the protective capacity of the different antibody preparations, different amounts of whole antibody or F(ab')₂ fragments ranging from 1 to 500 µg, or 500 µg of Fab fragments (only this high dose of Fab fragments was used since a previous experiment had shown that lower doses of purified Fab fragments were not sufficient to completely protect animals) were injected intraperitoneally to groups of mice 2 h before virus challenge and survival curves obtained (Fig. 7). Whole antibody and F(ab')₂ fragments showed similar dose response curves. Protection of 50% of animals required about 50 µg of whole antibody and between 50 and 150 µg of F(ab')₂ fragments. In contrast, as much as 500 µg of purified Fab fragments were needed to achieve the same level of protection.

These passive animal protection findings are consistent with the *in vitro* neutralization results in suggesting similar *in vivo* and *in vitro* neutralization mechanisms, probably independent of Fc-mediated functions and bivalency but dependent on the affinity of this particular antibody for antigen.

DISCUSSION

Protection from coronavirus infection can be mediated by antibody. Indeed, neutralization and protection epitopes were previously described on all four coronavirus structural proteins. However, the mechanism(s) by which antibodies efficiently neutralize viral infection both *in vitro* and *in vivo* are not well understood.

There is no unifying consensus as to whether or not antibody fragments will be effective in viral neutralization. The ability of an antibody fragment to neutralize viral infection is dependent on the mechanism by which the whole immunoglobulin molecule acts. If a virus is efficiently neutralized by ADCC or complement-mediated mechanisms, antibody fragments should not be as active as whole antibody molecules in neutralization experiments. Thus, the characterization of the biological properties of antibody fragments should provide useful information about the possible mechanism(s) of neutralization of the whole antibody molecule. Indeed, F(ab')₂ or Fab fragments have been shown to neutralize a number of different viruses (Dimmock, 1993). However, the role of the Fc region of antibody and of antibody bivalency for coronavirus neutralization has never been clearly addressed.

In this study, we used the previously characterized *in vitro* strongly neutralizing, cell-to-cell fusion inhibiting and *in vivo* protective mAb 7-10A, which recognizes a denaturation-sensitive epitope on the spike (S) glycoprotein of MHV-A59 (Daniel and Talbot, 1990) and can induce protective anti-idiotypic antibodies (Lamarre *et al.*, 1991). Purified mAb 7-10A was used to produce F(ab')₂ and Fab fragments (Fig. 1) and these were tested for their ability to neutralize MHV-A59 *in vitro* (Table II) and protect mice from lethal encephalitis (Fig. 6 and 7).

The whole antibody molecule was very effective in neutralizing MHV-A59: a concentration of 5.7 ng/ml was sufficient to neutralize 50 % of viral infectivity (Table II) and 100 % neutralization was achieved with only 60 ng/ml (data not shown). F(ab')₂ fragments showed an approximately 2-fold reduction in neutralization titer or about 3-fold reduction if molar concentrations were compared. In contrast with this moderate reduction of neutralization, Fab fragments exhibited neutralization titers that were dramatically reduced: about 65-fold less than the whole molecule and about 210-fold less on a molar basis. These differences in neutralization titers cannot be explained by a loss of binding capacities of the fragments following enzymatic treatment because all three antibody preparations reacted similarly against viral antigen or anti-idiotypic antibodies in an ELISA when detected using peroxidase-labeled goat anti-mouse Fab-specific antibodies (Fig. 2). On the other hand, the importance of antibody bivalency on the efficiency of *in vitro* neutralization of viral infectivity was suggested by the observation that the addition of goat anti-mouse-Fab fragment antibodies increased the neutralization titer of the Fab fragments to levels almost comparable to those obtained by F(ab')₂ fragments (Table II), possibly by cross-linking two Fab molecules together and thereby increasing the avidity of the fragments for antigen. Similar results have been reported for the neutralization of Venezuelan equine encephalomyelitis virus (Mathews *et al.*, 1985) and seal influenza virus (Yoden *et al.*, 1985).

These *in vitro* neutralization results are in agreement with the passive protection experiments (Fig. 6) where complete protection was observed with a single 150- μ g injection of the whole antibody molecule and near complete protection was achieved with one 150- μ g injection of F(ab')₂ fragments before and a second identical injection after viral challenge. In contrast, three 150- μ g

administrations of Fab fragments did not significantly protect mice against viral infection, although there was a slight delay in the observed time of death after virus challenge. This injection protocol was selected to insure sufficient serum antibody concentrations during and after viral challenge, knowing that the half-life of the two fragments was about 6 h, as opposed to 10 days for whole antibody (Fig. 5 and Table III), a value that is similar to that obtained for other anti-viral mAb (Talbot and Buchmeier, 1987). To ascertain whether the ability of the Fab fragment to passively protect mice against MHV-A59 was completely abolished, a second experiment was performed where five daily doses of 300 μg of Fab fragments were administered (Fig. 6). In this experiment, all animals survived the viral challenge, demonstrating that Fab fragments are indeed capable of protecting against viral infection but that larger quantities are needed. Importantly, the low levels of contaminating F(ab')_2 fragments in the Fab preparation were conclusively demonstrated to be unable to explain the observed passive protection with high doses of Fab fragments. The quantities of whole antibodies or F(ab')_2 fragments needed to protect about 50% of the animals were determined for both preparations and were found to be approximately 50 μg for the whole antibody molecule and between 50 and 150 μg for F(ab')_2 fragments. In contrast, 500 μg of purified Fab fragments were needed to observe the same protection levels (Fig. 7). These findings again demonstrate a moderate reduction in the activity of the F(ab')_2 fragments compared to the whole immunoglobulin and a pronounced decrease in the Fab fragment protective capacity. Thus a mechanism such as aggregation by cross-linking virions is probably not responsible for the neutralization of MHV-A59 by this mAb. Moreover, the difference between the protective properties of the different fragments cannot be attributed to different turnover rates *in vivo* since both fragments have a relatively similar half-life of about 6 h (Fig. 5 and Table III). Finally, virus titers in the brains and livers of

mice injected with 500 μg of the different antibody preparations were compared to levels found in untreated control animals (Table IV). Again, both the whole immunoglobulin and F(ab')_2 fragments showed similar *in vivo* protective activities, with no virus detected in brain and liver of animals that received whole antibody and low virus levels detected in the brain of only one animal that had received F(ab')_2 fragments. In contrast, mice injected with Fab fragments showed a moderate but statistically significant 6-fold reduction in the infectious virus titers in the brain compared to control animals (Table IV). Interestingly, virus titers in the liver were dramatically reduced with very low levels of virus detected in only two out of seven animals. This suggests that the passive transfer of antibody prevented virus spread within the infected animal, which may have contributed to the observed protection.

It is possible that the decrease in the neutralizing and protective properties of the Fab fragment compared to the bivalent molecules could be attributed to a decreased avidity of the fragment for antigen. Indeed, although we observed affinity constants of this mAb for antigen that are consistent with previously published values for antigen-antibody interactions, we did observe 14 and 7-fold reductions in the avidity of the Fab fragments for specific anti-idiotypic antibodies compared to the whole antibody molecule and the F(ab')_2 fragments, respectively (Fig. 4 and Table I). It is likely that these reductions in avidity would also be observed for viral antigen since the inhibition of attachment assay demonstrated that the Fab fragments are less effective in inhibiting attachment of the whole antibody molecule to viral antigen than the F(ab')_2 fragments, confirming their weaker avidity (Fig. 3). However, we were unable to obtain biologically active immobilized virus for evaluation of affinity constants of mAb 7-10A and its F(ab')_2 and Fab fragments for virus rather than surrogate viral antigen. This is probably due to a physical limitation of the

BIAcore™ instrument, in which the detectable surface plasmon resonance signal decreases with the distance from the dextran matrix: the antibody-virus complexes were possibly too large to allow observation of any subsequent antibody binding. Nevertheless, a reduced avidity of the Fab fragment for virus compared to whole antibody would probably not account for all the decreased activity of these monovalent fragments, since a 66-fold reduction in the neutralizing titer of the Fab fragment versus the whole immunoglobulin molecule was observed (Table II).

Although the exact mechanism of MHV-A59 neutralization by mAb 7-10A is still unknown, preliminary results suggest that viral aggregation or inhibition of viral attachment to cell surface are not involved (data not shown). Additional experimentation will be required to determine the precise mode of action of this antibody. Nevertheless, the present study indicates that its Fc portion does not seem important for *in vitro* and *in vivo* neutralization of MHV-A59 since the F(ab')₂ fragment and the whole antibody molecule have essentially similar affinities, neutralization titers and protective capacities. Bivalency seems to play a role in the neutralization process of MHV-A59 but is not absolutely required since Fab fragments alone can neutralize viral infectivity *in vitro* and protect mice *in vivo*, although to a lesser extent when compared to bivalent molecules since larger amounts are necessary despite a similar *in vivo* half-lives when compared to F(ab')₂ fragments (Fig. 6 and 7; Table III). Bivalency has been shown to be important for the neutralization of seal influenza virus by antibodies of group III and IV by a proposed mechanism by which these antibodies interfere with a low pH-induced conformational change during virus penetration into susceptible cells, resulting in inhibition of the fusion step of viral replication (Yoden *et al.*, 1985). In contrast with our results, the Fab fragments described in that study did not neutralize viral infectivity at all. Thus,

bivalency does not seem to be essential for neutralization or protection in our experimental system but enhances these properties, possibly through steric hindrance or induction of a conformational change as a result of an increased avidity.

Examples of *in vitro* viral neutralization by Fab fragments are relatively few and, to our knowledge, this is the first report of passive *in vivo* protection from any viral infection by Fab fragments. There is considerable interest in having similar reagents for prophylactic use against other viral diseases (Barbas *et al.*, 1992b, Cheung *et al.*, 1992). Indeed, the potential for the use of mAb in the treatment of various diseases is significant but their utilization has been limited because of their immunogenicity in man (Mountain and Adair, 1992). Fab fragments are attractive substitutes for whole immunoglobulin in immunotherapy because of their lower immunogenicity and rapid tissue penetration (Pourcho and Goebel, 1987, Divgi and Larson, 1989, Mountain and Adair, 1992). Recent advances in recombinant DNA technology have permitted the production of biologically active recombinant antibody fragments in bacteria that are even less immunogenic than Fab fragments and could potentially be used as therapeutic or diagnostic reagents for a wide array of disorders (Lefranc and Lefranc, 1990, Ward, 1992, Chanock *et al.*, 1993). Before these recombinant antibody fragments are to be used against viral diseases in man, their effectiveness in neutralizing virus infection *in vitro* and passively protect *in vivo* must be studied in animal models. Work in our laboratory is currently underway to test the neutralizing and protective properties of such recombinant antibody fragments.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Francine Lambert for expert technical assistance, to Suzanne Grothé and Maureen O'Connor-McCourt for their invaluable help with surface plasmon resonance experiments performed with a BIAcore™ apparatus, to Pierre Tremblay for help with the densitometric analysis and to Jean-François Laliberté and Peter Tijssen for critically reviewing the manuscript.

TABLE I

Kinetic constants of whole mAb 7-10A , F(ab')₂ and Fab fragments determined by surface plasmon resonance using immobilized anti-idiotypic antibodies ^a

mAb 7-10A	<i>k_a</i> measurement		<i>k_d</i> measurement		<i>K_A</i> ^c (10 ⁹ M ⁻¹)
	conc. ^b	<i>k_a</i> (10 ⁵ M ⁻¹ s ⁻¹)	conc. ^b	<i>k_d</i> (10 ⁻⁵ s ⁻¹)	
Whole	4.4 - 75 nM	3.67 ± 0.41	750 nM	5.22 ± 2.25	7.0
F(ab') ₂	4.4 - 75 nM	1.78 ± 0.19	750 nM	5.53 ± 0.48	3.2
Fab	4.4 - 75 nM	1.31 ± 0.34	750 nM	26.2 ± 9.28	0.50

^a Values obtained from three separate experiments

^b Concentrations used to determine kinetic constants

^c Calculated from the ratio *k_a*/*k_d*

TABLE II

Viral neutralization titers of whole immunoglobulin, F(ab')₂ and Fab fragments

mAb 7-10A	Neutralization Titer ^a (ng/ml)
Whole	5.7 ^b
F(ab') ₂	12.3 ^c
Fab	375 ^d
Fab + anti-Fab	20

^a Concentration of antibody that neutralized 50% of input virus

^b Mean of three separate experiments where titers ranged from 3 to 7 ng/ml

^c Mean of three separate experiments where titers ranged from 7 to 15 ng/ml

^d Mean of three separate experiments where titers ranged from 200 to 625 ng/ml

TABLE III

Biological half-lives of whole immunoglobulin, F(ab')₂ and Fab fragments

mAb 7-10A	Half-life
Whole	10 ± 1 days
F(ab') ₂	5.8 ± 3.2 h
Fab	5.5 ± 3.0 h

TABLE IV

Virus titers in brain and liver of mice immunized with whole immunoglobulin, F(ab')₂ and Fab fragments two days post-infection

Mouse No.	Virus titers (PFU/g of tissue)							
	Control		Fab		F(ab') ₂		Whole	
	Brain	Liver	Brain	Liver	Brain	Liver	Brain	Liver
1	2.1 x 10 ⁵	2.7 x 10 ⁵	1.3 x 10 ⁵	<670	2.5 x 10 ⁴	<670	<670	<670
2	6.7 x 10 ⁵	9.3 x 10 ⁵	1.4 x 10 ⁵	<670	<670	<670	<670	<670
3	1.8 x 10 ⁶	4.7 x 10 ⁵	6700	670				
4	8.7 x 10 ⁵	9.3 x 10 ⁵	2.9 x 10 ⁵	<670				
5	1.2 x 10 ⁶	4.0 x 10 ⁵	5300	<670				
6	1.0 x 10 ⁵	4.5 x 10 ⁵	2.0 x 10 ⁵	<670				
7	1.7 x 10 ⁶	5.3 x 10 ⁵	1.9 x 10 ⁵	1300				
8	2.1 x 10 ⁵	5.5 x 10 ⁵						
x†	8.5 x 10 ⁵	5.7 x 10 ⁵	1.4 x 10 ⁵ §	<760 ¶	n. a.	<670	<670	<670
SD‡	6.7 x 10 ⁵	2.4 x 10 ⁵	1.0 x 10 ⁵	n. a. #	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.

† Average.

‡ Standard deviation.

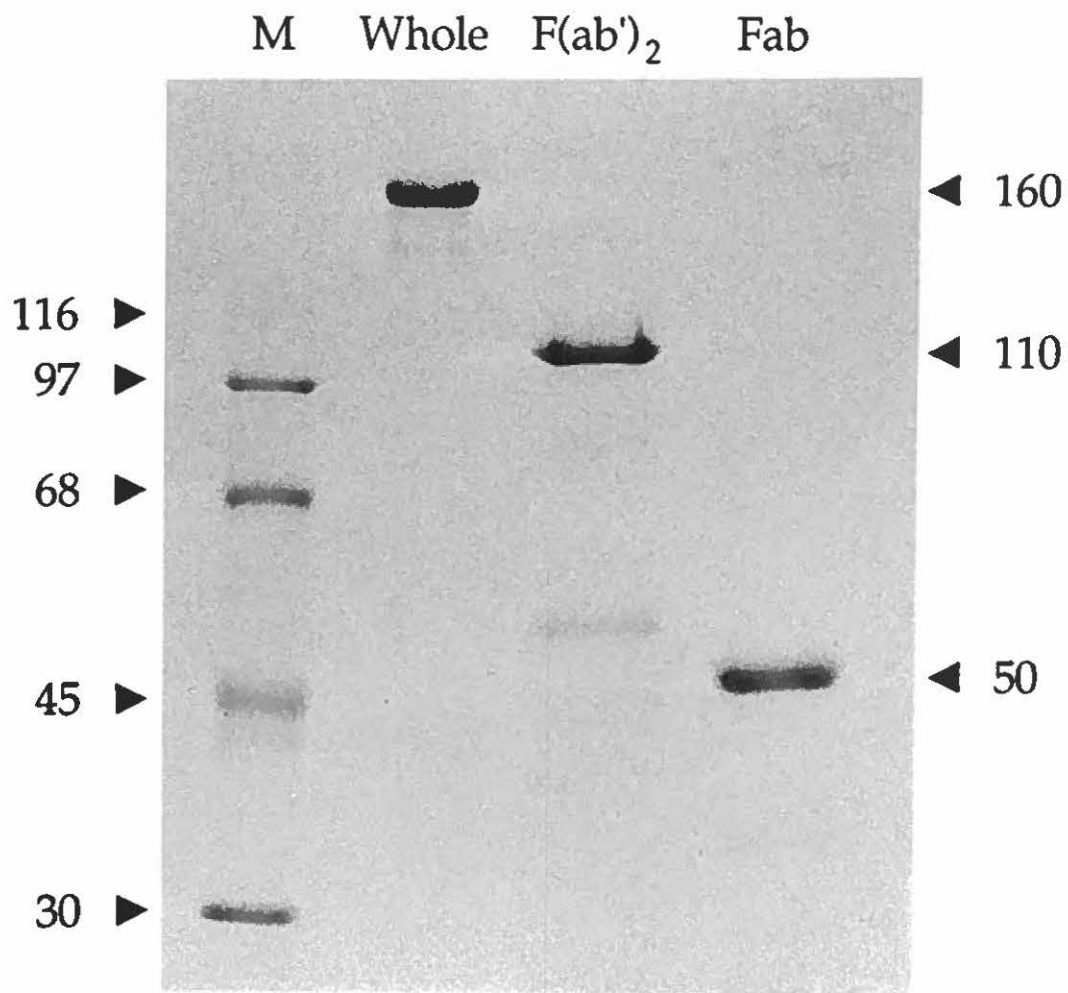
§ Statistically different from control (p = 0.0125).

¶ Statistically different from control (p < 0.0001).

Not applicable.

FIGURE 1: SDS-PAGE analysis of purified whole 7-10A, F(ab')₂ and Fab fragments.

Samples (3 µg) of purified antibody preparations were loaded onto a 10% polyacrylamide SDS-PAGE under non-reducing conditions and stained with Coomassie blue. Molecular weight standards are shown in lane M, and their masses are indicated in kilodaltons.



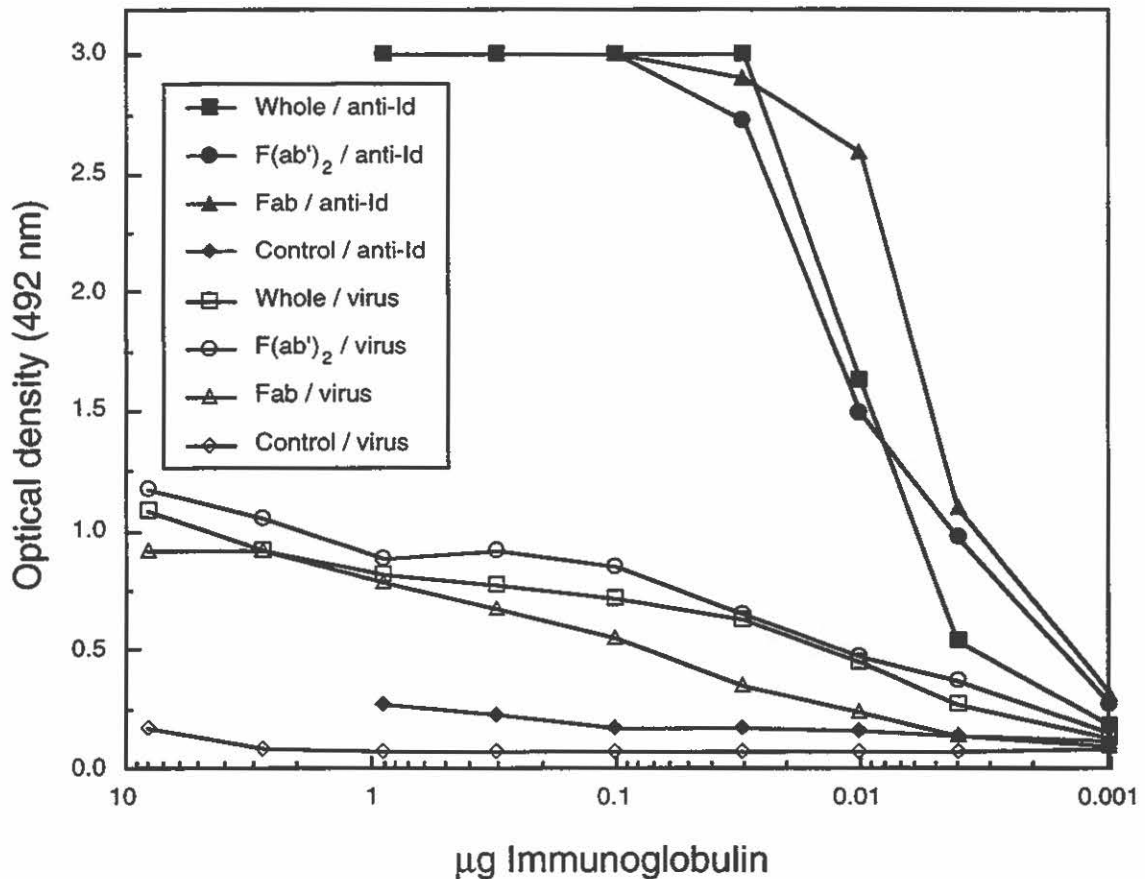


FIGURE 2: Comparison of the reactivity of the whole mAb 7-10A, F(ab')₂ and Fab fragments for MHV-A59 antigen or specific anti-idiotypic antibodies.

Microtiter plates were coated with either 500 ng/well of viral antigen preparations (open symbols) or 15 ng/well of purified anti-idiotypic antibodies (filled symbols). The binding of varying amounts of purified mAb 7-10A (■,□), F(ab')₂ (●,○) and Fab (▲,△) fragments, as well as an isotype control antibody (◆,◇), was determined using horseradish peroxidase-labeled goat anti-mouse IgG (Fab-specific) antibodies.

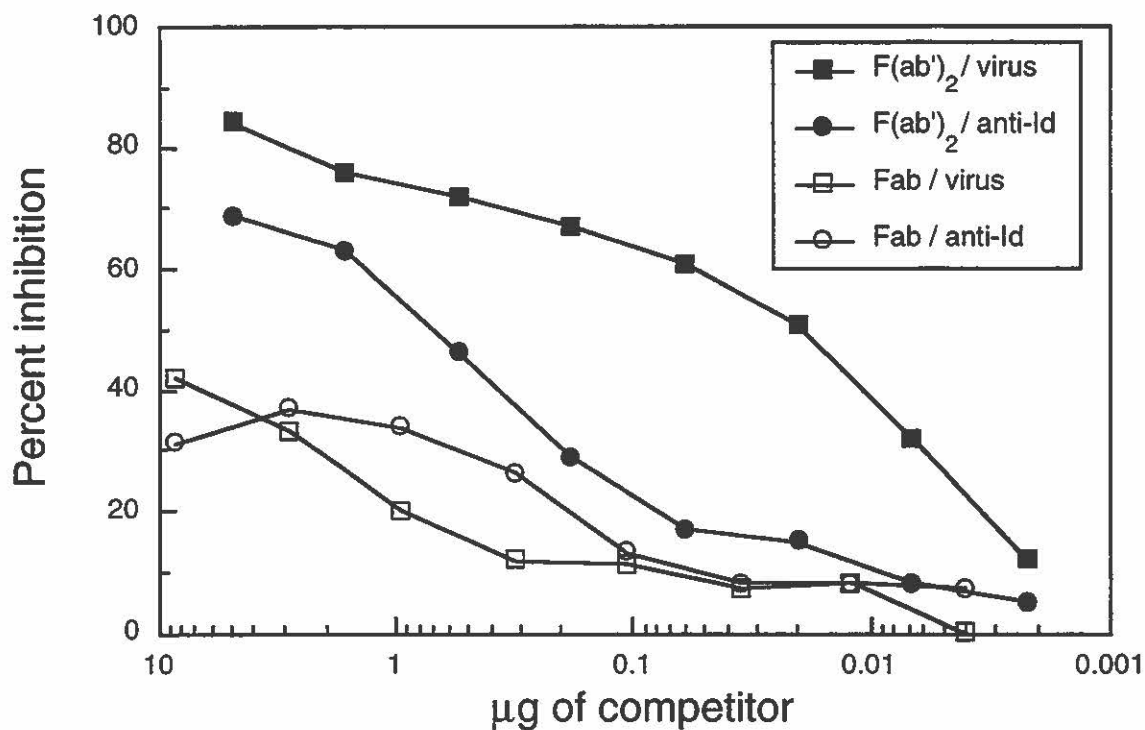


FIGURE 3: Inhibition of whole mAb 7-10A binding to MHV-A59 antigen or anti-idiotypic antibodies by F(ab')₂ or Fab fragments.

Microtiter plates were coated with either 500 ng/well of viral antigen preparations (■,□) or 15 ng/well of purified anti-idiotypic antibodies (●,○). Serial three-fold dilutions of F(ab')₂ (filled symbols) or Fab (open symbols) fragments were added to the plates and the binding of a fixed concentration of whole mAb 7-10A was detected using Fc-specific horseradish peroxidase-labeled anti-mouse antibodies.

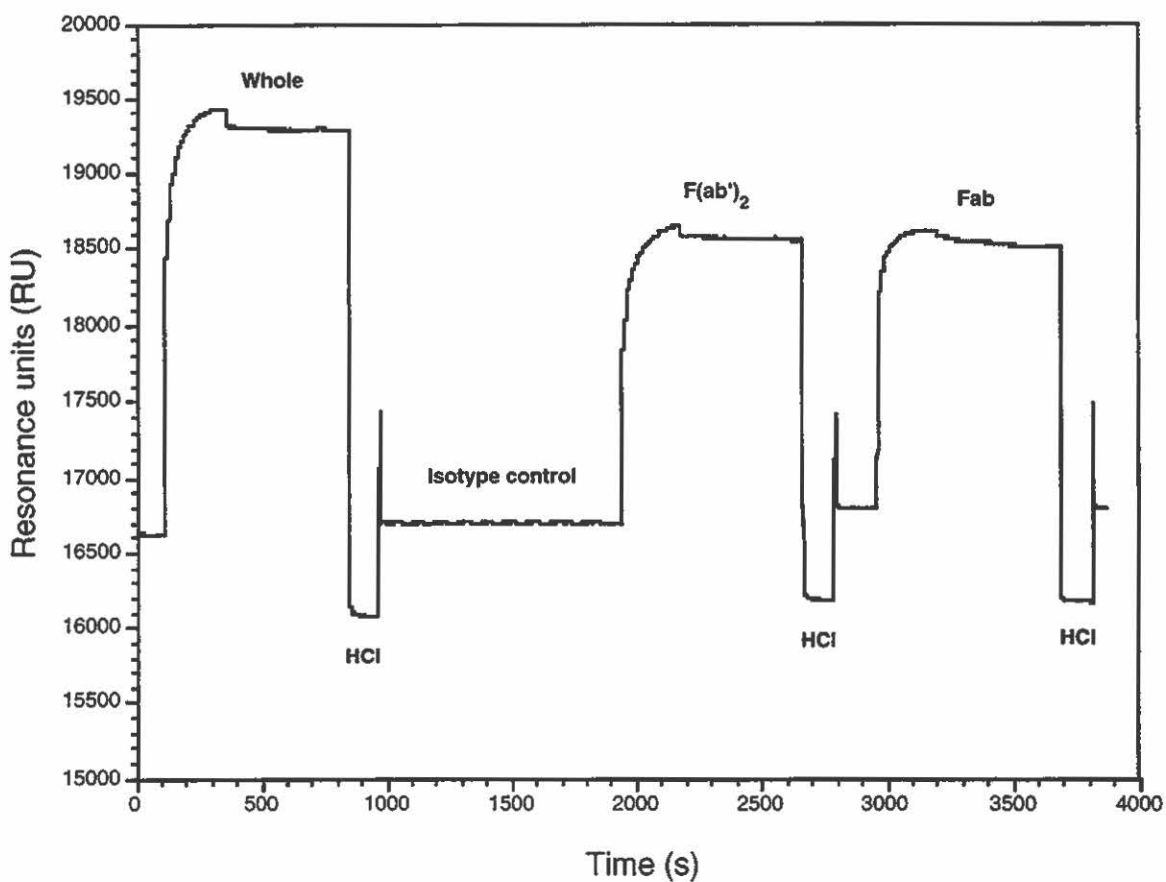


FIGURE 4: Sensorgram showing the interactions of the whole immunoglobulin molecule, F(ab')₂ and Fab fragments with immobilized anti-idiotypic antibodies.

The different antibody preparations at a concentration of 750 nM were injected at a continuous flow rate of 10 μ l/min over the anti-idiotypic antibodies-coated matrix. The surface was regenerated by injecting 20 μ l of 10 mM HCl.

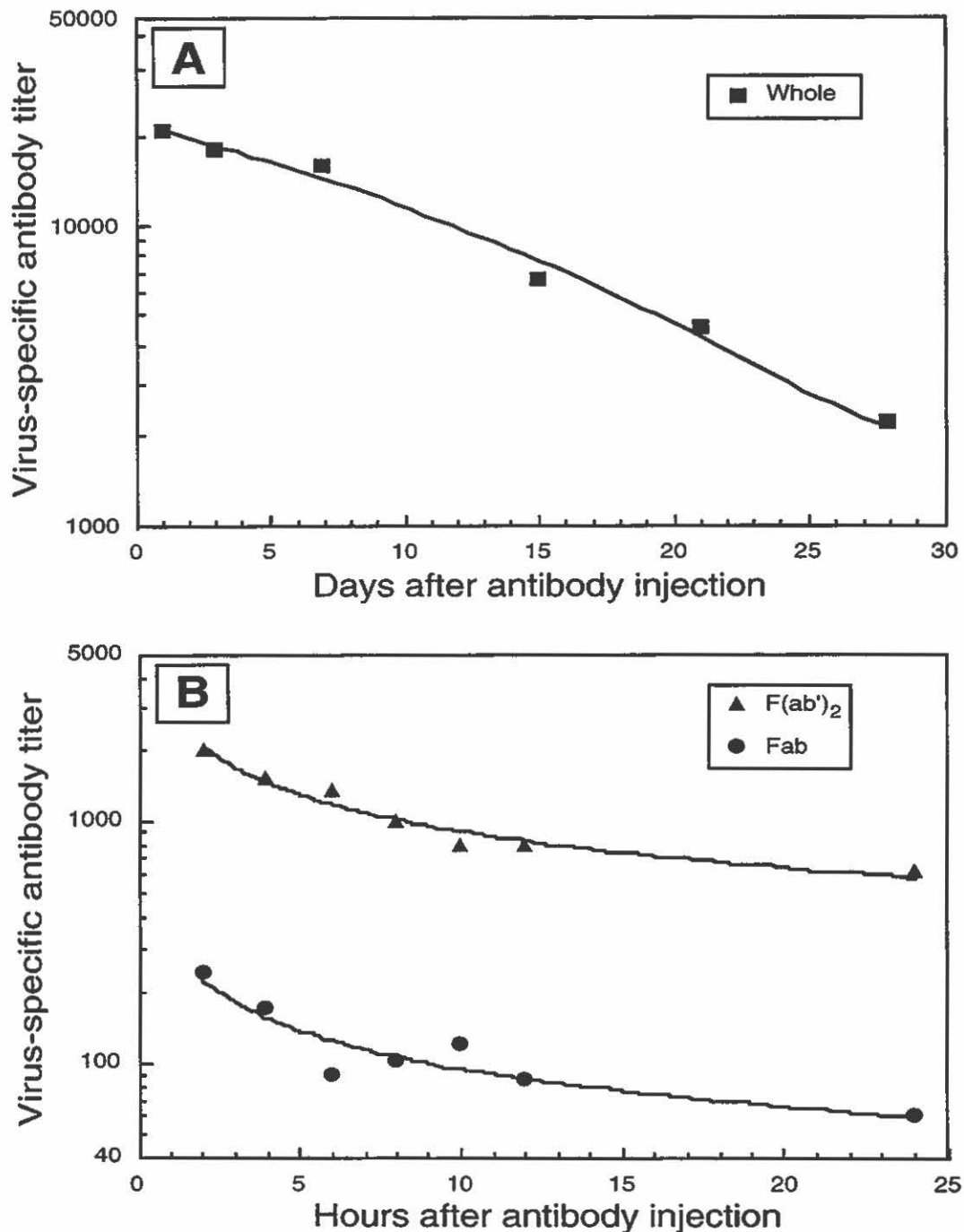


FIGURE 5: Representative turnover curves of the whole immunoglobulin (A) or F(ab')₂ and Fab fragments (B).

300 μ g of each antibody preparation was injected intraperitoneally into BALB/c mice and the plasma antibody titers were determined at different time points after injection as described in the *Materials and Methods*. Half-lives of each preparation were calculated for each of five mice and the mean and standard deviation were determined and are shown in Table III.

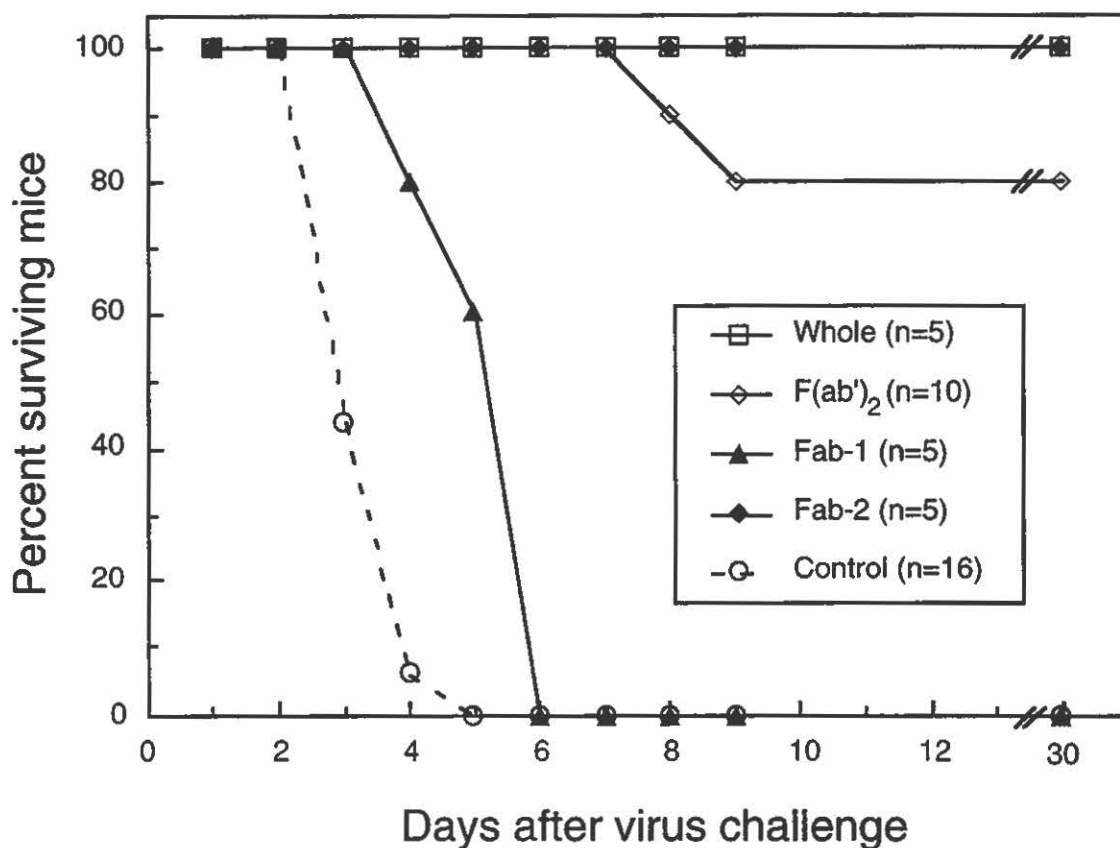


FIGURE 6: Protection of mice from MHV-A59 infection by passive transfer of whole immunoglobulin, F(ab')₂ and Fab fragments.

Groups of BALB/c mice received either one 150- μ g injection of whole antibody before viral challenge (\square), 150 μ g of F(ab')₂ before and after challenge (\diamond), 150 μ g of Fab fragments before and 2 identical doses after viral challenge (\blacktriangle), or no antibody injection (O). Another injection protocol for Fab fragments consisted in 150 μ g before and five daily 300- μ g injections after viral challenge (\blacklozenge). All animals were challenged with 10 LD₅₀ of MHV-A59 as described in *Materials and Methods*.

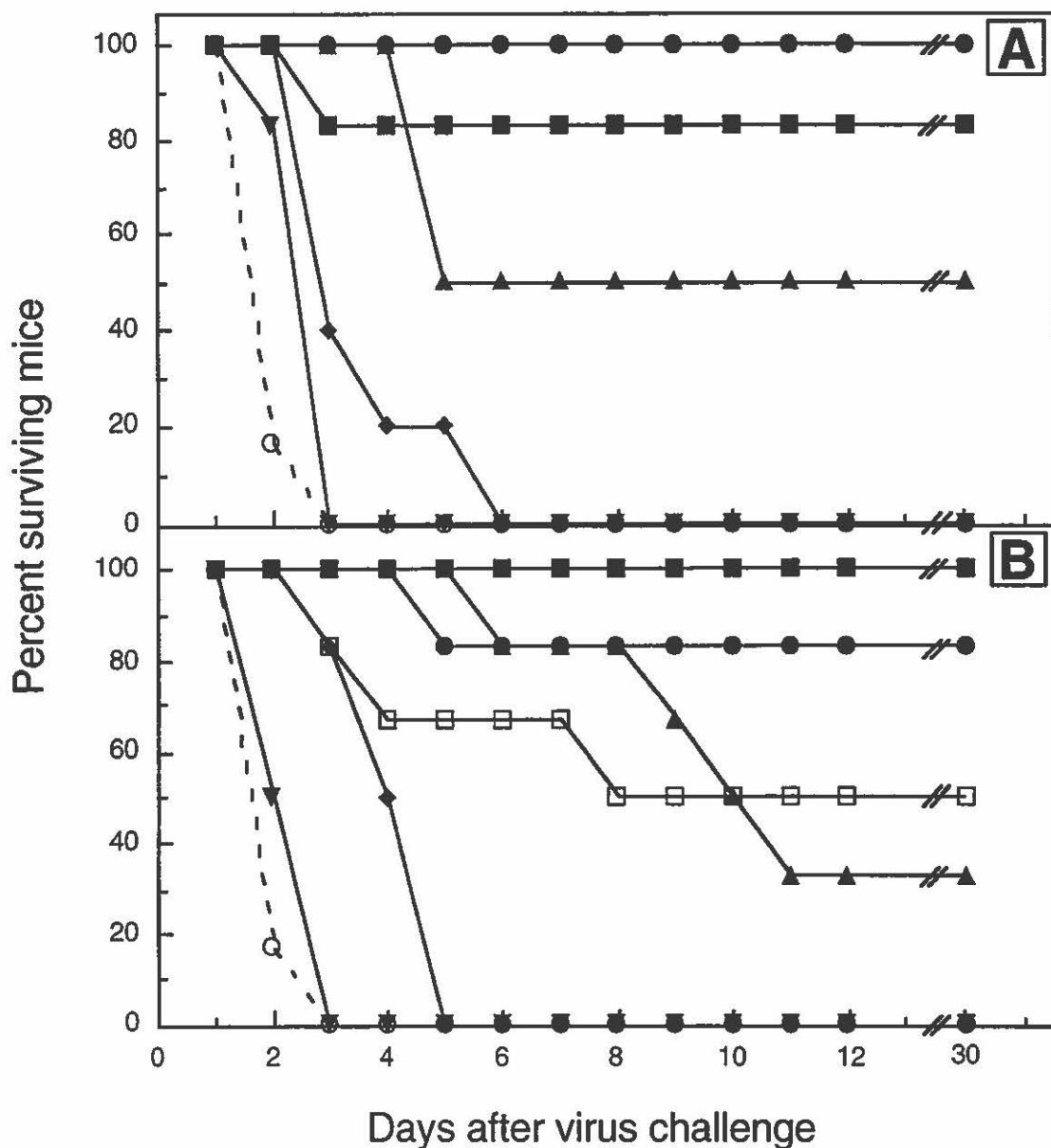


FIGURE 7: Protection of mice from MHV-A59 infection by different quantities of whole immunoglobulin, F(ab')₂ and Fab fragments.

Groups of 4 to 6 BALB/c mice were injected with either 500 µg (■), 150 µg (●), 50 µg (▲), 10 µg (◆), 1 µg (▼) of whole antibody (A) or F(ab')₂ fragments (B), 500 µg of Fab fragments (□) or no antibody (O). Animals were challenged intracerebrally with 10 LD₅₀ of MHV-A59 2 h after antibody injections.

Introduction à l'article II

Depuis le développement de la technique de production d'anticorps monoclonaux par Köhler et Milstein en 1975, de nombreux travaux ont porté sur leur utilisation pour le traitement de diverses maladies humaines. Cependant, l'administration d'anticorps de souris chez l'humain entraîne la production d'une réponse immunitaire contre l'immunoglobuline étrangère et peut avoir de graves conséquences. De plus, le faible taux de pénétration tissulaire et la demi-vie élevée des anticorps peuvent être des inconvénients majeurs pour le traitement de plusieurs maladies, dont certains types de cancers. Le développement de nouvelles techniques de biologie moléculaire a fait naître la possibilité d'exprimer chez la bactérie, des fragments d'anticorps ne comprenant que les régions variables des immunoglobulines. Ces fragments d'anticorps recombinants sont donc moins immunogènes ont un taux de pénétration tissulaire accru et une demi-vie réduite. Dans le but de vérifier si ces fragments d'anticorps recombinants pourraient éventuellement être utilisés pour le traitement d'infections virales, un anticorps à chaîne unique (scFv) a été construit à partir de la séquence codante des régions variables des chaînes lourdes et légères de l'AcMo 7-10A, et sa capacité protectrice a été testée chez la souris. Les résultats de cette partie de ce projet de doctorat ont été soumis pour publication dans "The Journal of Immunology" et représentent la dernière section de ce chapitre.

Les régions variables des chaînes lourdes et légères de l'AcMo 7-10A ont été amplifiées et assemblées par PCR pour être ensuite clonées dans le vecteur d'expression procaryotique pET16b. Suite à l'expression de la

protéine recombinante de 32 kDa chez *Escherichia coli*, le scFv a été purifié par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel-agarose. Le scFv purifié a conservé les propriétés de liaison à l'antigène, d'inhibition de l'attachement de l'anticorps complet aux protéines virales et de neutralisation *in vitro* de l'anticorps parental, avec même une plus grande efficacité que des fragments Fab obtenus par digestion enzymatique. Malgré tout, le scFv n'a pu protéger significativement les souris traitées contre l'infection virale, probablement à la suite d'une dégradation tissulaire trop rapide. La seconde partie de ce chapitre s'inscrit donc en continuité avec les travaux présentés dans l'article I, et confirme les conclusions qui y sont tirées, à l'effet que le fragment Fc et la bivalence de l'AcMo 7-10A ne sont pas essentiels pour la neutralisation du MHV-A59 et indique que la demi-vie tissulaire de l'anticorps ou de ses fragments semble jouer un rôle capital pour la protection.

ARTICLE II

**A RECOMBINANT SINGLE CHAIN ANTIBODY NEUTRALIZES
CORONAVIRUS BUT FAILS TO PROTECT MICE: PERSPECTIVES
FOR ANTIVIRAL IMMUNOTHERAPY**

Alain LAMARRE, Fanny CHAGNON and Pierre J. TALBOT

Virology Research Center, Institut Armand-Frappier, Université du Québec,
Laval, Québec, CANADA, H7N 4Z3

Article soumis à: The Journal of Immunology le 13/11/96

Abstract

The variable region genes of a murine anti-coronavirus monoclonal antibody were joined by assembly PCR and expressed in *E. coli* in a single chain Fv (scFv) configuration. After induction of expression, the expected 32 kDa protein was identified by Western immunoblotting with specific rabbit anti-idiotypic antibodies. ScFv fragments were purified from soluble cytoplasmic preparations by affinity chromatography on a nickel agarose column, which was possible with an N-terminal but not with a C-terminal histidine tag. Purified scFv fragments retained the antigen-binding properties of the parental antibody, could inhibit its binding to viral antigens, and neutralized viral infectivity with even higher efficiency than Fab fragments. To evaluate the applicability of using these smaller and less immunogenic molecules in the treatment of viral diseases, mice were treated with purified recombinant scFv fragments and challenged with a lethal viral dose. A small delay in mortality was observed for the scFv-treated animals. Even though the scFv were more potent in neutralizing viral infectivity *in vitro*, the same quantity of fragments that protected mice in the form of Fab did not protect animals injected as scFv fragments, probably because of a much faster *in vivo* clearance. Since a scFv derived from a highly neutralizing and protective mAb does not significantly protect mice from viral infection, the use of such reagents for viral immunotherapy may prove difficult.

Introduction

Coronaviruses are members of the *Coronaviridae* virus family that includes important pathogens of the respiratory, gastrointestinal and neurological systems of humans and various animals (Wege *et al.*, 1982, Spaan *et al.*, 1990). Neurotropic strains of the murine coronavirus mouse hepatitis virus (MHV) can induce neurological disorders in rodents that are similar to multiple sclerosis (Siddell *et al.*, 1983b), providing an excellent animal model for the study of human nervous system diseases and immune protection mechanisms. Passive protection from MHV infection has been achieved by administration of mAb specific for all four major structural proteins of the virus (Buchmeier *et al.*, 1984, Lecomte *et al.*, 1987, Fleming *et al.*, 1989, Daniel and Talbot, 1990, Yokomori *et al.*, 1992). We have recently shown that F(ab')₂ and Fab fragments of mAb 7-10A specific for the viral surface (S) glycoprotein can also neutralize virus *in vitro* and protect mice *in vivo* (Lamarre and Talbot, 1995).

The utilization of mAb in the treatment of important viral diseases is an attractive approach because of their wide specificities and potent biological effects. However, their clinical use has been hampered by their immunogenicity in humans (Mountain and Adair, 1992). The development of molecular biology techniques that make it possible to express antibody fragments in bacteria and eukaryotic cells offers the possibility of developing immunological reagents with very high specificity and sensitivity, with even less immunogenicity than antibody fragments obtained by enzymatic digestion (Lefranc and Lefranc, 1990, Ward, 1992, Chanock *et al.*, 1993). To explore the possibility of using antibody fragments expressed in bacteria for the treatment

of viral diseases, a single chain antibody (scFv) was constructed from the sequences of MHV-specific mAb 7-10A and its *in vitro* neutralization and *in vivo* protection properties were evaluated and compared to fragments derived from the parental molecule.

Results

Construction, cloning and sequencing of scFv 7-10A. The variable regions of the heavy and light chains of mAb 7-10A were amplified by PCR with V_H and V_K specific primers using cDNA synthesized from RNA extracted from 7-10A hybridoma cells (Fig. 8). Assembly of the variable regions of heavy and light chains of mAb 7-10A was done by splicing with overlap extension (Horton *et al.*, 1977). A linker molecule $(Gly_4 Ser)_3$ was used to bridge the two chains together in a scFv configuration (Huston *et al.*, 1988). The assembly product of the correct size (750 bp) was gel-purified and cloned into the bacterial expression vector pET-22b. The nucleotide and deduced amino acid sequences of scFv 7-10A were determined (Fig. 9). The V_H region was 92% homologous (percentage of nucleotide identity) to the rearranged V_H gene of the mouse VGAM 3-2 VDJ region (Winter *et al.*, 1985) and belongs to subgroup I(A) according to the classification of Kabat *et al.* 1991 (Kabat *et al.*, 1991). The V_L region of the K chain was 97% homologous to the Abelson virus transformed B-cell line T24B (Lawler *et al.*, 1989) and belongs to subgroup V.

Expression of the scFv 7-10A. Expression of the recombinant scFv was induced with 1mM IPTG for 18 h at 30°C and total cellular proteins were

analyzed by SDS-PAGE (Fig. 10A). Coomassie blue staining of induced cells revealed a major protein band of 32 kDa corresponding to the predicted size of the scFv and that was undetectable in uninduced cells. Fractionation of soluble and insoluble material revealed that the majority of the recombinant protein was contained in insoluble inclusion bodies (data not shown). The identity of the scFv was verified by Western immunoblotting with polyclonal anti-idiotypic antibodies produced against the parental 7-10A antibody (Lamarre *et al.*, 1991). These antibodies reacted with a 32 kDa protein present only in induced cells (Fig. 10B).

Purification of the scFv 7-10A. Attempts to affinity purify the recombinant scFv expressed in the pET-22b vector by Ni-NTA agarose column chromatography under either non-denaturing or denaturing conditions failed. It is possible that the C-terminal histidine tag was so embedded in the protein core even in denaturing conditions that it was inaccessible to the Ni²⁺ cations. We subcloned the scFv into the pET-16b vector which expresses the histidine tag at the N-terminal end of the protein. Although most of the recombinant scFv was also produced in insoluble inclusion bodies, enough soluble protein was present in cytoplasmic extracts to be purified on the Ni-NTA agarose column. Adsorbed proteins were eluted with 60 mM imidazole and the fractions were analyzed by SDS-PAGE and Western immunoblotting. Coomassie blue staining of the eluted fractions revealed a unique band of 32 kDa (Fig. 10C), which was also revealed in Western immunoblotting with the anti-7-10A anti-idiotypic antibodies (Fig. 10D).

Binding of the scFv 7-10A to viral antigen. To verify if the purified scFv fragments had retained the antigenic specificity of the bivalent parental immunoglobulin, their binding to viral antigen preparations was tested by

ELISA using the specific anti-7-10A anti-idiotypic antibodies for detection (Fig. 11). The scFv could indeed bind in a concentration dependent manner to viral proteins present in infected cell lysates whereas no specific interaction with preparations from uninfected cells was observed. In order to determine the relative affinity of the scFv fragment for antigen, its ability to inhibit the binding of the bivalent natural antibody was examined (Fig. 12). Fifty percent inhibition of 7-10A binding was achieved with 0.6 μ g of purified scFv fragments. In contrast, we have previously shown that the same amount of purified Fab fragments inhibited less than 20% of the intact antibody binding (Lamarre and Talbot, 1995).

Neutralization of virus infectivity. The neutralization capacity of the recombinant scFv fragment was evaluated by incubating fifty plaque-forming units (PFU) of virus with dilutions of purified scFv fragments and determining the residual viral infectivity on murine fibroblast cells. Surprisingly, the concentration of scFv fragments needed to neutralize 50% of the input virus was only 38 ng/ml, which is about 10-fold less than the amount of Fab fragments required for such a level of *in vitro* neutralization binding (Lamarre and Talbot, 1995).

Protection. BALB/c mice were treated with 500 μ g of purified scFv fragments and were challenged 30 min later with 10 LD₅₀ of infectious MHV. No mice survived the viral infection but a small delay in the mortality of the animals treated with the scFv was observed (Fig. 13).

Discussion

Murine antibodies that neutralize virus infectivity and have the capacity of protecting against viral infection are attractive candidates as potential immunotherapeutic agents. However, their large scale use has been hampered by allergic immune reactions in humans (Avner *et al.*, 1991) and the difficulty and costs of producing large quantities of antibodies. Recombinant antibody fragments present several advantages over conventional monoclonal antibodies: they are less immunogenic in humans and can be produced in large amounts and at lower costs. These advantages have encouraged the development of a number of genetically engineered virus-specific antibody fragments with neutralizing properties (Barbas III *et al.*, 1992a, Barbas III *et al.*, 1992b, Cheung *et al.*, 1992, Jiang *et al.*, 1994). As a model for the utilization of recombinant antibodies in the treatment of viral diseases, we tested whether the same antibody engineering technology could be employed for the production of a single chain antibody fragment (scFv) that could protect from virus infection in a convenient animal model.

We report the construction and expression of a scFv rescued from a hybridoma line that secretes anti-coronavirus IgG2a mAb which can neutralize virus infection *in vitro* and protect mice against a normally lethal dose of virus. We show that the location of the histidine tag, either at the C- or N-terminal end of the recombinant protein, may have a major importance for purification by affinity chromatography on a Ni-agarose column. Indeed, we have observed that the scFv fragment produced in this study could only be purified when the histidine tag was expressed at the N-terminal end. In contrast, Lake *et al.*, (Lake *et al.*, 1994) have reported the purification on a nickel-agarose

column of an anti-insulin scFv with a C-terminal histidine tag. This demonstrates that the conformation of the particular scFv will determine if the expression of a C- or N-terminal histidine tag will be accessible to the Ni²⁺ cations and will allow purification by metal chromatography.

The scFv described in the present report showed biological properties similar to Fab fragments obtained by papain digestion. In fact, they exhibited much better inhibition of parental antibody binding to viral antigen than Fab fragments, which is consistent with a higher affinity. Indeed, 50% inhibition of binding of the parental antibody to viral antigen was achieved with only 0.6 µg of scFv whereas 10 µg of Fab fragments only inhibited 42% of binding (Lamarre and Talbot, 1995). This surprising finding was reinforced by the observation of a 10-fold increased neutralization activity of the scFv over Fab fragments. We cannot offer a definitive explanation for this phenomenon but we suggest that the enzymatic treatment of the bivalent antibody to obtain Fab fragments may have impaired its antigen-binding and neutralization properties. Even with an apparent higher affinity and neutralizing capacity than Fab fragments, the scFv failed to significantly protect treated animals, probably because of a shorter half-life. Indeed, the rapid *in vivo* blood clearance of scFv is well documented, with reported half-lives ranging from 2.4 to 32 min (Colcher *et al.*, 1990, Laroche *et al.*, 1991, Friedman *et al.*, 1993, Reiter *et al.*, 1994), as compared to 5.5 h for Fab fragments of mAb 7-10A (Lamarre and Talbot, 1995). Although large quantities of scFv did not achieve complete protection of mice, a short delay in mortality was observed, similar to what we previously reported for mice treated with sub-protective doses of Fab fragments (Lamarre and Talbot, 1995), indicating that the scFv did have a limited protective effect on viral infection. Nevertheless, the very fast blood

clearance of scFv fragments would probably reduce the prospect of their utilization for viral immunotherapy, although it would represent an advantage for other clinical uses such as tumor immuno-targeting for diagnosis or treatment of cancer.

Experimental protocol

Animals. Male or female, 6- to 7-week-old, MHV-seronegative BALB/c mice (Charles River, St-Constant, Québec, Canada) were used in the protection experiments.

Virus and cells. The neurotropic A59 strain of MHV (MHV-A59) was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD), plaque-purified twice, and passaged on DBT cells as described previously (Daniel and Talbot, 1987).

Construction and expression of scFv 7-10A. Total cellular RNA was isolated from 7-10A hybridoma cells as described previously (Mounir and Talbot, 1992). Ten micrograms of total RNA was reverse transcribed with Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Pharmacia Canada Inc., Baie-d'Urfé, Québec, Canada) using the CH1 primer MOCG12FOR (5'- C T C A A T T T T C T T G T C C A C C T T G G T G C -3') and the C_K primer CKFOR (5'- C T C A T T C C T G T T G A A G C T C T T G A C -3'). These primer sequences were obtained from Dr. Greg Winter, Medical Research Council, Cambridge, UK. Amplifications of variable regions were carried out by PCR of cDNA using *Taq* DNA polymerase (BIO/CAN Scientific, Mississauga, Ontario, Canada) for 30 cycles (94°C for 1 min., 60°C for 1 min.,

72°C for 2 min.). Primers VH1FOR-2 (5'- T G A G G A G A C G G T G A C C G T G G T C C C T T G G C C C C -3') (Ward *et al.*, 1989) and VH1BACK (5'- A G G T S M A R C T G C A G S A G T C W G G -3': S = C or G; M = A or C; R = A or G; W = A or T) (Orlandi *et al.*, 1989) were used to amplify V_H and primers VK4FOR (an equimolar mix of JK1: 5'- C C G T T T G A T T T C C A G C T T G G T G C C -3', JK2: 5'- C C G T T T T A T T T C C A G C T T G G T C C C -3', JK4: 5'- C C G T T T T A T T T C C A A C T T T G T C C C -3', and JK5: 5'- C C G T T T C A G C T C C A G C T T G G T C C C -3') and VK2BACK (5'- G A C A T T G A G C T C A C C C A G T C T C C A -3') (Clackson *et al.*, 1991) to amplify V_K. The linker DNA was similarly amplified from plasmid pSW2scD1.3 (McCafferty *et al.*, 1990) using primers MO-LINK-BACK and MO-LINK-FOR (complementary to VH1FOR-2 and VK2BACK respectively). Gel purified V_H and V_K amplicons (100 ng each) were mixed with 20 ng of the linker DNA fragment encoding the peptide (Gly₄ Ser)₃ in a 50 µl reaction mixture without primers and cycled 7 times (94°C for 1 min., 72°C for 2.5 min.) with Vent DNA polymerase (New England Biolabs, Ltd., Mississauga, Ontario, Canada) to randomly join the fragments, then amplified for 23 cycles (94°C for 1 min., 60°C for 2 min. and 72°C for 2 min.) using 25 pmol each of VH1BACK and VK4FOR primers to which *Nco* I and *Not* I restriction sites were appended, respectively. The amplification product was digested with *Nco* I and *Not* I for cloning into the pET-22b vector (Novagen, Inc., Madison, WI) containing a C-terminal histidine tag. The scFv product was also cloned into the pET-16b vector (Novagen) for the expression of an N-terminal histidine tag. The scFv

7-10A insert contained in the pET-22b plasmid was amplified using primers VH1BNDE (5'-G G A A T T C C A T A T G G C C G A G G T C A A G C T G C - 3') and JKSAL (5'- A C G C G T C G A C C C G T T T T A T T T C C A G C T T G G -3') and the PCR product was digested with *Nde* I and *Sa* I and ligated into the *Nde* I- and *Sa* I-digested pET-16b vector. The ligation products were used to transform the XL1-blue strain of *E. coli* (Stratagene, La Jolla, CA). Positive clones were subcloned into *E. coli* strain BL21 (DE3) (Novagen) for expression. Transformed BL21 (DE3) cells were grown at 37°C in LB containing 100 µg/ml ampicillin (Boehringer Mannheim Canada, Laval, Québec, Canada) until the O.D. at 600 nm reached 0.6, at which time 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added (Clonetech Laboratories Inc., Palo Alto, CA). Following induction, the cultures were grown for an additional 18 h at 30°C. Induced cells were centrifuged for 20 min at 10,000 x *g* and resuspended in 1/25 volume of 500 mM NaCl and 20 mM Tris-HCl, pH 7.9. Lysozyme (Boehringer Mannheim) was added to a concentration of 100 µg/ml and the suspension was incubated at 30°C for 30 min. To shear the DNA, the suspension was sonicated on ice for one minute or until the solution lost viscosity using a Braun-Sonic 2000 sonicator. The lysate was centrifuged at 29,000 x *g* for 30 min and the supernatant filtered through a 0.45 µm Sterifil-D membrane (Millipore Canada, Nepean, Ontario, Canada) for column chromatography.

Nucleotide sequencing of scFv 7-10A. The PCR assembly product of scFv 7-10A was cloned into the pCRII TA cloning vector (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Nucleotide sequencing was performed on both strands of two PCR products by the dideoxynucleotide chain terminating

method (Sanger *et al.*, 1977) using T7 DNA polymerase (Pharmacia) and [α - 35 S]dATP (ICN Pharmaceuticals Canada Ltd., Montréal, Québec, Canada) according to the manufacturer's instructions (Pharmacia).

Purification of scFv 7-10A. A soluble cytoplasmic extract was used for the purification on a Ni-NTA Agarose column (Qiagen Inc., Chatsworth, CA). The column was washed with 10 volumes of binding buffer (500 mM NaCl and 20 mM Tris-HCl, pH 7.9) and loaded with the prepared cell extract at a flow rate of about 10 column volumes per hour. After loading, the column was washed with binding buffer until the O.D. at 280 nm reached the baseline level, after which time the bound proteins were eluted with binding buffer containing 60 mM imidazole (Sigma-Aldrich Canada, Ltd., Mississauga, Ontario, Canada). Elution fractions were analyzed by SDS-PAGE and Western immunoblotting. Fractions containing the purified scFv were pooled and dialyzed against PBS for the biological assays.

SDS-PAGE analysis and Western immunoblotting. Induced cell extract preparations and elution fractions were separated by SDS-PAGE (Laemmli, 1970) and stained with Coomassie blue for direct visualization or electrotransferred to Hybond-C Extra nitrocellulose membranes (Amersham Searle Corp., Oakville, Ontario, Canada) for 1 h at 100 V. Membranes were blocked for 1 h with PBS-T (PBS containing 0.1% (v/v) Tween 20) and incubated for 90 min with a 2 μ g/ml solution of purified anti-7-10A rabbit anti-idiotypic antibodies (Lamarre *et al.*, 1991) in PBS-T. Membranes were washed five times with PBS-T and incubated for 60 min with horseradish peroxidase-conjugated goat antibodies to rabbit immunoglobulins (diluted 1/1,000; Kirkegaard & Perry Laboratory, Gaithersburg, MD). Membranes were again

washed five times with PBS-T and incubated with hydrogen peroxide (Sigma) and 4-chloro-1-naphtol (Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, Ontario, Canada).

ELISA. All incubations were performed at room temperature (about 25°C). Each well of 96-well microtiter plates was coated with 500 ng of viral antigen prepared from MHV-A59-infected cells, as described previously (Talbot *et al.*, 1984). After overnight incubation, the remaining binding sites in the wells were blocked with PBS containing 10% (v/v) fetal calf serum (FCS) and 0.2% (v/v) Tween-20 for 90 min. Serial three-fold dilutions of purified scFv fragments were added to the wells and incubated for 90 min. The wells were washed 5 times with PBS-T and a 2 µg/ml solution of purified rabbit anti-7-10A anti-idiotypic antibodies in blocking solution was added and incubated for 90 min. The wells were washed as described above and peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG antibodies (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc) were then added and the plates incubated for another 90 min. The plates were washed 5 times with PBS-T and the bound peroxidase revealed by incubation with *O*-phenylenediamine (Sigma) and hydrogen peroxide. The reaction was stopped with 1 N HCl and the absorbance read at 492 nm using an SLT EAR 400 AT plate reader.

Inhibition of binding of mAb 7-10A. The wells of 96-well microtiter plates were coated with viral antigen as described above and incubated overnight at room temperature. Serial three-fold dilutions of purified scFv fragments were added to the wells and incubated for 90 min, after which the wells were emptied and purified mAb 7-10A added without any previous washing. After incubation for 60 min, Fc-specific peroxidase-labeled goat anti-

mouse IgG (ICN) was added and the plates incubated for 90 min. All subsequent steps were performed as described above. The amount of purified mAb 7-10A added in this test was determined in a binding ELISA in which an absorbance value at 492 nm of about 1.0 was achieved in the absence of inhibition by antibody fragments.

Virus-neutralization assay. Duplicate serial dilutions of scFv fragments were incubated with approximately fifty plaque-forming units (PFU) of MHV-A59 for 1 h at 37°C. The mixtures were transferred onto 12-well plates containing confluent monolayers of DBT cells. After an adsorption period of 1 h at 37°C, the virus-scFv mixtures were removed and cells were overlaid with 1.5% (w/v) agarose in Earle's minimum essential medium/Hank's M199 (1:1, v/v) (Gibco Canada, Burlington, Ontario) supplemented with 5% (v/v) FCS. Plates were incubated for 48 h at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% (v/v) CO₂, after which the cells were fixed with formaldehyde and stained with crystal violet. Viral neutralization titers are expressed as the concentration of scFv neutralizing 50% of input viral infectivity.

Passive immunizations. MHV-seronegative 6-week-old BALB/c mice (Charles River) were injected intraperitoneally with 500 µg of scFv fragments 30 min prior to challenge with 5×10^5 PFU (10 LD₅₀) of MHV-A59 injected intracerebrally.

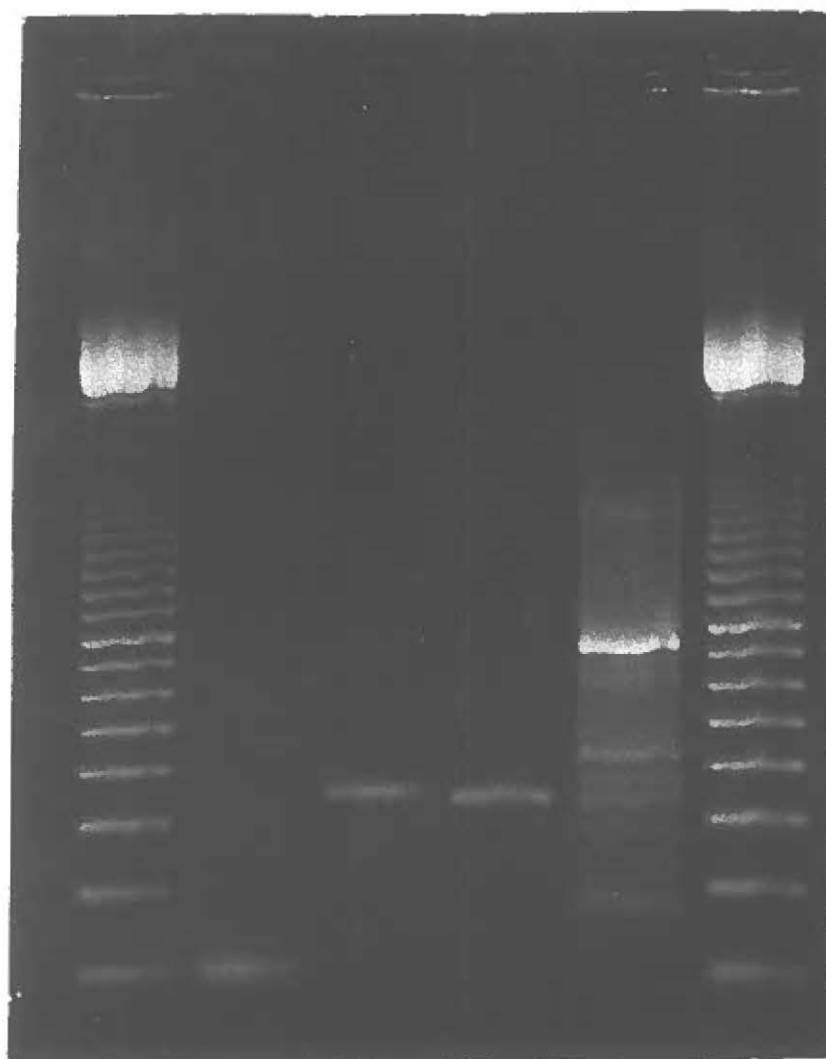
Acknowledgments

This work was supported by Grant MT-9203 from the Medical Research Council of Canada (MRCC) which also provided studentship support to A. Lamarre. P. Talbot and F. Chagnon acknowledge senior scholarship and studentship support, respectively, from the *Fonds de la recherche en santé du Québec*. The authors are grateful to Dr. Greg Winter (Cambridge, U.K.) for providing primer sequences and the pSW2scD1.3 plasmid and to Dr. Jean-François Laliberté and Dr. Christopher D. Richardson for helpful discussions.

FIGURE 8: EtBr-stained agarose gel showing the assembly PCR of the V_H and V_K regions.

M: 100 bp DNA ladder (Pharmacia), L: PCR product of the linker molecule, V_H: PCR product of the variable region of the heavy chain, V_K: PCR product of the variable region of the kappa light chain, A: 750 bp PCR product of the assembly reaction.

ML VH VK A M



— 750

```

1              11              21
E V K L O O S G P D L V K P F O S L S L T
GAGGTCAAGCTGCAGCAGTCAGGACCTGACCTGGTGAAACCTTTTCAGTCACTTTCACTCACC

22              32              41
C T V T G Y S I T S G Y S W H W I R Q F P
TGCCTGTCACTGGCTACTCCATCAACCAGTGGTTATAGCTGGCACTGGATCCGGCAGTTTCCA
CDR-H1

42              52              62
G N K L E W M G Y I H Y S G S T T Y N P S
GGAAACAAACTGGAATGGATGGGCTACATACACTACAGTGGTAGCACTACCTACAACCCATCT
CDR-H2

63              73              82A
L K S R I S I T R D T S K N Q F F L Q L N
CTCAAAAGTCGAATCTCTATCACTCGAGACACATCCAAGAACCAGTTCCTCCTGCAGTTGAAT

82B C              91              102
S V T T E D T A T Y Y C V R Y Y E Y F D Y
TCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGTAAGATACTATGAATACTTTGACTAC
CDR-H3

103              113
W G Q G T T V T V S S G G G G S G G G G S
TGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCT
LINKER

G G G G S D I E L T Q S P A T L S V T P G
GGCGGTGGCGGATCGGACATTGAGCTCACCCAGTCTCCAGCCACCCCTGCTGTGACTCCAGGA

17              27              37
D R V S L S C R A S Q S I S D Y L H W Y Q
GATAGAGTCTCTCTTTCTGCAGGGCCAGCCAGATATTAGCGACTACTTACACTGGTATCAA
CDR-L1

38              48              58
Q K S H E S P R L L I K Y A S Q S I S G I
CAAAAATCACATGAGTCTCCAAGGCTTCTCATCAAATATGCTTCCCAATCCATCTCTGGGATC
CDR-L2

59              69              79
P S R F S G S G S G S D F T L S I N S V E
CCCTCCAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGTCAGATTTCACTCTCAGTATCAACAGTGTGGAA

80              90              100
P E D V G V Y Y C Q N G H S F P F T F G S
CCTGAAGATGTTGGAGTGTATTACTGTCAAATGGTCAACAGCTTTCCATTCAAGTTCCGGCTCG
CDR-L3

101              108
G T K L E I K R
GGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG

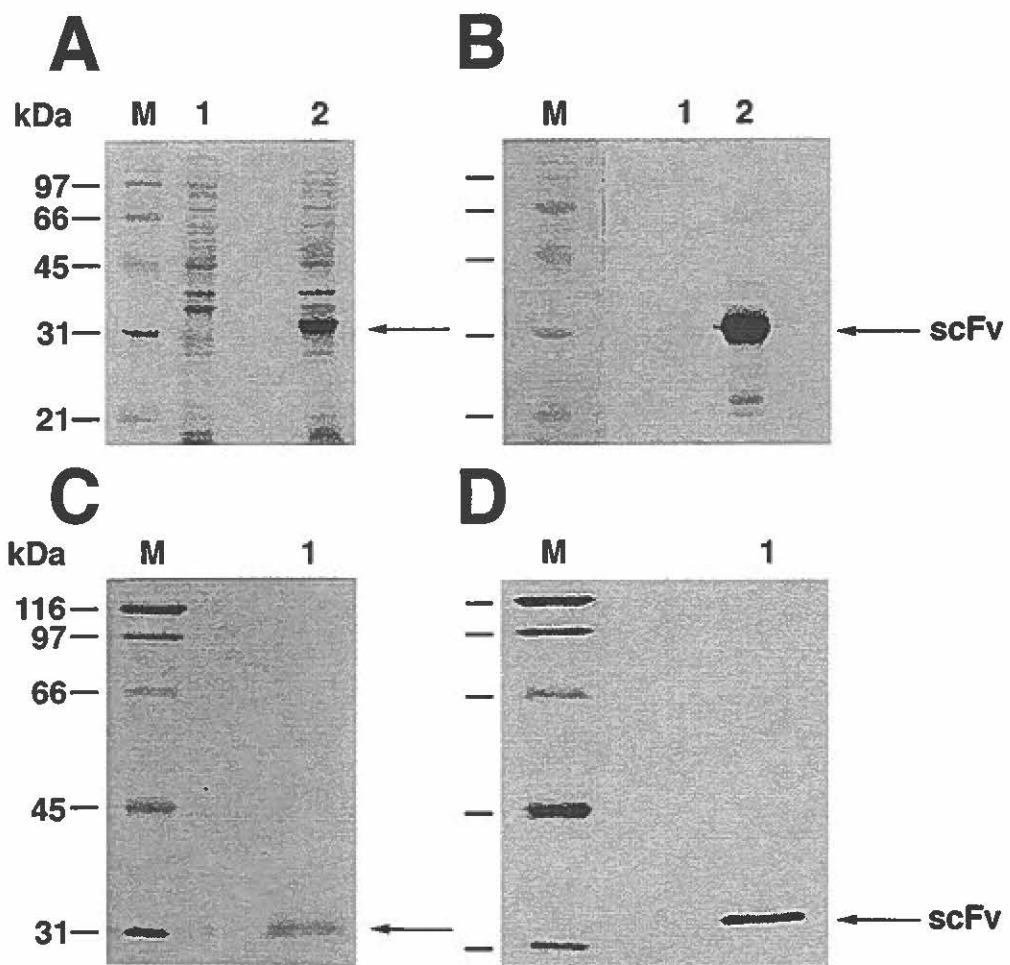
```

FIGURE 9: Nucleotide and deduced amino acid sequences of the scFv.

Numbers on top of amino acid residues represent the position as attributed by the Kabat *et al.*, 1991 database. Underlined nucleotides represent the three heavy (H) and three light (L) chains complementary determining regions (CDRs). Underlined amino acids represent the (Gly₄ Ser)₃ linker molecule.

FIGURE 10: SDS-PAGE and Western blot analysis of purified scFv fragments.

Samples of crude cell extracts or purified scFv were separated by SDS-PAGE on 10% acrylamide gels under reducing conditions and stained with Coomassie blue or electrotransferred onto nitrocellulose. **(A)** Coomassie blue stained gel of uninduced (lane 1) or induced cell extract (lane 2). **(B)** Western immunoblot of uninduced (lane 1) or induced cell extract (lane 2). **(C)** Coomassie blue stained gel of affinity-purified scFv (lane 1). **(D)** Western immunoblot of affinity-purified scFv (lane 1). **M:** Molecular weight standards (Bio-Rad).



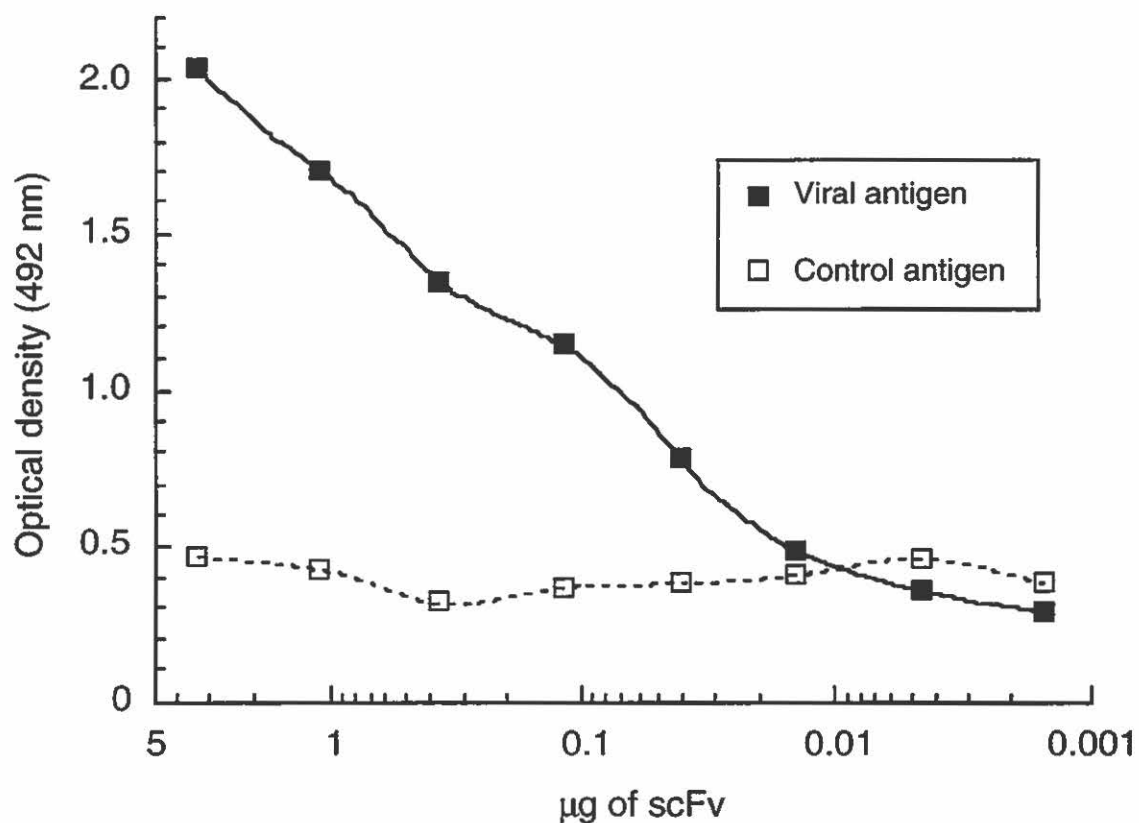


FIGURE 11: Reactivity of the scFv fragments for MHV antigen.

Microtiter plates were coated with 500 ng/well of viral antigen preparations (■) or uninfected cell lysates (□). The binding of 3-fold dilutions of purified scFv fragments was detected using 7-10A-specific anti-idiotypic antibodies and horseradish peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG antibodies.

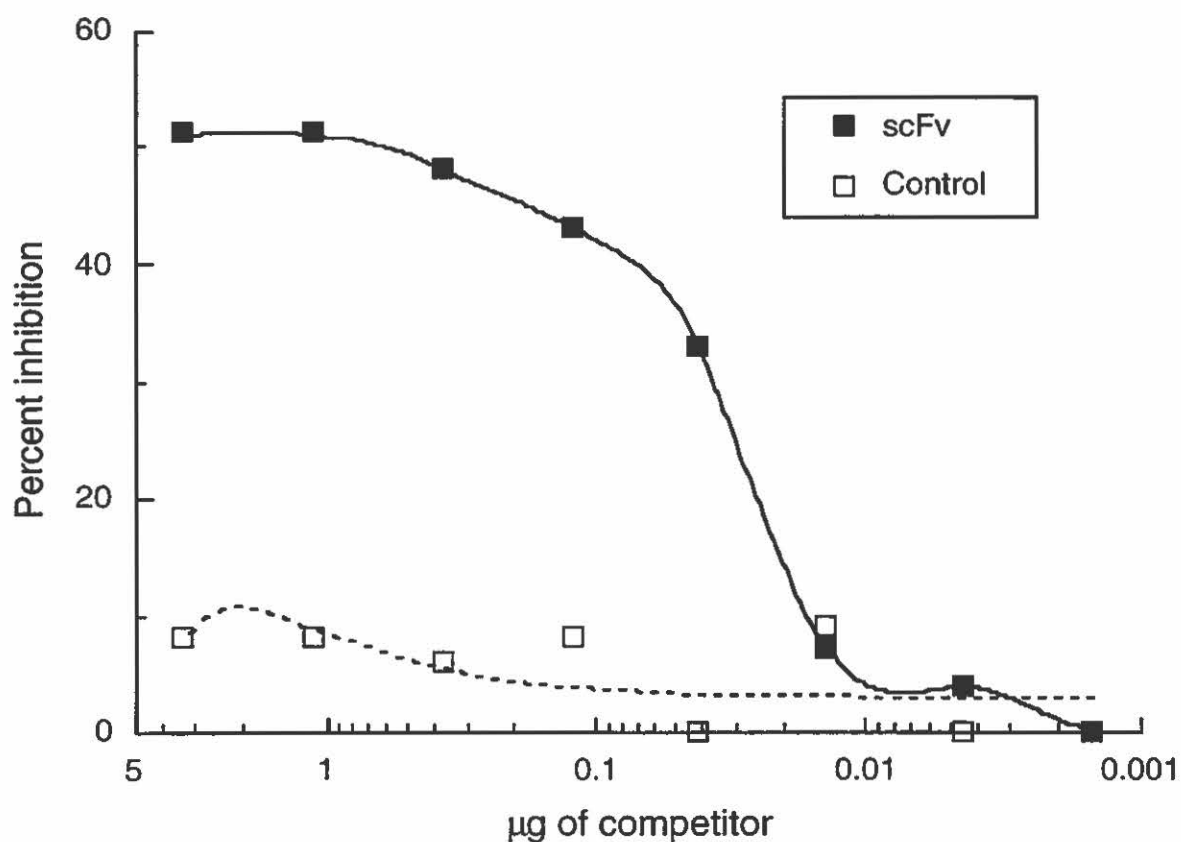


FIGURE 12: Inhibition of parental antibody binding to MHV antigen by purified scFv fragments.

Microtiter plates were coated with 500 ng/well of viral antigen preparations. Serial three-fold dilutions of purified scFv fragments (■) or control antibody (□) were added to the plates and the binding of a fixed concentration of the parental antibody was detected using Fc-specific horseradish peroxidase-labeled anti-mouse antibodies.

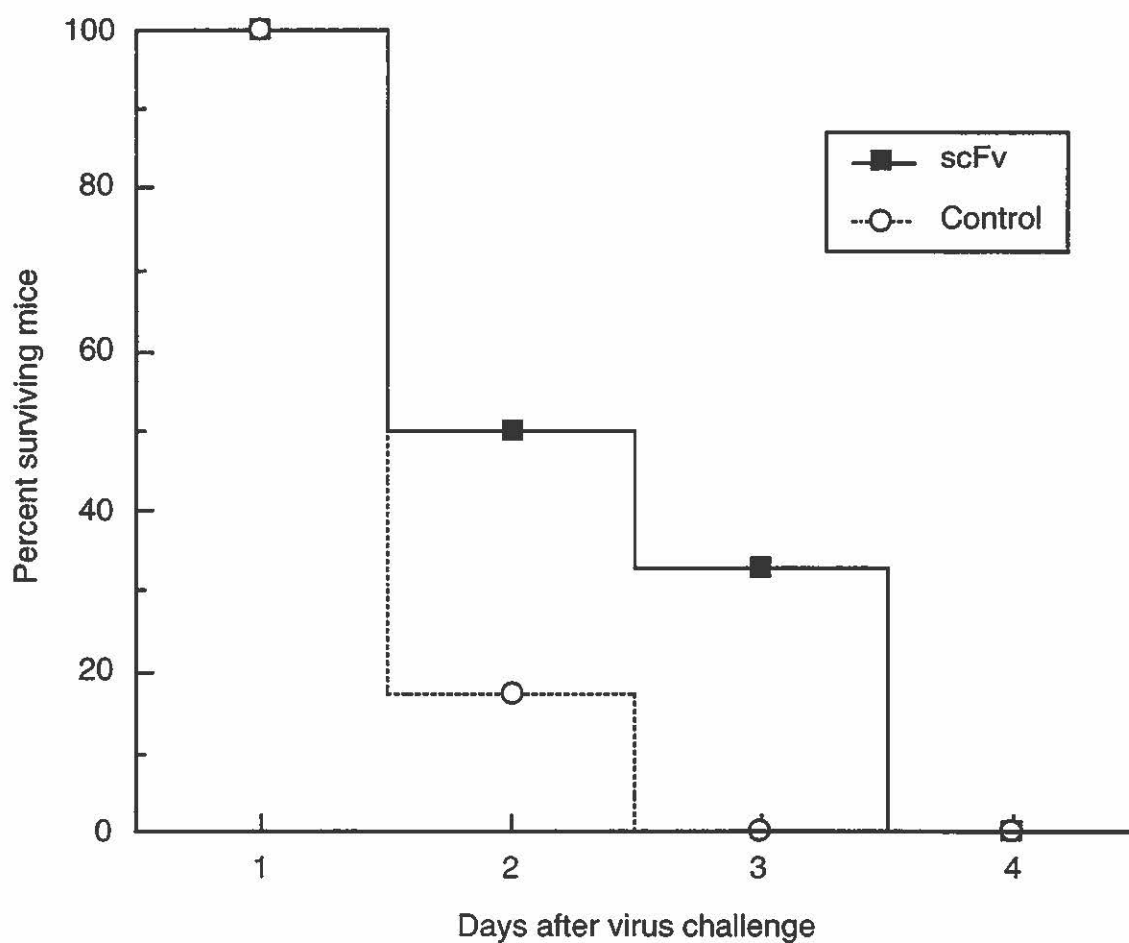


FIGURE 13: Protection of mice from MHV-A59 infection by passive transfer of scFv fragments.

Two groups of six BALB/c mice received either a 500 μg injection of purified scFv fragments in PBS (■) or an equivalent volume of PBS (□) and were challenged 30 min later with 10 LD_{50} of MHV-A59.

CHAPITRE 3

ÉTUDE DE L'INDUCTION D'UNE RÉPONSE IMMUNITAIRE PROTECTRICE CONTRE LE CORONAVIRUS MURIN PAR VACCINATION ANTI-IDIOTYPIQUE

Introduction à l'article III

Le troisième chapitre de cette thèse de doctorat est consacré à l'évaluation du potentiel vaccinal des anticorps anti-idiotypiques contre l'infection par le MHV-A59. La capacité qu'ont les anticorps anti-idiotypiques d'induire une réponse immunitaire spécifique à un antigène a rapidement fait reconnaître leur grand potentiel vaccinal, surtout contre les infections virales. Toutefois, il existe encore beaucoup d'interrogations quand aux mécanismes impliqués dans ce phénomène. Dans le but d'analyser le mode d'action des anticorps anti-idiotypiques dans le déclenchement d'une réponse immunitaire antivirale, des lapins ont été immunisés avec l'AcMo 7-10A et la production d'anticorps anti-idiotypiques a été vérifiée. Les résultats obtenus pour cette partie de mon projet de doctorat ont été publiés dans "The Journal of Immunology", ce qui constitue la première partie de ce chapitre.

L'administration d'anticorps anti-idiotypiques xénogéniques purifiés à des souris a induit la production d'anticorps antiviraux neutralisants et a protégé les souris vaccinées contre l'infection coronavirale. Une analyse détaillée des propriétés biologiques de ces anticorps anti-idiotypiques a permis de constater que leur mode d'action ne provenait pas d'un mimétisme moléculaire avec l'antigène mais plutôt d'un mimétisme fonctionnel. Cette conclusion s'appuie sur le fait que l'idiotype présent sur l'AcMo 7-10A n'a pu être détecté dans des antisérums antiviraux provenant de différentes espèces animales. Cette observation est l'une des rares descriptions du déclenchement d'une réponse immunitaire protectrice par administration d'anticorps anti-idiotypiques ne mimant pas l'antigène.

ARTICLE III

**ANTIIDIOTYPIC VACCINATION AGAINST MURINE CORONAVIRUS
INFECTION**

Alain LAMARRE, Jacqueline LECOMTE et Pierre J. TALBOT

Virology Research Center, Institut Armand-Frappier, Université du Québec,
Laval, Québec, CANADA, H7N 4Z3

Article publié dans: *The Journal of Immunology* (1991), **147**: 4256-4262.

ABSTRACT

Rabbit polyclonal antiidiotypic antibodies were generated against a neutralizing monoclonal antibody specific for a conformational epitope on the S glycoprotein of murine hepatitis virus, strain A59 (MHV-A59). These anti-Id were directed predominantly against an Id that was undetectable in rabbit and rat anti-MHV-A59 sera and weakly represented in syngeneic and allogeneic antiviral sera. However, some partial idiotypic sharing was observed between the Id-bearing antibody and a mAb with a similar antigenic site specificity. The anti-Id inhibited the virus-binding and neutralizing activities of the immunizing antibody, demonstrating that they recognize paratope-associated idiotopes. Mice immunized with affinity-purified anti-Id developed MHV-A59-specific antibodies that neutralized viral infectivity to high titers. Moreover, these animals survived an otherwise lethal challenge with virulent MHV, unlike control mice immunized with normal rabbit Ig. These results indicate that at least a subpopulation of the polyclonal anti-Id could induce a protective immune response directed toward a biologically important MHV-A59 epitope, and demonstrate the feasibility of antiidiotypic vaccination against a coronavirus infection.

INTRODUCTION

Murine hepatitis viruses (MHV) are members of the *Coronaviridae* (Siddell *et al.*, 1983a), a family of enveloped positive-stranded RNA viruses responsible for a number of human and animal respiratory, neurological and gastrointestinal infections (Wege *et al.* 1982, Spaan *et al.*, 1990). Some neurotropic strains of MHV cause encephalitis and demyelination in mice and rats. Human coronaviruses are responsible for 15 to 35 % of common colds (McIntosh, 1990) and it has been suggested that they could be associated with disorders of the central nervous system such as multiple sclerosis (Burks *et al.*, 1980, Salmi *et al.*, 1982) or Parkinson's disease (Fishman *et al.*, 1985). The virion of MHV-A59 is composed of three major structural proteins (Spaan *et al.*, 1990): the nucleoprotein N, the membrane glycoprotein M, and the spike glycoprotein S. The latter protein, of 180 kDa, is responsible for binding to the viral receptor on the surface of target cells (Williams *et al.*, 1990) and for virus-induced cell fusion (Collins *et al.*, 1982). It also bears the majority of the epitopes involved in viral neutralization (Collins *et al.*, 1982, Talbot *et al.*, 1984, Wege *et al.*, 1984, Gilmore *et al.*, 1987, Talbot *et al.*, 1988, Daniel and Talbot, 1990). The immunological importance of the S glycoprotein was demonstrated by vaccination against coronavirus infection with affinity-purified S (Daniel and Talbot, 1990), as well as passive mAb protection (Buchmeier *et al.*, 1984, Daniel and Talbot, 1990).

Recently, a number of techniques have been applied to the characterization of molecular determinants involved in viral pathogenesis. One of these techniques utilizes oligopeptides homologous to defined regions of various proteins in order to study their capacity of inducing a protective immune response. Using this approach, protective neutralizing antibodies

were produced in mice immunized with a synthetic decapeptide homologous to a S domain (Talbot *et al.*, 1988). Protection was also observed, in the absence of neutralizing antibodies, with a synthetic peptide homologous to a previously identified B epitope but only when it was coupled to a T epitope from the hemagglutinin protein of influenza virus (Koolen *et al.*, 1990). Another increasingly employed method to characterize antigenic determinants has been the use of the mimicking properties of antiidiotypic antibodies in different experimental models (Hiernaux, 1988).

The concept of the immune network proposed by Jerne in 1974 describes the immune system as a set of Id (Ab1) and anti-Id (Ab2) that interact with each other (Jerne, 1974). Certain types of antiidiotypic antibodies (Ab2 β) have the property of bearing the internal image of an antigen and such antibodies have been successfully used as surrogate antigens in the induction of antibody responses against parasites (Sacks and Sher, 1983, Grzych *et al.*, 1985), bacteria (McNamara *et al.*, 1984, Stein and Söderström, 1984) and viruses (Reagan *et al.*, 1983, Uytdehaag and Osterhaus, 1985, Kennedy *et al.*, 1986, Anders *et al.*, 1989). In addition, Ab2 β have been shown to induce immunoresistance to tumors in humans (Koprowski *et al.*, 1984) and experimental animals (Lee *et al.*, 1985, Nelson *et al.*, 1987). Another interesting property of antiidiotypic antibodies is their use as probes to identify cellular receptors (Sege and Peterson, 1978). Such an approach has been used to characterize both hormone (Sege and Peterson, 1978, Schreiber *et al.*, 1980, Cleveland *et al.*, 1983) and viral surface receptors (Co *et al.*, 1985, Marriott *et al.*, 1987).

A number of important questions remain to be answered in order to consider anti-Id as an alternative to conventional vaccines. For example, the modalities involved in generating anti-Id possessing the desired specificity

and properties. This emphasizes the importance of fundamental research on the immune network in different experimental systems.

Previous work in our laboratory has resulted in production of a monoclonal antibody (mAb 7-10A) directed against the spike glycoprotein of MHV-A59 that could neutralize viral infectivity *in vitro* and passively protect mice *in vivo* (Daniel and Talbot, 1990). To address whether anti-Id could mimic the biologically important conformational determinant recognized by 7-10A, polyclonal anti-Id were raised in rabbits against this mAb. Mice immunized with affinity-purified anti-Id developed neutralizing MHV-A59-specific antibodies and were protected against an otherwise lethal challenge with virulent MHV.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Female, 6- to 7-week-old, MHV-seronegative BALB/c mice (Charles River, St-Constant, Québec, Canada) were used in all experiments, except when AKR, C57BL/6 (Charles River) and SJL mice (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) were used to produce hyperimmune antiviral sera.

Virus and cells. MHV-A59 was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD), plaque-purified twice, and passaged four times at a multiplicity of infection of 0.01 on DBT cells (Daniel and Talbot, 1987). MHV-A59-infected DBT cell lysates (Talbot *et al.*, 1984) served as the viral material in the inhibition assay described below.

Monoclonal antibodies. The production and characterization of the hybridoma secreting mouse neutralizing mAb 7-10A, specific for the spike glycoprotein of MHV-A59, has been previously described (Daniel and Talbot, 1990). Other anti-MHV-A59 mAb were produced in our laboratory and will be described elsewhere. Monoclonal antibody 1B5 (IgG2a, κ) served as an isotype-matched control of irrelevant specificity (herpes simplex virus). All antibodies were purified by standard Protein-A-Sepharose chromatography.

Biotin-labeling of antibodies. Biotin was covalently linked to antibodies with biotinyl-N-hydroxysuccinimide (BNHS) (Sigma Chemical Company, St.-Louis, MO) as described (Guesdon *et al.*, 1979). Briefly, antibodies at a concentration of 1 mg/ml were dialyzed against PBS, pH 7.4, and mixed with a one third volume of a 1 mg/ml solution of BNHS in N,N-dimethylformamide (Sigma), resulting in an approximately 150 : 1 molar ratio of BNHS to Ig. The

reaction mixture was incubated with agitation at room temperature for 4 h and then dialyzed against several changes of PBS and stored at -20°C before use.

Immunization protocol for generating anti-Id. Two New-Zealand white rabbits (Cunipur, St-Valérien, Québec, Canada) were injected s. c. at multiple sites with 200 µg of affinity-purified mAb 7-10A emulsified 1:1 in CFA. Five booster injections of the same amount of antibodies in IFA were given at bi-weekly intervals. Rabbits were bled 7 days after each injection and the sera were collected and assayed for reactivity against mAb 7-10A in a double immunodiffusion assay and ELISA, as described below.

Double immunodiffusion assay. In order to visualize the presence of anti-Id in rabbit antiserum, a double immunodiffusion assay was utilized. Melted agarose [1%(w/v) in PBS] was poured onto 5 cm x 5 cm glass plates and placed in a humid chamber at 4°C to solidify, after which wells (2 mm in diameter) were punched in. Rabbit antiserum or eluates from purification columns (see below) were placed in the center wells and mAb 7-10A and 1B5 in adjacent wells. Antibodies were allowed to diffuse for 3 days in a humid chamber at 4°C.

Purification of anti-Id. Affinity-purified mAb 7-10A and 1B5 were individually coupled to cyanogen bromide-activated Sepharose 4B according to the manufacturer's instructions (Pharmacia Fine Chemicals, Inc., Uppsala, Sweden). In order to eliminate anti-isotypic and anti-allotypic antibodies, rabbit serum (30 ml) was passed through the column containing covalently coupled antibody 1B5, which has the same isotype and allotype as 7-10A but a different idiotype. Unbound proteins, containing antiidiotypic and pre-existing rabbit antibodies, were washed away with PBS, pH 7.4, and then passed through the 7-10A-column to remove pre-existing rabbit antibodies.

The column-bound antiidiotypic antibodies were eluted with a solution of 0.2M glycine-HCl with 0.2M NaCl at pH 2.5 and immediately neutralized with 2M Tris-HCl buffer, pH 8.5. The anti-Id were concentrated by precipitation with 50% ammonium sulfate, dialyzed against PBS, pH 7.4, and stored at -20°C. For one experiment, the anti-Id were coupled to keyhole limpet hemocyanin (KLH) as described (Bona *et al.*, 1979). Briefly, antibodies at a concentration of 1 mg/ml were mixed with an equal amount of KLH (Sigma) in PBS, pH 7.4. Coupling was initiated by the addition of 0.05% (v/v) glutaraldehyde (Anachemia, Montréal, Québec, Canada) and the mixture was incubated with agitation at room temperature for 1 h. The reaction was stopped by adjusting the solution to 0.05 M lysine and incubation continued at room temperature for 1 h. Antibodies were dialyzed against PBS, pH 7.4, before use.

ELISA for anti-Id specificity. All incubations in the ELISA were done at room temperature and PBS was used at pH 7.4. Microtiter plates were coated with affinity purified mAb (65 ng/well in PBS) and incubated overnight. The available sites in the wells were then blocked with PBS containing 10% (v/v) FCS and 0.2% (v/v) Tween-20 for 90 min. Serial three-fold dilutions of purified anti-Id or NRlg were added to the wells and incubated for 90 min. The wells were washed 5 times with PBS containing 0.1% (v/v) Tween-20 (PBS-T) and peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG antibody (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) was then added and the plates incubated for 90 min. The plates were washed 5 times with PBS-T and the reaction was developed with *O*-phenylenediamine and hydrogen peroxide (Talbot *et al.*, 1984). The reaction was stopped with 1N HCl and the absorbance read at 492 nm using an SLT EAR 400 AT plate reader.

ELISA for detection of idiotypic in antiviral sera. Microtiter plates were coated with purified anti-Id or NRlg (15 ng/well in PBS) and incubated

overnight. The plates were then blocked as described above and dilutions of mouse or rat hyperimmune sera produced against MHV-A59 or biotinylated purified rabbit antiviral immunoglobulin were added to the wells and incubated for 90 min. The wells were washed 5 times with PBS-T and peroxidase-labeled goat anti-mouse or rat IgG antibody (Kirkegaard & Perry Laboratories) or peroxidase-labeled streptavidin (Sigma) was then added and the plates incubated for 90 min. The remaining steps were performed as described above.

ELISA for detection of inhibition of binding of idiotype to antigen by anti-Id. This inhibition assay was a modified ELISA in which the inhibition of binding of mAb 7-10A to MHV-A59 viral protein by anti-Id was determined in a streptavidin/biotin immunoassay. Microtiter plates were coated with viral antigen prepared as described above (125 ng/well in PBS) and incubated overnight. Biotinylated 7-10A and purified anti-Id or NRlg dilutions were pre-incubated together 90 min. and transferred onto the viral antigen-coated plates to be incubated for another 90 min, after which the wells were washed 5 times with PBS-T. Peroxidase-labeled streptavidin (Sigma) was then added and the plates incubated for 90 min. All subsequent steps were performed as described above.

Inhibition of virus-neutralization assay. Duplicate serial ten-fold dilutions of mAb 7-10A were incubated with 10 μ g of purified anti-Id or NRlg for 2 h at 4°C. Fifty plaque-forming units (PFU) of MHV-A59 were then added and incubated for 1 h at 37°C. The mixtures were transferred onto 12-well plates containing confluent monolayers of DBT cells. After an adsorption period of 1 h at 37°C, supernatant was removed and cells were overlaid with 1.5% (w/v) agarose in Earle's minimum essential medium/Hank's M199 (1:1, v/v) (Gibco Canada, Burlington, Ontario) supplemented with 5% (v/v) FCS. Plates were

incubated for 48 h at 37°C in a humidified atmosphere with 5% (v/v) CO₂, fixed with formaldehyde and stained with crystal violet. Viral neutralization titers were the reciprocal of serum dilutions neutralizing 50% of viral infectivity.

Immunization of mice for generating anti-anti-Id (Ab3). Groups of 12 or 6 female 6-week-old BALB/c mice were injected i. p. with 100 µg of purified anti-Id or NRlg, coupled or not to KLH, respectively, and both emulsified 1:1 in CFA. Two booster injections of 50 µg of the same preparations in IFA were given at bi-weekly intervals. Mice were bled 14 days after the first two injections and 7 days after the third and their sera assayed in ELISA and neutralization assay for reactivity against MHV-A59.

Virus neutralization and protection assays. Forty PFU of MHV-A59 in culture medium was incubated for 1 h at 37°C with appropriate dilutions of immune sera from mice immunized with anti-Id or NRlg. Viral neutralization titers were evaluated as described above. Protection experiments were done 10 days after the last booster injection by intracerebral inoculation with 5×10^5 PFU (10 LD₅₀) of MHV-A59.

RESULTS

Production of anti-Id and detection in rabbit serum. Immunization of rabbits with mAb 7-10A resulted in the production of anti-Id in sufficient quantity to be detectable in a double immunodiffusion assay (Fig. 14A). Rabbit antiserum was placed in the center well and mAb 7-10A and 1B5 in adjacent wells. After 3 days of diffusion, precipitation bands against both mAb were visible, indicating the presence of anti-isotypic and anti-allotypic antibodies. A spur sticking out of the precipitation band of mAb 7-10A showed that anti-Id recognizing mAb 7-10A but not mAb 1B5 were present in the antiserum.

Purification and characterization of anti-Id. The serum from one rabbit was purified by adsorption onto an isotype column, followed by purification on an Id column, as described in Materials and Methods. The eluate from the first column no longer contained anti-Id as shown by the absence of a spur in double immunodiffusion (Fig. 14B). The eluate from the second column was concentrated by ammonium sulfate precipitation and assayed by ELISA against mAb 7-10A and isotype-matched mAb 1B5. Purified anti-Id no longer reacted with antibody 1B5 used to prepare the isotype-column, but showed a strong reactivity with antibody 7-10A used to elicit the anti-Id response (Fig. 14C and 15). Maximum response in the ELISA was obtained with as little as 10 ng of purified anti-Id whereas the same quantity of normal rabbit immunoglobulin (NRIg) or pre-immune serum of the rabbit used (data not shown) did not show any significant response, demonstrating the specificity of the anti-Id for mAb 7-10A (Fig. 15). To determine whether anti-Id recognize a private determinant uniquely present on mAb 7-10A or a cross-reactive idio-type associated with the immune response against MHV-A59, the ability of the anti-Id to recognize antibodies of similar specificity produced in different

animal species was investigated. Antiviral hyperimmune sera from mouse, rat and rabbit injected with MHV-A59 were tested for the presence of the idiotype using the purified anti-Id as probe. The anti-Id did not react with the rat or rabbit antiviral sera, indicating the absence of the idiotype across the species barrier (Fig. 16). Although a faint reaction was observed with syngeneic and allogeneic antiviral sera (Fig. 16), suggesting that the 7-10A-idiotype might be a cross-reactive idiotype represented in the mouse anti-MHV-A59 immune response, we cannot exclude the possibility that some remaining anti-isotype and allotype antibodies in the anti-Id preparation could account for this signal. (Fig. 15). Reactivity of purified anti-Id was also tested against a panel of isotype-matched anti-MHV-A59 mAb. Only mAb 4-11G showed a weak positive response (Fig. 17). Interestingly, mAb 7-10A and 4-11G were previously shown to recognize two overlapping conformational determinants by partial reciprocal competition in an ELISA (Daniel and Talbot, 1990). This result suggests that mAb 7-10A and 4-11G share some idiotypic determinants recognized by at least a subpopulation of the anti-Id and that these determinants could be responsible for the similar antigenic site specificity.

To further characterize the anti-Id and to determine whether they were capable of interacting with idiotype present in the antigen combining site of mAb 7-10A, two different assays were used to test the inhibition of binding of idiotype to antigen. Firstly, we assayed for inhibition of virus-binding by anti-Id. Binding of antibody 7-10A to viral antigen could be inhibited by purified anti-Id antibodies in a dose-dependent manner (Fig. 18). Almost 80% inhibition of binding was obtained with 6 μ g of the anti-Id, while the same amount of NR1g inhibited less than 10% of the binding. There was no direct binding of anti-Id to virus (data not shown). Secondly, the anti-Id were tested for their capacity to inhibit the neutralization effect of mAb 7-10A in an inhibition of virus-

neutralization assay. An amount of 10 μg of anti-Id could reduce the neutralization titer of mAb 7-10A by 4 \log_{10} , whereas the same amount of NRlg did not have any effect (Table V). These results taken together indicate that the rabbit anti-Id reacted with or near the antigen-binding site of mAb 7-10A.

One essential criterion for defining an anti-Id as a internal image of a given antigen is the antigen-specific immune response of animals immunized with the anti-Id. Therefore, groups of 6 BALB/c mice were immunized with purified anti-Id while another group of mice received the same amount of purified NRlg. The presence of anti-MHV-A59 antibody in serum was examined by ELISA. Mice immunized with NRlg produced no detectable antiviral antibody. However, all mice receiving anti-Id developed significant levels of antiviral antibody after the second injection and this level could be increased with a third injection. Typical results for the serum of an animal taken after each injection are shown in Fig. 19. We then tested the ability of these sera to neutralize the infectivity of MHV-A59 in a plaque reduction assay. All sera from mice immunized with anti-Id displayed relatively high neutralization titers ranging from 250 to 1250 whereas sera from control mice showed titers of less than 10 (Table VI). In order to verify if anti-Id immunization could induce neutralization titers as high as standard BALB/c anti-MHV-A59 hyperimmune sera, which consistently yielded titers of about 10,000, we tested the immunogenicity KLH-coupled anti-Id. Neutralization titers could be significantly increased to between 1250 and 6250.

To verify whether the anti-Id-induced immune response could protect mice from a normally lethal virus infection, animals were challenged intracerebrally with 5×10^5 PFU (10 LD_{50}) of MHV-A59, 10 days after the last booster injection. All mice showed clinical signs of MHV infection but animals

in the control group died from the MHV-A59 infection within 3 to 5 days, whereas all mice immunized with uncoupled anti-Id and 83 percent (10 / 12) of animals receiving KLH coupled anti-Id recovered and were protected against lethal encephalitis (Fig. 20).

DISCUSSION

In this study, polyclonal rabbit antiidiotypic antibodies were generated against a neutralizing monoclonal antibody specific for the A59 strain of murine coronaviruses. Monoclonal antibody 7-10A was characterized previously and shown to immunoprecipitate the spike glycoprotein of MHV-A59, to neutralize viral infection *in vitro*, to inhibit virus-induced cell fusion and to passively protect mice from a normally lethal viral challenge (Daniel and Talbot, 1990). Thus the antigenic determinant recognized by mAb 7-10A, which is of a conformational nature (Daniel and Talbot, 1990), shows great biological importance in the pathogenesis of MHV-A59.

The anti-Id isolated in this study reacted strongly with mAb 7-10A whereas no significant reaction was observed with an isotype-matched control antibody (Fig 14C and 15). This demonstrates a strong specificity of the anti-Id for the Id, with no cross-reactivity with an irrelevant Id. The purified anti-Ids were also able to inhibit both the binding of the Id to the antigen (Fig. 18) and the neutralization effect of mAb 7-10A (Table V), suggesting that they recognize idiotopes in or near the paratope of 7-10A. The inhibition of binding of the idiotype to the antigen is a characteristic of both Ab2 β (internal image) and Ab2 γ , which also recognize combining site-associated idiotopes, but without carrying the internal image of the antigen (Bona and Kohler, 1984).

It has been suggested that Ab2 β and Ab2 γ could be distinguished on the basis of their ability to bind Id in xenogeneic antisera specific for the antigen recognized by the Ab1 (Bona and Kohler, 1984, Zhou *et al.*, 1990). An Ab2 β should recognize the Id of antibodies produced in other species, since it mimics the antigen whereas an Ab2 γ would not (Zhou *et al.*, 1990). The anti-Id

used in the present study did not react with rabbit and rat antiviral sera, but reacted weakly with syngeneic and allogeneic mouse antisera (Fig. 16). This suggests that the 7-10A Id may be present in the normal mouse anti-MHV-A59 antibody response and thus constitute a public Id, but that it cannot be detected in the other animal species we tested. We cannot exclude the possibility that the weak reactions observed with mouse antiviral sera were contributed by low levels of anti-isotypic and/or anti-allotypic antibodies that may still contaminate our polyclonal anti-Id preparation (Fig. 15). If this was the case, it would be concluded that the 7-10A Id is of private nature. The use of monoclonal anti-Id should help clarify this point. Some partial idiotypic sharing was observed between mAb 7-10A and 4-11G since anti-Id not only reacted with mAb 7-10A but also, to a lesser extent, with mAb 4-11G (Fig. 17). Since mAb 7-10A and 4-11G were previously shown to recognize two overlapping conformational determinants by partial reciprocal competition in an ELISA (Daniel and Talbot, 1990), we suggest that these antibodies share idiotopes needed for the recognition of antigenic determinants common to both epitopes. In the light of these results, the anti-Id cannot be classified as an internal image of the antigen since it failed to detect the Id in xenogeneic anti-MHV-A59 sera even though it inhibited the virus-binding and neutralizing activities of the Ab1. These properties lead us to believe that this anti-Id is of the gamma subtype. A similar phenomenon has been previously reported by Lombes *et al.* in an aldosterone system (Lombes *et al.*, 1989). They reported the isolation of a syngeneic monoclonal antiidiotypic antibody that could inhibit the binding of aldosterone to the idiotype-bearing antibody but did not react with six other anti-aldosterone mAb, a rabbit polyclonal antibody or with aldosterone receptor. Lombes *et al.* (Lombes *et al.*, 1989) defined this antiidiotypic antibody as a "restricted" internal image of aldosterone.

Nevertheless, it remains possible that the anti-I_d described in the present study does mimic the viral epitope as a true internal image antibody and that our inability to detect the presence of the corresponding I_d in various antiviral sera resulted from a possible suppression of this I_d by *in vivo*-generated auto-anti-I_d (Wassermann, *et al.*, 1982).

We have observed in our coronavirus model that two injections of purified rabbit anti-I_d were sufficient to induce significant levels of Ab₃ in mice and that antibody titers could be further increased with a third injection (Fig. 19). Moreover, this immune response was sufficient to neutralize viral infectivity *in vitro* (Table VI). However we found that the neutralizing titers were lower than the ones observed after infection of BALB/c mice with MHV-A59. In order to verify whether the immunogenicity of the anti-I_d could be enhanced by conjugation to a carrier protein, mice were immunized with KLH-coupled anti-I_d. Neutralization titers could be significantly increased to levels almost comparable to those of an hyperimmune antiviral serum (Table VI).

The virus-specific immune response obtained following anti-I_d vaccination was strong enough to protect an average of 90 percent of all anti-I_d vaccinated animals whereas mock-immunized mice all died of encephalitis within three to five days after virus challenge. No significant difference in the survival rate of animals receiving free or KLH-coupled anti-I_d was observed, suggesting that levels of Ab₃ obtained upon immunization with uncoupled anti-I_d were high enough to protect mice from viral infection and that the increase in neutralization titers did not have a major effect on survival.

Relatively few studies have reported antigen-specific immune responses upon anti-I_d vaccination (for a review, see Hiernaux, 1988) and even fewer examples of Ab₂-induced protective immunity against virus infections are

described in the literature (Erlt and Finberg, 1984, Uytdehaag and Osterhaus, 1985, Kennedy *et al.*, 1986, Oosterlaken *et al.*, 1991). To our knowledge only one other group has reported the use of antiidiotypic antibodies in a coronavirus system (Hariharan *et al.*, 1989). They used a neutralizing monoclonal antibody specific for the peplomer protein of transmissible gastroenteritis virus (TGEV) to induce an antiidiotypic response in pigs. The purified swine anti-Id were utilized to elicit an Ab3 response in mice. However, four injections were insufficient to induce a detectable virus-neutralizing activity and three additional i. v. booster injections resulted in relatively weak neutralization titers.

Our study constitutes one of the few reports of induction of an antigen-specific immune response by administration of antiidiotypic antibodies that do not possess all the accepted internal image properties. Zhou *et al.* reported the generation of a BALB/c mouse anti-HIV response specific for a gp41 epitope defined by a synthetic peptide following administration of a murine monoclonal antiidiotypic antibody showing noninternal-image properties (Zhou *et al.*, 1990). This anti-Id, classified as an Ab2 α , failed to recognize the Id expressed on anti-gp41 peptide antibodies induced in other species and did not generate a detectable anti-peptide or anti-HIV response in rabbits. On the other hand, induction of a protective immune response in BALB/c mice to Semliki Forest virus (SVF) has been reported using a monoclonal anti-Id (Erlt and Finberg, 1984). However, induction of SVF-neutralizing antibodies and protection by anti-Id administration was genetically restricted to BALB/c mice. Similarly, Sacks and Sher (Sacks and Sher, 1983) produced murine anti-Id that could compete with a trypanosome antigen for binding to Ab1, even though the Id was not detected in rabbits and the Ab3 response was genetically restricted. Therefore, these anti-Id antibodies do not meet all the

necessary criteria to be classified as internal image Ab2 β as defined by Bona and Kohler (Bona and Kohler, 1984). Thus, they most likely correspond to Ab2 γ , as does the one described in the present study. The mechanisms involved in the induction of antigen-specific immune responses by anti-I_d that are not internal image antibodies are still poorly understood. The activation of silent clones not normally expressed during an immune response to the nominal antigen has been suggested as a potential explanation for Ab2 α -induced immune responses. A similar activation could be occurring in response to Ab2 γ antibodies.

We have demonstrated the feasibility of an antiidiotypic vaccination against a coronavirus infection of the central nervous system in a murine model. Moreover, we suggest that such a protective immune response was induced despite the fact that the anti-I_d did not appear to represent an internal image of the antigen. This observation emphasizes the versatility of anti-I_d in manipulating the immune system of the host. However, the definition of the parameters involved will be required before antiidiotypic vaccination can be safely envisaged.

Since the anti-I_d was produced against a biologically important conformational epitope on the spike glycoprotein of MHV, our results further strengthen the available experimental evidence on the critical importance of an immune response directed towards defined regions on the S protein in protection from coronavirus disease. Preliminary evidence suggests that the epitope recognized by mAb 7-10A resides in the C-terminal (S₂) portion of the molecule (Kathryn Holmes, personal communication), where other important domains have been localized (Talbot *et al.*, 1988, Koolen *et al.*, 1990, Daniel *et al.*, 1993).

The use of antiidiotypic antibodies as probes of the molecular structure of biologically relevant epitopes on the S glycoprotein of MHV will require the production of true internal image anti-Id. The use of monoclonal or genetically engineered antibodies should greatly facilitate such studies.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Francine Lambert and Claude Daniel for expert technical assistance, Valeriu Micusan for helpful comments, and Benoit Poliquin for assistance in the early stages of this work.

TABLE V

Inhibition of virus-neutralization with Ab2

Competitor	Neutralization titer (log ₁₀) ^a
Medium	6
anti-Id	2
NRlg	6

^a Reciprocal of the highest dilution of mAb 7-10A ascites fluid that neutralized 50% of input virus after incubation with competitor

TABLE VI

Induction of MHV-A59 neutralizing antibodies by Ab2 immunization

Serum sample	Neutralization titer ^a	Number of mice
Prelimmune	<10	36
Controls ^b	<10	18
Anti-Id ^c	250-1250	6
Anti-Id-KLH ^d	1250-6250	12

^a Reciprocal of the highest dilution of serum that neutralized 50% of input virus

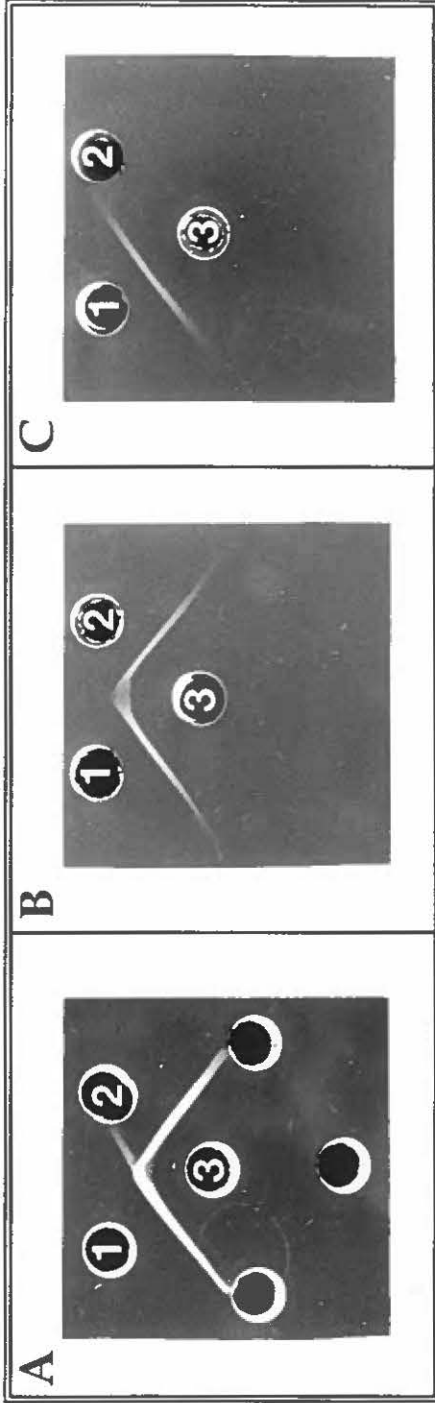
^b Mice immunized with free or KLH-coupled NR1g

^c Mice immunized with uncoupled anti-Id

^d Mice immunized with KLH-coupled anti-Id

FIGURE 14: Detection of anti-I_d in rabbit serum and assessment of their purification.

A rabbit was injected with Ab1 as described in *Materials and Methods* and the serum (3) screened for the presence of Ab2 by testing for reactivity against the Ab1 (1) or an isotype-matched control antibody (2) (A). The rabbit serum was adsorbed onto an isotype-column and tested for the presence of residual Ab2 (3) (B). Adsorbed serum (wash-through from the isotype column) was purified on an I_d-column and the eluate (3) tested for residual reactivity against control antibody (C).



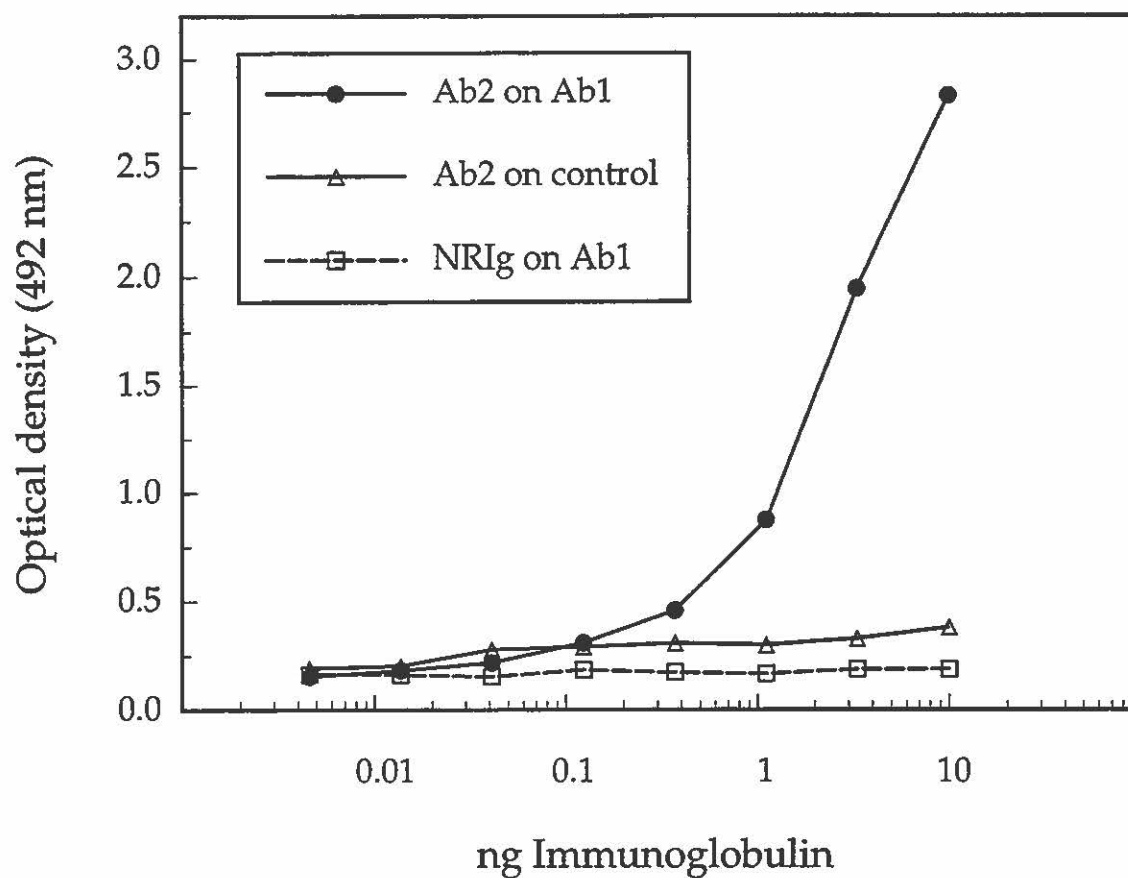


FIGURE 15: ELISA for determining anti-IgD specificity.

Microtiter plates were coated with 65 ng/well of Ab1 or control antibody, and binding of varying amounts of purified Ab2 or NRIg was determined using horseradish peroxidase-labeled anti-rabbit antibodies.

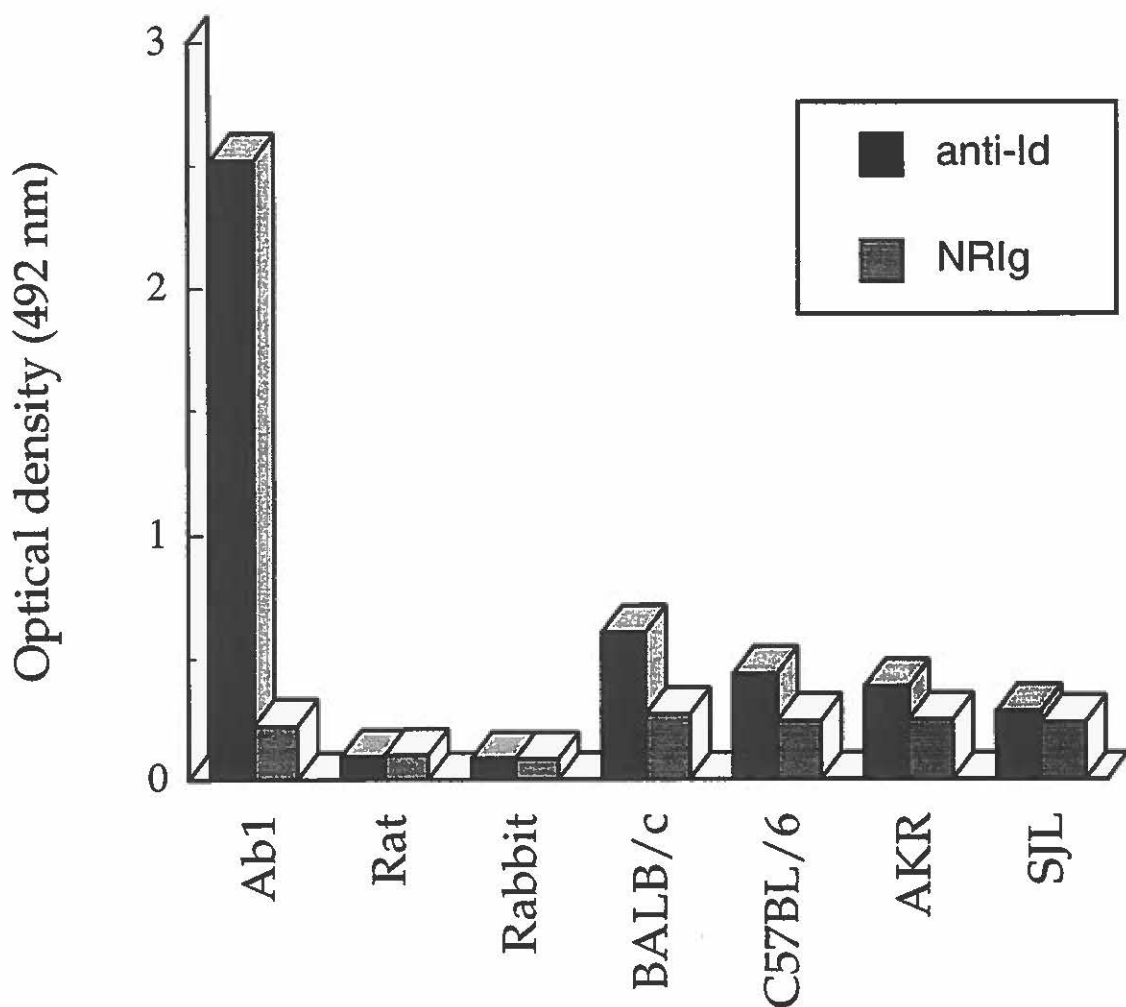


FIGURE 16: Detection of Id in syngeneic (BALB/c mice), allogeneic (AKR, SJL and C57BL/6 mice) and xenogeneic (rat and rabbit) antiviral serum.

Microtiter plates were coated with 15 ng/well of purified anti-Ig (Ab2) or NRlg. The binding of dilutions of mouse or rat hyperimmune sera produced against MHV-A59, mAb 7-10A (Ab1), or biotinylated purified rabbit antiviral Ig was determined using peroxidase-labeled species-specific anti-Ig or streptavidin.

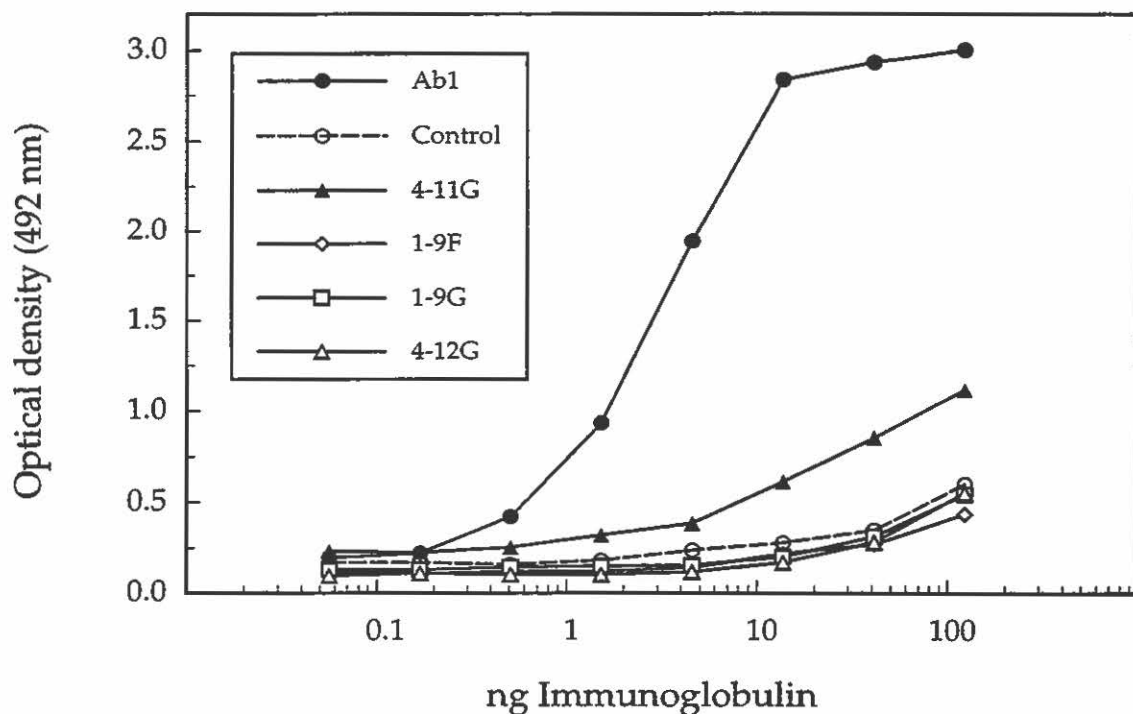


FIGURE 17: Detection of Id on MHV-A59-specific mAb.

Microtiter plates were coated with 65 ng/well of Ab1, control or MHV-A59-specific mAb and binding of varying amounts of purified Ab2 was determined using horseradish peroxidase-labeled anti-rabbit antibodies.

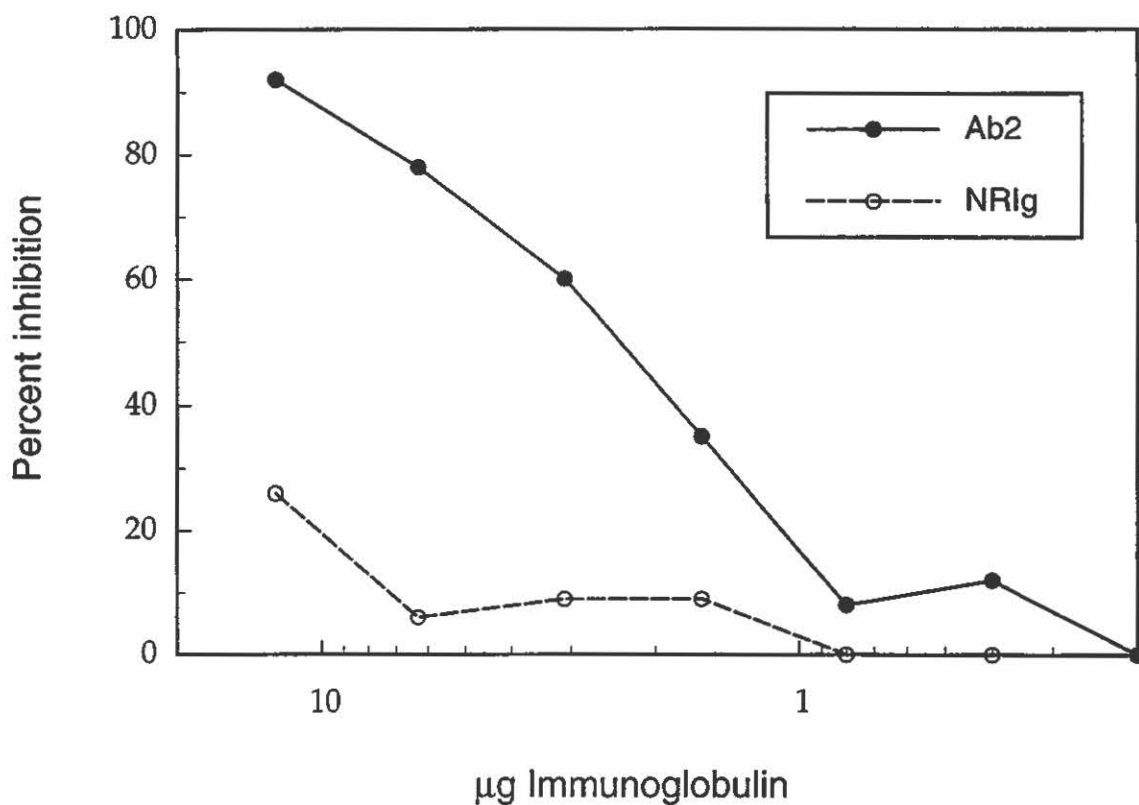


FIGURE 18: Inhibition of binding of Id to antigen by anti-Id (Ab2).

Microtiter plates were coated with 125 ng/well of viral Ag. Biotinylated Ab1 and purified Ab2 or NRlg dilutions were preincubated together and transferred onto the viral Ag-coated plates. The residual binding of Ab1 to viral Ag was detected using peroxidase-labeled streptavidin.

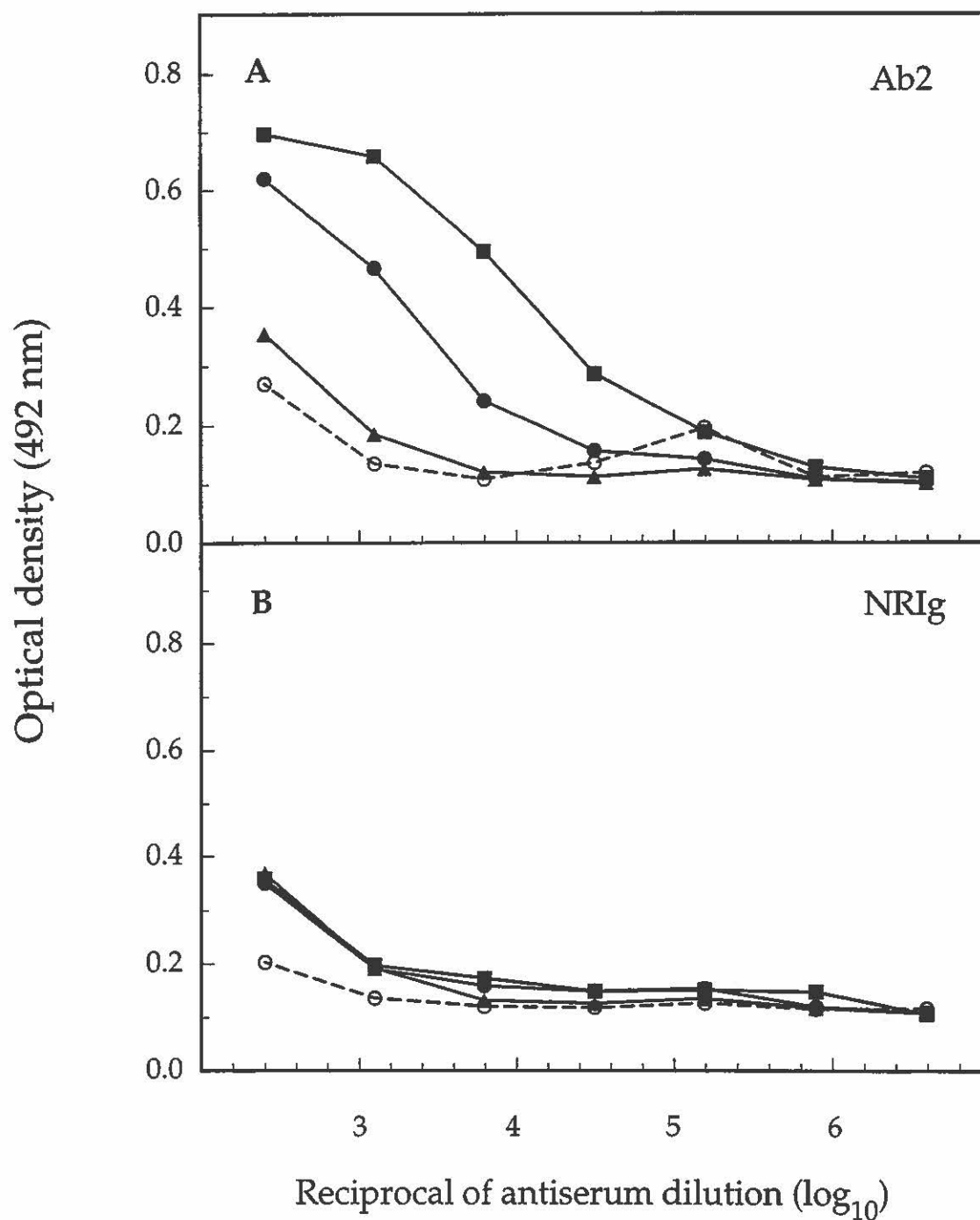


FIGURE 19: Detection of MHV-A59-specific antiidiotypic antibodies.

BALB/c mice were immunized with either (A) Ab2 or (B) NRIg, as described in *Materials and Methods*. Sera were collected before (O) and after the first (▲) second (●) and third (■) injections and assayed by ELISA for binding to MHV-A59 Ag.

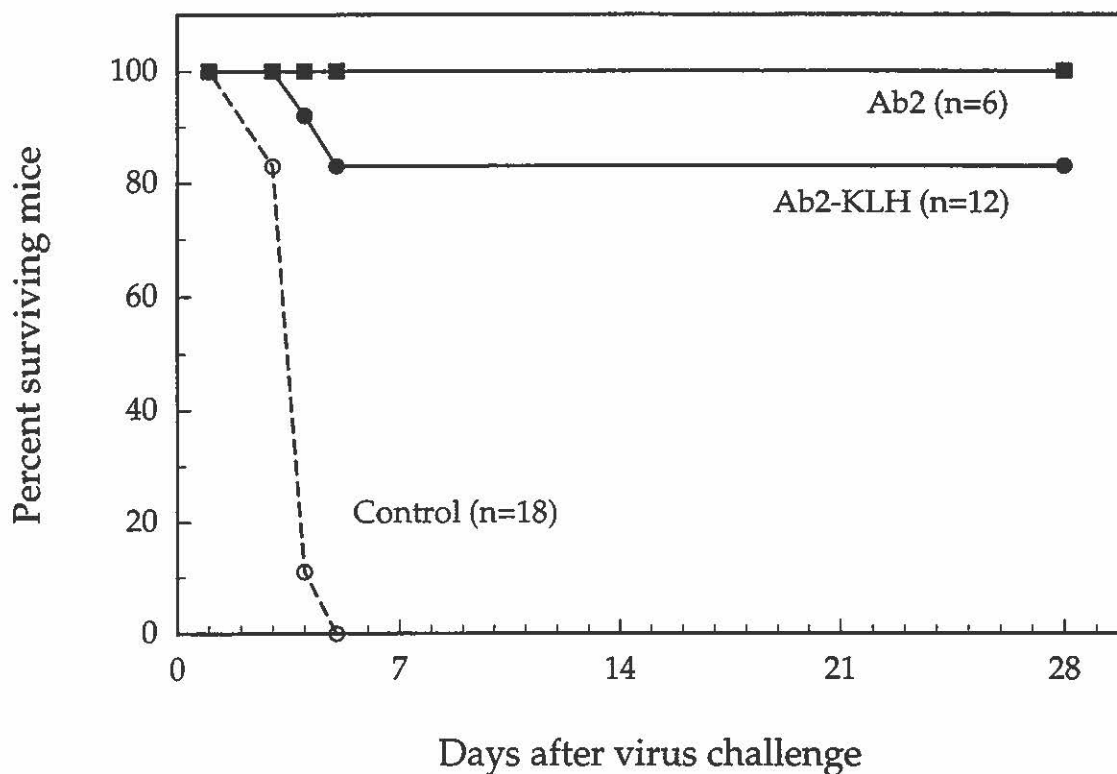


FIGURE 20: Protection of mice against MHV-A59 infection by anti-Id vaccination.

Groups of six or twelve BALB/c mice were immunized with Ab2 (■), Ab2-KLH (●) or free or KLH-coupled NRlg (○) and challenged with 10 LD₅₀ of MHV-A59 as described in *Materials and Methods*.

Introduction à l'article IV

Comme il a été démontré dans l'article précédent, les anticorps anti-idiotypiques ont la capacité d'induire une réponse immunitaire spécifique au coronavirus MHV-A59 suffisamment forte pour protéger des souris contre l'infection virale. Cependant, la production d'anticorps anti-idiotypiques polyclonaux xénogéniques ne permet pas de bien identifier leur mécanisme d'action précis, puisqu'ils contiennent un ensemble d'anticorps différents. L'utilisation d'anticorps anti-idiotypiques monoclonaux ne présente pas cette limite, mais leur production par la technique conventionnelle de fusion cellulaire s'avère laborieuse, et avec un taux de réussite souvent très faible. Avec le développement de techniques de biologie moléculaire permettant d'exprimer des fragments d'anticorps recombinants chez les bactéries, l'isolement d'anticorps anti-idiotypiques pourra sans doute être facilité. Nous avons donc voulu vérifier si le clonage du répertoire de souris immunisées avec l'anticorps 7-10A, dans un système d'expression utilisant le phage lambda (Huse, *et al.*, 1989), pourrait permettre de faire l'isolement d'anticorps anti-idiotypiques ayant des propriétés vaccinales contre le MHV-A59. Des souris ont donc été immunisées avec l'anticorps 7-10A, et trois jours après l'immunisation, l'ARN splénique a été isolé. Les gènes des régions variables des chaînes lourdes et légères ont été amplifiées par PCR à l'aide d'amorces spécifiques aux immunoglobulines murines. Après purification des différents produits de PCR, ceux-ci ont été clonés dans le vecteur phagique d'expression procaryotique ImmunoZAP (Stratagene, La Jolla, CA). L'ADN phagique ainsi généré a été encapsidé *in vitro* dans des particules de phages lambda, et une banque combinatoire d'anticorps de plus de 5 millions de

phages différents a ainsi été obtenue et amplifiée à plus de 2×10^7 clones. Une portion de la banque a servi à infecter des pétris recouverts d'un tapis bactérien, et après l'obtention de plages de lyses, celles-ci ont été transférées sur membranes de nitrocellulose. La présence de fragments d'anticorps, à l'intérieur de ces plages de lyse, a été révélée par immunoempreinte de type "Western" à l'aide d'anticorps anti-chaînes lourdes et légères. Plus de 80% des phages de la banque exprimaient l'une ou l'autre des chaînes, alors qu'environ 50% les exprimaient simultanément. Cependant, le criblage de plus de 5 millions de phages différents, soit l'équivalent de plus de la totalité de la banque obtenue, à l'aide de l'anticorps 7-10A, n'a révélé la présence d'aucun phage pouvant réagir avec celui-ci, ce qui témoigne de l'absence ou de la faible représentation d'anticorps anti-idiotypiques dans cette banque.

Après ce résultat décevant, nous nous sommes tournés vers un autre vecteur d'expression procaryotique, qui cette fois-ci, fait appel à un phage filamenteux capable d'exprimer des fragments d'anticorps recombinants directement à sa surface, permettant ainsi de faire le criblage de phages anti-idiotypiques par adsorption sur l'idiotype. Deux banques de phages différentes ont été obtenues du docteur Greg Winter de l'université Cambridge (Angleterre). Une banque de phages exprimant des scFv humains à leur surface, contenant plus de 10^8 phages différents (Nissim *et al.*, 1994), et une banque de plus de $6,5 \times 10^{10}$ phages exprimant des Fab humains (Griffiths *et al.*, 1994). Pour des raisons inexplicables, et malgré une plus grande diversité, aucun phage anti-idiotypique n'a pu être isolé à partir de la seconde banque. Par contre, le criblage de la banque de phages exprimant des scFv humains, avec trois anticorps anti-MHV-A59, a permis d'obtenir un grand

nombre de phages spécifiques et ce, pour les trois anticorps. En effet, entre 32 et 84% des clones obtenus après cinq rondes d'adsorption ont démontré une liaison spécifique à leur anticorps respectif. La séquence nucléotidique de plusieurs clones a été déterminée dans le but d'identifier des clones exprimant des anticorps de spécificité unique. Les clones ainsi sélectionnés ont été purifiés et injectés à des souris BALB/c et C57BL/6. Aucun des clones sélectionnés n'a induit la production significative d'anticorps antiviraux ou neutralisants. Toutefois, deux clones ont pu protéger partiellement les deux lignées de souris utilisées et un autre uniquement les souris C57BL/6. Ces résultats démontrent la faisabilité d'isoler des anticorps anti-idiotypiques à partir de telles banques de phages, mais l'isolement de phages exprimant des anticorps de haute affinité avec une forte efficacité vaccinale, nécessitera probablement la production de banques encore plus diverses. L'ensemble de ces résultats a été soumis pour publication dans "Virology".

ARTICLE IV

**PHAGE-DISPLAYED ANTI-IDIOTYPIC ANTIBODY FRAGMENTS
PARTIALLY PROTECT AGAINST MURINE CORONAVIRUS INFECTION
WITHOUT APPARENT STRUCTURAL HOMOLOGY TO VIRUS**

Running title: Phage anti-Ids protect from MHV infection

Alain LAMARRE and Pierre J. TALBOT

Correspondence Footnote:

Pierre Talbot:

Laboratory of Neuroimmunovirology, Virology Research Center, Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 boulevard des Prairies, Laval, Québec, CANADA, H7N 4Z3

Telephone: (514) 687-5010 extension 4406

Fax: (514) 686-5531 (or 5626)

E-mail: Pierre_Talbot@iaf.quebec.ca

Article soumis à: Virology le 3/9/96

ABSTRACT

Murine coronaviruses provide useful animal models for human neurological disorders such as multiple sclerosis. In an effort to better understand the mechanisms involved in protection from coronavirus infection, we are studying the role of the idiotypic network in modulation of viral infectivity. We have explored the feasibility of using libraries of single-chain antibodies displayed on phage surface for the isolation of recombinant anti-Ids. A phage-display library containing more than 10^8 different antibody specificities was screened for the presence of anti-Ids by successive rounds of panning with three different neutralizing antiviral monoclonal antibodies. After five rounds of panning, between 32 and 84 percent of all clones tested showed antibody-binding. Although several clones showed identical antibody sequences, a number of different clones were identified and further characterized. None of the selected clones induced the production of detectable antiviral or neutralizing antibodies in two strains of mice. Nevertheless, immunization with two different anti-idiotypic clones yielded partial protection of both BALB/c and C57BL/6 mice and another clone partially protected C57BL/6 mice. There were no significant amino acid sequence homologies between the selected anti-Ids and the viral S protein that is a major target of a protective immune response. These results demonstrate that anti-idiotypic antibodies can be isolated from a phage-display library and can modulate viral infectivity in the absence of apparent structural mimicry of viral antigen. The development of more diverse phage-display libraries should yield phages with more potent protective capabilities.

INTRODUCTION

Murine hepatitis viruses (MHV) are members of the *Coronaviridae*, a family of enveloped positive-stranded RNA viruses responsible for a number of human and animal respiratory, neurological and gastrointestinal infections (Wege *et al.*, 1982, Spaan *et al.*, 1990). The neurotropic A59 strain of MHV causes encephalitis and demyelination in mice and rats and is used in our laboratory as an animal model for multiple sclerosis. The MHV-A59 virion is composed of three major structural proteins (Spaan *et al.*, 1990): the nucleocapsid protein (N), the membrane glycoprotein (M), and the spike glycoprotein (S). The S protein constitutes a major target of the protective immune response during viral infection and is responsible for binding to the viral receptor on the surface of target cells (Collins *et al.*, 1982; Williams *et al.*, 1991) and for virus-induced cell fusion (Collins *et al.*, 1982). In order to better understand the mechanisms involved in protection from coronavirus infection, we are studying the role of the idiotypic network in modulation of viral infectivity.

The concept of the immune network proposed by Jerne in 1974 (Jerne, 1974) describes the immune system as a set of variable domains (idiotypes) that interact with each other. Certain types of anti-idiotypic antibodies have the property of bearing the internal image of an antigen and such anti-I_ds have been used successfully as surrogate antigens in experimental vaccines against parasites (Sacks *et al.*, 1983, Grzych *et al.*, 1985), bacteria (McNamara *et al.*, 1984, Stein *et al.*, 1984) and viruses (Reagan *et al.*, 1983, Uytdehaag and Osterhaus, 1985, Kennedy *et al.*, 1986, Anders *et al.*, 1989).

We have previously shown that polyclonal anti-I_{ds} could induce the production of MHV-A59-specific anti-anti-idiotypic antibodies (Ab3s) that could mimic the idiotype-bearing antibody (Ab1) and neutralize viral infection *in vitro* and protect mice from MHV-A59 infection (Lamarre *et al.*, 1991). Further characterization of the idiotypic network in coronavirus infection requires the use of more defined monoclonal reagents. Unfortunately, the isolation of biologically active monoclonal anti-I_{ds} has proven to be difficult using conventional approaches. In the present study, we report the use of a phage display library for the isolation of human single-chain anti-I_d antibodies to evaluate the feasibility of using this technology as an alternative to hybridoma production for the characterization of the vaccinating potential of anti-I_{ds}.

MATERIALS AND METHODS

Selection of the library. The construction of the phage display library of human scFv fragments was described elsewhere (Nissim *et al.*, 1994). Immuntubes (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated by overnight incubation at room temperature with each of the following three monoclonal antibodies: 7-10A and 4-11G (Daniel and Talbot, 1990) and 5B19 (Collins *et al.*, 1982, Daniel *et al.*, 1993) at 100 $\mu\text{g/ml}$ in PBS. The next day, the tubes were washed 3 times with PBS, blocked with PBS containing 2% (w/v) skim milk powder (PBS-M) and incubated at 37°C for 2 hours. The tubes were similarly washed and 10^{12} to 10^{13} TU of phages from the library in PBS-M were added and the tubes were incubated at room temperature for 2 hours. After 20 washes with PBS containing 0.1% (v/v) Tween 20 (PBS-T) and 20 washes with PBS alone, the bound phages were eluted by a 10 min incubation with a 100 mM solution of triethylamine and immediately neutralized with 1.0 M Tris-HCl, pH 7.4. Exponentially growing *E. coli* TG1 cells were infected with the eluted phages by incubation in a 37°C water bath for 30 min. Infected cells were centrifuged, resuspended in 2xTY broth and plated on one 9" x 9" Bio-Assay dish (Nunc) of 2xTY containing 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin and 1% (w/v) glucose (2xTY-amp-glu). Plates were incubated overnight at 37°C. Five ml of 2xTY was added on top of the dish and cells were loosened with a glass spreader. About 10^8 bacteria were added to 2xTY-amp-glu and grown until the OD at 600 nm was 0.5, at which time 10^{12} M13-K07 helper phages (Stratagene, La Jolla, CA) were added and incubated for 30 min in a 37°C water bath. The cells were pelleted and resuspended in

2xTY containing 100 µg/ml ampicillin and 25 µg/ml kanamycin (2xTY-amp-kan) and incubated at 30°C overnight. The culture was centrifuged and the supernatant was precipitated twice with 2.5 M polyethylene glycol 8000, and the phages were resuspended in water. The selection procedure was repeated five times before isolated clones were tested by ELISA.

Phage ELISA. Isolated colonies from the fifth round of panning were grown in 96-well plates containing 2xTY-amp-glu and infected for 90 min with M13-K07 helper phage. Cells were centrifuged and resuspended in 2xTY-amp-kan and grown overnight at 30°C. Each well of 96-well microtiter plates was coated with 1 µg of the appropriate monoclonal antibody or KLH (Sigma-Aldrich Canada, Ltd., Mississauga, Ontario, Canada) in PBS. After overnight incubation, the remaining binding sites in the wells were blocked with PBS-M for 90 min. One hundred µl of the phage-containing supernatant or polyclonal PEG-precipitated phages were added and incubated for 90 min. The wells were washed 5 times with PBS-T and peroxidase-labeled anti-M13 antiserum (Pharmacia Canada Inc., Baie-d'Urfé, Québec, Canada) was then added and the plates incubated for another 90 min. The plates were washed 5 times with PBS-T and the bound peroxidase revealed by incubation with *O*-phenylenediamine (Sigma) and hydrogen peroxide. The reaction was stopped with 1 N HCl and the absorbance read at 492 nm using an SLT EAR 400 AT plate reader.

Nucleotide sequencing of selected clones and sequence alignments. Precipitated phage particles from positive clones identified in the phage-ELISA described above were extracted twice with phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1 mixture) and single-stranded DNA was precipitated with ethanol. Pellets were washed with 70% (v/v) ethanol, dried and resuspended in water. Nucleotide sequencing was performed by the dideoxynucleotide chain terminating method (Sanger *et al.*, 1977) using the LINK-Seq primer (5'- C G A T C C G C C A C C G C C A G A G -3') (Hoogenboom and Winter, 1992), T7 DNA polymerase (Pharmacia) and [α -³⁵S]dATP (ICN Pharmaceuticals Canada Ltd., Montréal, Québec, Canada) according to the manufacturer's instructions (Pharmacia). Sequence alignments of CDR3 and V_H segments with that of the S glycoprotein of MHV-A59 (Luytjes *et al.*, 1987) were performed with version 2.45 of the GeneWorks[®] software (Intelligenetics Inc., Campbell, CA).

Immunization of mice with selected clones. Groups of MHV-seronegative BALB/c or C57BL/6 mice (Charles River, St-Constant, Québec, Canada) were injected intraperitoneally with 2 mg of PEG-precipitated phage emulsified 1:1 in complete Freund's adjuvant. Three booster injections of the same quantity of phage in incomplete Freund's adjuvant were given at biweekly intervals. Mice were bled 7 days after each injection and the sera were tested for the presence of antiviral antibodies by ELISA and for virus neutralization activity as described previously (Lamarre *et al.*, 1991). Immunized mice were challenged 10 days after the last booster injection by intracerebral injection with 10 LD₅₀ (5 x 10⁵ PFU for BALB/c and 6 x 10⁴ PFU for C57BL/6) of MHV-A59.

RESULTS

The phage display library of human scFv antibody fragments was subjected to five rounds of selection by panning against three different neutralizing anti-MHV-A59 mAbs. To verify if the panning procedure had enriched the antibody-binding phage population, polyclonal populations of phages were assayed for binding to the different antibodies by ELISA. Figure 21 shows the binding curves of the three polyclonal phage populations to mAb 7-10A or to KLH after five rounds of selection with either one of three mAbs. A greater proportion of the 7-10A-selected phages reacted with 7-10A compared to the phages selected with the other two mAbs, demonstrating the effectiveness of the selection procedure. In addition, the polyclonal mAb-selected phages did not show any reactivity with KLH, indicating that the panning protocol did not amplify phage populations with specificities for unrelated proteins. A slight cross-reactivity with the two other selecting antibodies was observed, which probably indicates the presence of phage with binding specificities for constant regions common to all three antibodies. Similar binding curves were obtained for the other two selecting antibodies (data not shown).

Individual phage clones were screened for binding to the selecting antibodies by ELISA using supernatants from infected bacteria. Figure 22 shows the reactivity of some of the antibody-selected clones against the different anti-MHV-A59 mAbs or to KLH. After five rounds of panning, positive clones were identified for all three antibodies used for selection, in proportions ranging from 32 to 84 percent. Again, some cross reactivity was

observed with a few clones, which possibly indicates that these phages express antibody fragments that recognize similar structures present on the other antibodies.

The variable regions of the heavy chains of ELISA-positive clones specific for each antibody were then sequenced. A number of clones showed identical V_H sequences and only clones with unique sequences were selected for further characterization and are presented in Table VII. Out of six different anti-7-10A anti-idiotypic clones sequenced, three had sequences identical to clone 7H9, with exactly the same CDR3 sequence and DP38 V_H segment as defined by Tomlinson *et al.* (1992). Similarly, out of five anti-5B19 clones sequenced, three had sequences identical to clone 5D5 whereas clone 5B5 used the same DP32 V_H segment with a different CDR3 sequence. Finally all six anti-4-11G clones sequenced had identical V_H segments and CDR3 sequences.

Seven clones selected for biological characterization were concentrated from supernatant of infected cells by PEG precipitation and 2 mg of concentrated phage in adjuvant was used to immunize BALB/c and C57BL/6 mice that also received three booster injections at biweekly intervals. Mice were bled 7 days after each injection and the sera were tested for the presence of antiviral antibodies by ELISA and for virus neutralization. No significant antiviral or neutralizing antibodies were detected in these animals whereas anti-phage antibody titers were high (data not shown). Finally, all animals were challenged with a lethal dose of MHV-A59. All BALB/c mice immunized with the wild-type phage (pHEN) died within five days (Fig. 23A)

which is similar to the expected mortality rate of unprotected animals (Lamarre *et al.*, 1991). A small delay in mortality was observed with mice immunized with the 5E2 clone and 10% of animals immunized with the 7G9 and 5D5 clones survived. Twenty percent of C57BL/6 mice immunized with the wild-type phage survived the viral infection. Since this strain of mice is more sensitive to MHV-A59 infection (Yu *et al.*, 1996), the LD₅₀ is reduced compared to BALB/c and small variations between different virus aliquots would have a greater impact on the actual virus dose given which could explain why some control animal survived. Nevertheless, the same two clones that partially protected BALB/c mice, also partially protected C57BL/6 mice above control levels (Fig. 23B) and partial protection was also observed with clone 5E2 which induced a slight delay of mortality of BALB/c mice (Fig. 23A).

DISCUSSION

We have used a library of human scFv fragments displayed on the surface of filamentous phage particles built from a bank of 50 cloned human V_H gene segments and random nucleotide sequences encoding CDR3 lengths of 4 to 12 residues (Nissim *et al.*, 1994). This library contains more than 10^8 clones of different specificities, which is comparable to the size of the natural primary immunoglobulin repertoire of the mouse (Griffiths *et al.*, 1994).

The phage display library was subjected to five rounds of selection by panning against three neutralizing anti-MHV-A59 mAbs and antibody-specific phage clones were identified by ELISA for all three antibodies (Fig. 22). Some of these clones showed cross-reactivity with the other two mAbs used for selection, suggesting that they recognize similar structures on different antibody molecules. This is consistent with the possibility that they could have lower affinities than more specific phages.

Seven clones selected for biological characterization were used to immunize BALB/c and C57BL/6 mice. We have previously shown that BALB/c mice can produce an anti-MHV-A59 protective immune response upon anti-idiotypic vaccination (Lamarre *et al.*, 1991). We also selected C57BL/6 mice because previous immunogenicity experiments of repeat regions of the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* cloned into the pIII gene of a filamentous phage suggested that the pIII protein might not bear helper T cell epitopes recognized on the H-2^d genetic background of the BALB/c mouse but should bear epitopes recognized on the H-2^b genetic background of the

C57BL/10 or C57BL/6 mice (De la Cruz *et al.*, 1988). Two clones induced a partial protection of both strains of mice and clone 5E2 caused a delay in the mortality of BALB/c mice and partially protected the C57BL/6 mice (Fig. 23). Interestingly, four out of the five anti-5B19 clones sequenced had the same V_H segment as clone 5D5 and three of them had the same CDR3 sequence (Table VII). This V_H usage could possibly produce an antibody fragment with a higher affinity for mAb 5B19 since clones bearing this V_H segment were more frequently isolated from the library. Thus, it is likely that this particular clone partially protected both strains of mice as a result of a higher affinity for the antibody.

We postulate that the recombinant anti-idiotypic antibodies isolated from this small phage library were probably of relatively low affinity and thus did not induce a neutralizing antiviral immune response sufficiently strong to be detected and to completely protect vaccinated animals. Indeed, it has been reported (Griffiths *et al.*, 1994) that the affinities of Fab fragments expressed on phages isolated from a small portion (10^7) of a larger library (6.5×10^{10}) were lower (0.8 to 12 μM) compared to the clones isolated from the entire library (3.8 to 217 nM).

Antigen mimicry at the primary structure level has been proposed as a possible mechanism for the induction of an antigen-specific immune response by anti-idiotypic antibodies. The observation of an homology between a monoclonal anti-idiotypic antibody and the hemagglutinin of the mammalian reovirus type 3 reinforced this hypothesis (Bruck *et al.*, 1986). To verify if a similar structural mimicry could explain the partial virus protection observed,

amino acid sequence comparisons between the heavy chain variable region of the selected clones and the S glycoprotein of MHV-A59 were undertaken. No significant regions of amino acid sequence homology were identified for any of the selected clones, indicating that the observed protection was not achieved through primary structure mimicry but may be the result of a conformational or functional mimicry. These findings with monoclonal anti-Ids phages corroborate the results we previously reported with polyclonal rabbit anti-Ids, using binding assays (Lamarre *et al.*, 1991) as they both induced a protective immune response without any apparent antigenic mimicry. This emphasizes the complexity of the idiotypic network and the need to understand molecular and cellular mechanisms involved in the modulation of immune responses in the absence of primary structural homologies. The present study demonstrates the feasibility of isolating monoclonal anti-idiotypic antibody fragments from phage-display libraries that can induce partial protection of mice from coronavirus infection even without evident sequence homology with the S glycoprotein of MHV-A59.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Grant MT-9203 from the Medical Research Council of Canada (MRCC) which also provided studentship support to A. Lamarre. P. Talbot acknowledges senior scholarship support from *the Fonds de la recherche en santé du Québec*. The authors are grateful to Dr. Greg Winter (Cambridge, U. K.) for providing the phage-display library used in this study.

TABLE VII
*CDR3 sequences and V_H segments of the selected anti-idiotypic clones
 isolated from the phage-display library*

Clones	Specificity	CDR3 Sequences	V _H Segment ¹
7G9	7-10A	GKLVK	DP47
7D11	7-10A	MKANGRYD	DP44-45
7H9	7-10A	YIDVPPFFYESPR	DP38
5E2	5B19	VMKGKGTI	DP25
5B5	5B19	NKGNSNQL	DP32
5D5	5B19	YYAVRPIMN	DP32
4F4	4-11G	ETCDGVHL	DP54

¹ Nomenclature of heavy chain germline segments as in Tomlinson *et al.* (1992).

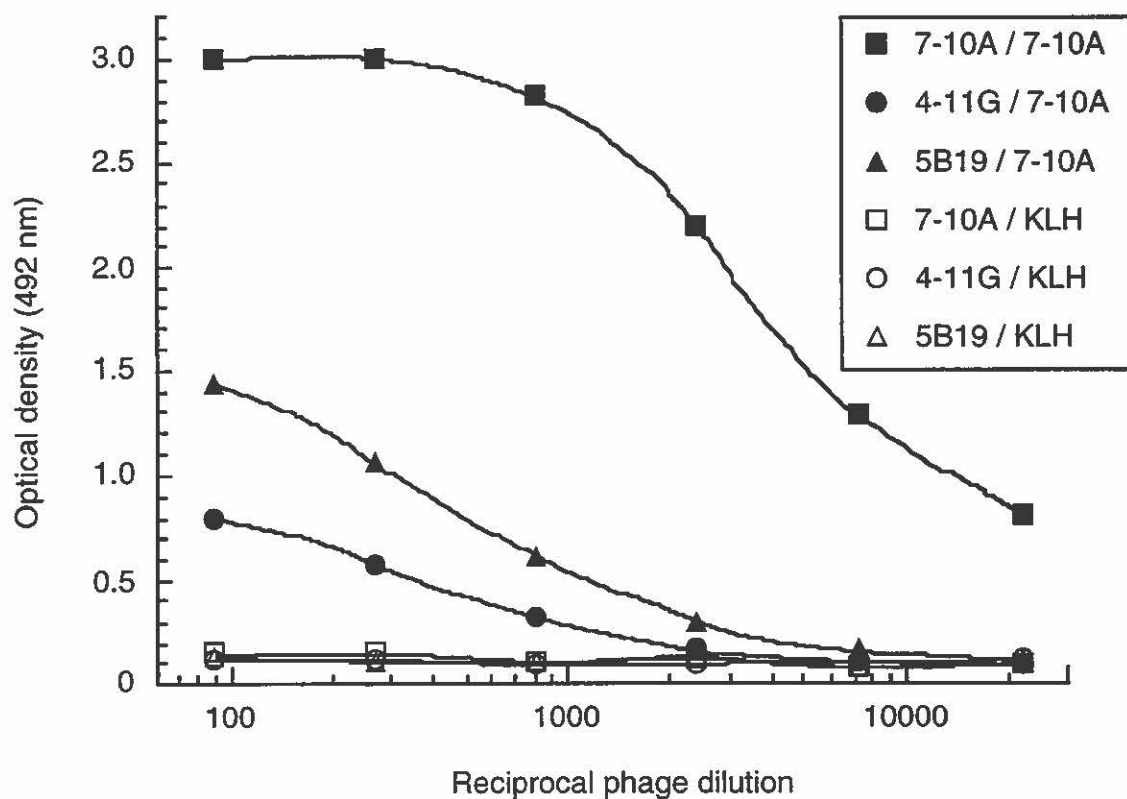


FIGURE 21: Binding of polyclonal phage populations to mAb 7-10A or to KLH.

Microtiter plates were coated with 1 μg /well of mAb 7-10A (filled symbols) or KLH (open symbols). The binding of 3-fold dilutions of polyclonal phage populations after 5 rounds of selection for mAb 7-10A (■), 4-11G (●) or 5B19 (▲) was detected using horseradish peroxidase-labeled anti-M13 antibodies.

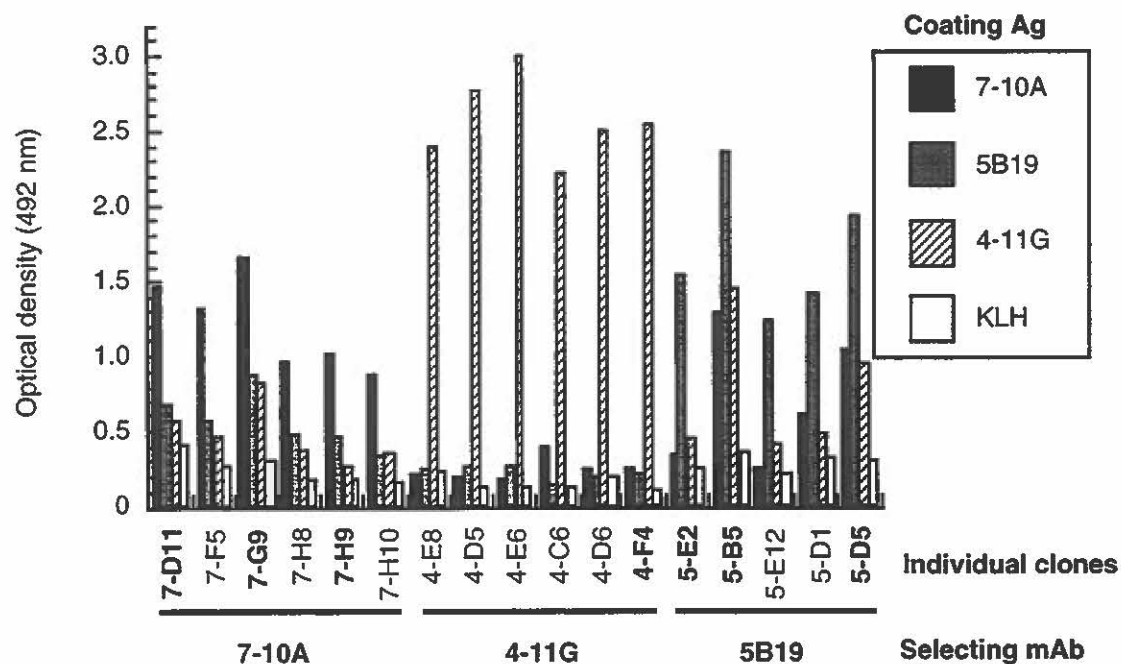


FIGURE 22: Binding of individual phage clones after five rounds of selection for either one of three antiviral mAbs.

Microtiter plates were coated with 1 μg /well of mAb 7-10A, 4-11G, 5B19 or an irrelevant Ag (KLH) and the binding of individual clones selected by five rounds of panning against either one of the three antibodies was detected using horseradish peroxidase-labeled anti-M13 antibodies. Individual clones shown in bold represent phages that were selected for *in vivo* characterization.

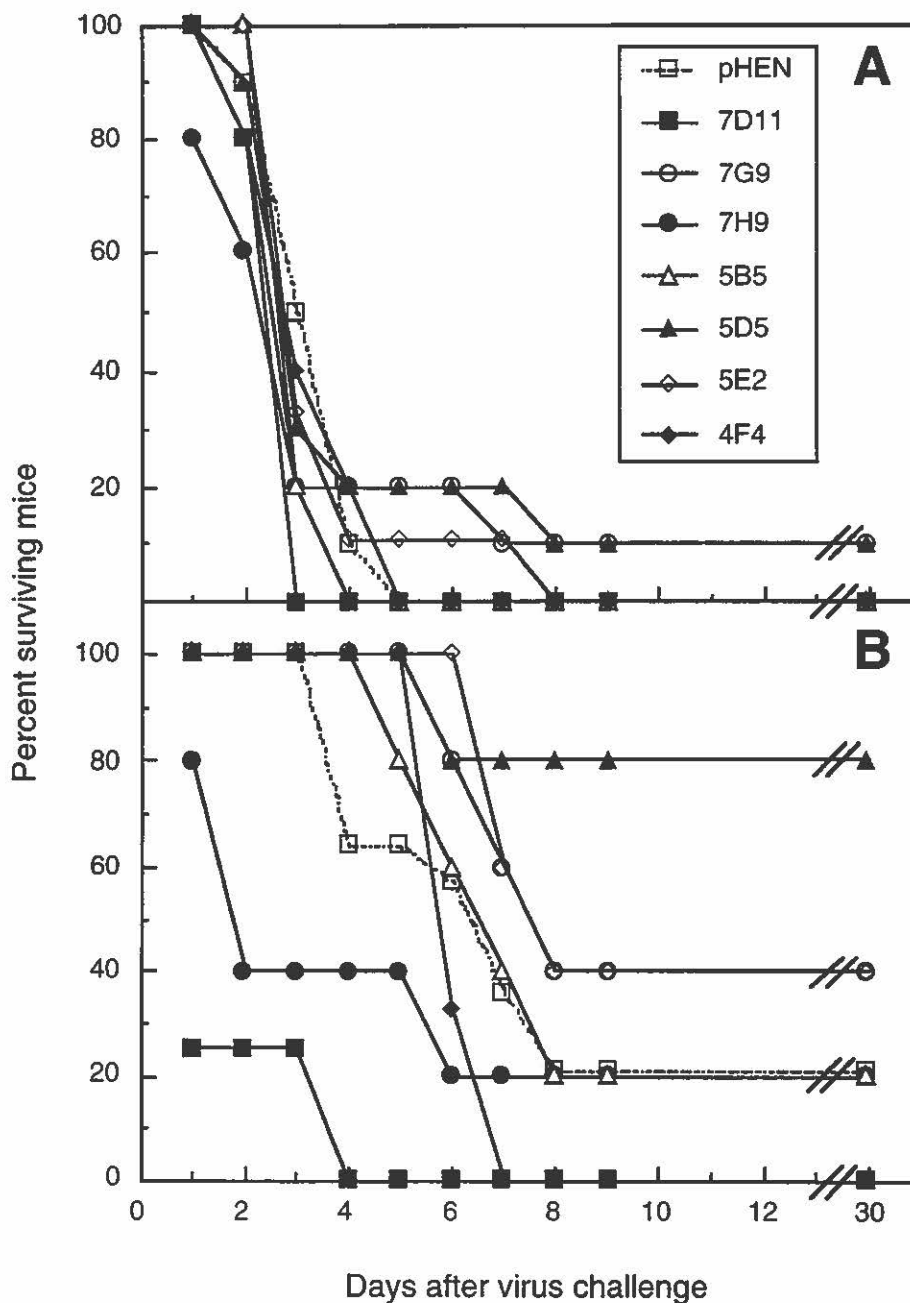


FIGURE 23: Partial protection from MHV-A59 infection of BALB/c or C57BL/6 mice vaccinated with anti-idiotypic antibody fragments displayed on phage surface.

Groups of 5 to 14 BALB/c (A) or C57BL/6 (B) mice were immunized with phages expressing anti-idiotypic antibody fragments selected from the phage-display library by five rounds of panning against one of three different anti-MHV-A59 monoclonal antibodies and challenged with 10 LD_{50} of MHV-A59. Clone pHEN (\square) represents the wild type phage used as a negative control.

DISCUSSION

1. PROTECTION CONTRE L'INFECTION CORONAVIRALE SUITE À L'ADMINISTRATION DE FRAGMENTS D'ANTICORPS

Le premier objectif de ce projet de doctorat visait la caractérisation des mécanismes employés par l'hôte pour se protéger contre l'infection par le coronavirus murin, en faisant l'analyse des capacités neutralisante et protectrice des fragments $F(ab')_2$ et Fab d'un anticorps anti-MHV-A59. Deux approches distinctes ont été suivies pour réaliser cet objectif. En premier lieu, des fragments $F(ab')_2$ et Fab ont été obtenus par digestion enzymatique de l'anticorps monoclonal 7-10A, et leur capacité de neutralisation et de protection a été étudiée. Deuxièmement, un anticorps recombinant à chaîne unique (scFv) a été construit et exprimé chez *Escherichia coli*, et ses propriétés biologiques comparées à celles des fragments Fab de l'anticorps parental.

1.1. ÉTUDE DES MÉCANISMES DE PROTECTION CONTRE L'INFECTION CORONAVIRALE À L'AIDE DE FRAGMENTS $F(ab')_2$ ET Fab

Bien peu de données sont disponibles concernant les mécanismes précis employés par l'hôte pour se défendre contre le coronavirus. Toutefois, les anticorps semblent y jouer un rôle déterminant puisque le simple transfert passif d'anticorps monoclonaux spécifiques aux quatre protéines majeures des coronavirus protège les souris contre l'infection virale (Buchmeier *et al.*, 1984, Lecomte *et al.*, 1987, Fleming *et al.*, 1989, Daniel et Talbot, 1990, et Yokomori *et al.*, 1992). Les mécanismes de neutralisation utilisés par les

anticorps sont multiples (Dimmock, 1993). Le mécanisme précis de neutralisation utilisé par un anticorps déterminera si ses fragments auront également cette capacité. En effet, si un anticorps fait appel au système du complément ou à l'ADCC pour neutraliser un virus, les fragments $F(ab')_2$ et Fab ne pourront posséder cette capacité puisque le fragment Fc, participant à ces deux mécanismes, est absent chez ces fragments. L'étude des propriétés neutralisantes et protectrices de fragments d'anticorps peut donc apporter de précieuses informations quant aux mécanismes d'action utilisés par l'anticorps complet, et apporte par le fait même, des informations supplémentaires sur les mécanismes de défense de l'hôte. De plus, le rôle du fragment Fc et de la bivalence des immunoglobulines dans la protection contre l'infection par le coronavirus n'a jamais été clairement étudié.

L'anticorps monoclonal 7-10A a été utilisé tout au long de ce projet de doctorat comme modèle de la réponse immunitaire humorale chez la souris. La digestion de cet anticorps par la pepsine et la papaïne a permis d'obtenir des fragments $F(ab')_2$ et Fab ayant un degré de pureté de plus de 90 % (Fig. 1), et ayant conservé la capacité de lier l'antigène viral ou des anticorps anti-idiotypiques (Fig. 2). Des tests de protection par transfert passif de ces fragments ont été effectués et ont révélé que chacun d'eux a la capacité de protéger la souris contre l'infection virale mais toutefois à des degrés différents (Figs. 6 et 7). En effet, l'anticorps complet et les fragments $F(ab')_2$ ont sensiblement la même capacité protectrice alors qu'une quantité dix fois supérieure de fragments Fab est nécessaire pour observer le même degré de protection (Fig. 7). Le plus faible taux de protection conféré par les fragments Fab, comparativement à l'anticorps complet ou aux fragments $F(ab')_2$, se

reflète également au niveau des titres viraux retrouvés dans le cerveau et le foie des souris traitées (Tableau IV). En effet, bien peu de particules virales infectieuses ont pu être détectées dans le foie et le cerveau des souris ayant reçu 500 μg d'anticorps complets ou de fragments $F(ab')_2$, alors que des titres viraux modérés mais statistiquement réduits comparativement aux animaux non-traités, ont été détectés dans le cerveau des souris traitées avec les fragments Fab. Il est intéressant de constater que les titres viraux dans le foie des animaux traités étaient toujours très faibles suggérant que le transfert passif d'anticorps a pu réduire la propagation de l'infection virale du cerveau vers le foie, ce qui a probablement contribué à la protection observée. Toutefois, l'écart observé entre le niveau de protection conféré par les fragments $F(ab')_2$ et Fab ne peut s'expliquer par une dégradation accélérée des fragments Fab puisque les deux fragments ont des courbes de dégradation *in vivo* et des demi-vies similaires (Fig. 5 et Tableau III).

La différence observée entre les fragments au niveau de la protection se retrouve aussi dans leur capacité à neutraliser l'infection virale *in vitro* (Tableau II). La quantité de fragments $F(ab')_2$ nécessaire pour neutraliser 50% de l'inoculum viral est en effet similaire à celle requise pour l'anticorps complet, n'étant que trois fois supérieure lorsque leur concentration molaire est comparée. Les fragments Fab quant à eux, nécessitent environ 200 fois plus de molécules pour avoir la même capacité neutralisante que l'anticorps complet. La simple constatation de la capacité protectrice des fragments $F(ab')_2$ élimine, par le fait même, les phénomènes de lyse dépendante du complément et d'ADCC comme mécanismes d'action potentiels de l'anticorps complet puisque le fragment Fc, qui joue un rôle prédominant dans ces deux

modes de neutralisation, est absent chez ce fragment. De façon similaire, la bivalence ne peut donc pas être une condition essentielle à la protection ou à la neutralisation, puisque des fragments monovalents Fab possèdent ces deux activités. Dès lors, il est peu probable que l'agrégation virale représente un mécanisme important dans la neutralisation *in vitro* et *in vivo* du coronavirus MHV-A59, puisqu'on considère généralement que les fragments monovalents sont dépourvus de cette capacité. Toutefois, la bivalence influence l'avidité de l'anticorps pour le virus et, par conséquent, peut avoir un impact direct sur son efficacité de protection et de neutralisation. Une plus faible affinité des fragments Fab pour un anticorps anti-idiotypique spécifique à l'anticorps 7-10A a justement été constatée par résonance plasmonique de surface (Fig. 4 et Tableau I). Tout porte à croire que les fragments Fab devraient également montrer une réduction de l'avidité pour l'antigène viral, puisque ces fragments ont une plus faible capacité d'inhiber l'attachement de l'anticorps complet au virus que les fragments $F(ab')_2$ ce qui témoigne d'une moins grande avidité (Fig. 3). De plus, l'addition d'antisérum anti-Fab lors des tests de neutralisation a fait augmenter le titre neutralisant des fragments Fab à un niveau comparable à celui observé pour les fragments $F(ab')_2$ et ce, en faisant possiblement un pont entre deux fragments monovalents, recréant ainsi une bivalence artificielle qui a probablement augmenté leur avidité pour l'antigène (Tableau II).

Nous avons décrit le premier exemple de protection contre une infection virale par transfert passif de fragments Fab, ce qui pourrait servir de modèle pour leur utilisation dans le traitement de maladies virales d'importance humaine ou animale. Cependant, le mécanisme précis employé par

l'anticorps 7-10A pour neutraliser l'infection par le coronavirus murin MHV-A59 n'est toujours pas connu mais les expériences décrites dans l'article 1 ont permis d'éliminer plusieurs modes d'action potentiels de cet anticorps, ce qui devrait faciliter son élucidation éventuelle. Par ailleurs, il est intéressant de spéculer davantage sur ces mécanismes potentiels. Tout d'abord, des résultats préliminaires semblent indiquer que l'inhibition de l'attachement du virus à son récepteur cellulaire ne serait pas impliqué dans le mode d'action de l'anticorps 7-10A (A. Lamarre et Y. Salvas, résultats non publiés). De plus, l'anticorps 7-10A conserve sa capacité de neutraliser l'infection virale même après l'attachement du virus à la cellule cible (Y. Salvas, résultats non publiés) Cet anticorps semble donc agir suite à l'attachement viral et par conséquent, doit inhiber une étape plus tardive du cycle de réplication, comme la fusion avec les membranes endosomales ou la décapsidation virale. L'observation d'une augmentation de réactivité entre l'anticorps 7-10A et le virus produit à un pH légèrement acide (6,0) vient appuyer cette hypothèse (Daniel *et al.*, 1994). En effet, il est tentant de spéculer qu'un changement conformationnel de la glycoprotéine S du coronavirus dans l'environnement légèrement acide de l'endosome serait nécessaire pour qu'il y ait fusion entre les enveloppes virales et endosomales. Ce changement conformationnel pourrait alors exposer davantage l'épitope reconnu par l'anticorps 7-10A et par conséquent augmenter sa réactivité. La présence de l'anticorps fixé à la glycoprotéine S à l'intérieur même de l'endosome pourrait alors empêcher la fusion de se produire et inhiber de ce fait l'infection virale.

1.2. CONSTRUCTION ET EXPRESSION CHEZ *E. COLI* D'UN ANTICORPS RECOMBINANT À CHAÎNE UNIQUE (scFv) ET ÉVALUATION DE SES PROPRIÉTÉS PROTECTRICES

L'utilisation d'anticorps monoclonaux murins pour l'immunothérapie d'infections virales humaines, pour lesquelles un vaccin efficace n'est toujours pas disponible, est depuis longtemps considérée. Cependant, leur utilisation a été limitée par les réactions allergiques qu'ils peuvent provoquer (Avner *et al.*, 1991, Mountain et Adair, 1992). Le développement de techniques de génie génétique permettant l'expression de fragments d'anticorps chez la bactérie a fait entrevoir la possibilité d'utiliser ces fragments, moins immunogènes que ceux obtenus par digestion enzymatique, pour l'immunothérapie antivirale. Cependant, leur efficacité à neutraliser une infection virale *in vivo* n'a jamais été testée. Dans le but d'évaluer le potentiel de ces fragments d'anticorps recombinants dans le traitement de maladies virales, un anticorps à chaîne unique (scFv) a été construit à partir des régions variables de l'anticorps monoclonal 7-10A, exprimé chez *E. coli* et sa capacité protectrice évaluée chez la souris.

Les régions variables des chaînes lourdes et légères de l'anticorps monoclonal 7-10A ont été amplifiées et assemblées par PCR (Fig. 8) et clonées sous forme de scFv dans le vecteur d'expression procaryotique pET-16b. La protéine recombinante de 32 kDa a été purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel-agarose (Fig. 10). Le scFv purifié a démontré les mêmes propriétés de liaison de l'antigène que les fragments Fab de l'anticorps 7-10A (Fig. 2 et 11) et a même pu inhiber la liaison de l'anticorps complet à l'antigène plus fortement que ceux-ci

suggérant une plus haute affinité (Fig. 3 et 12). De plus, la capacité de neutralisation du scFv purifié était 10 fois supérieure à celle observée pour les fragments Fab de l'anticorps parental (Tableau II).

Malgré une affinité apparemment supérieure et une activité neutralisante plus grande que les fragments Fab, une dose de 500 µg de scFv n'a pu protéger les animaux ayant reçu le scFv purifié (Fig. 13). Cette dose est pourtant suffisante pour protéger 50% des souris traitées avec les fragments Fab (Fig. 7), Par contre, un léger délai dans la mortalité des souris traitées avec le scFv comparativement aux animaux témoins a été observé, ce qui témoigne d'une certaine activité antivirale du scFv. La nette différence entre la capacité protectrice des Fab et celle des scFv est probablement le résultat d'une dégradation *in vivo* plus rapide des scFv. En effet, la dégradation rapide des scFv dans le sang est bien documentée avec une demi-vie variant de 2,4 à 32 minutes (Colcher *et al.*, 1990, Laroche *et al.*, 1991, Friedman *et al.*, 1993, Reiter *et al.*, 1994) comparativement à 5,5 heures pour le fragment Fab de l'anticorps 7-10A (Tableau III). La courte demi-vie des scFv rend peu envisageable l'utilisation de ces fragments d'anticorps recombinants pour le traitement de maladies virales, à moins qu'il ne soit possible de les modifier pour augmenter leur stabilité *in vivo*, en identifiant précisément la région du fragment Fc responsable de la longue demi-vie des anticorps complet, et en la fusionnant au scFv. De façon alternative, l'expression constitutive de grandes quantités de scFv chez des animaux transgéniques pourrait contourner le problème de leur dégradation rapide. Cependant, d'autres applications cliniques des scFv, comme le dépistage de tumeurs cancéreuses avec des fragments d'anticorps radiomarqués ou leur traitement à l'aide

d'immunotoxines, pourraient bénéficier d'une dégradation tissulaire rapide. En effet, la persistance de ces composés nocifs dans l'organisme pourrait entraîner, chez les patients, des complications plus sévères que les bienfaits escomptés.

2. INDUCTION D'UNE RÉPONSE IMMUNITAIRE PROTECTRICE CONTRE LE CORONAVIRUS MURIN PAR VACCINATION ANTI-IDIOTYPIQUE

Le second objectif de ce projet de doctorat demandait de faire l'isolement d'anticorps anti-idiotypiques spécifiques à un anticorps anti-MHV-A59 et d'analyser leurs propriétés vaccinales contre l'infection coronavirale. Encore une fois, deux approches différentes ont été utilisées, la production d'anticorps anti-idiotypiques polyclonaux chez le lapin et l'isolement d'anticorps anti-idiotypiques monoclonaux à partir d'une banque de phages filamenteux exprimant des scFv à leur surface.

2.1. PRODUCTION ET CARACTÉRISATION D'ANTICORPS ANTI-IDIOTYPIQUES POLYCLONAUX

Des lapins ont été immunisés avec l'anticorps monoclonal 7-10A dont les caractéristiques ont fait l'objet d'une description approfondie à la section précédente. Après vérification de la présence d'anticorps anti-idiotypiques dans le sérum de lapin (Fig. 14A), ceux-ci ont été purifiés par chromatographie d'affinité. La spécificité des anticorps anti-idiotypiques purifiés a été confirmée par double immunodiffusion et par ELISA. En effet, aucune réactivité n'a été observée avec un anticorps témoin de même isotype que l'anticorps 7-10A, alors qu'une forte réaction pour celui-ci a été notée

(Fig. 14C et 15). Les anticorps anti-idiotypiques purifiés avaient également la capacité d'inhiber l'attachement de l'anticorps 7-10A à l'antigène (Fig. 18), et de réduire fortement sa capacité de neutralisation virale (Tableau V). Ces propriétés suggèrent que ces anticorps anti-idiotypiques reconnaissent des épitopes idiotypiques (idiotopes) qui sont localisés à l'intérieur ou à proximité du site de liaison de l'antigène (paratope). Par définition, les anticorps anti-idiotypiques qui ont cette capacité, appartiennent à la catégorie des anticorps de type β ou γ . Les anticorps de type β ou "image interne", miment la structure tridimensionnelle de l'épitope reconnu par l'anticorps qui a servi à induire la production d'anti-idiotypes, alors que les anticorps de type γ ne possèdent pas cette propriété (Bona et Kohler, 1984). Une des façons de faire la distinction entre ces deux catégories d'anticorps anti-idiotypiques, est de vérifier leur capacité à détecter la présence de l'idiotype dans des sérums xénogéniques spécifiques à l'antigène initial (Zhou *et al.*, 1990). La figure 16 montre que les anticorps anti-idiotypiques purifiés n'ont pas réagit spécifiquement avec des sérums anti-MHV-A59 produits chez le rat et le lapin alors qu'une faible réaction a été observée avec le sérum antiviral de différentes lignés de souris. Par ailleurs, nous avons également vérifié si l'idiotype pouvait être détecté sur d'autres anticorps anti-MHV-A59 de même isotype que 7-10A (Fig. 17). Une réaction spécifique et reproductible a été observée avec l'anticorps 4-11G suggérant le partage de certains idiotopes entre ces deux anticorps. Il a été démontré par test ELISA de compétition que les épitopes reconnus par les anticorps 7-10A et 4-11G se chevauchent (Daniel et Talbot, 1990). Nous postulons que les idiotopes partagés entre ces deux anticorps sont nécessaires à la reconnaissance de déterminants

antigéniques communs aux deux épitopes. Les résultats présentés à la figure 16 nous portent donc à croire que les anticorps anti-idiotypiques produits dans cette étude seraient de la catégorie des anticorps γ plutôt que β , quoiqu'il nous est impossible avec ce réactif polyclonal, d'exclure la possibilité de la présence d'une faible quantité d'anticorps anti-idiotypiques β .

L'injection d'anticorps anti-idiotypiques purifiés à des souris BALB/c a induit la production d'anticorps spécifiques au coronavirus murin MHV-A59 tels que détectés par ELISA (Fig. 19). De plus, le sérum des souris immunisées avait la capacité de neutraliser l'infection virale *in vitro* avec un titre atteignant presque celui du sérum de souris hyperimmunisées avec le virus (Tableau VI). Finalement, en moyenne 90% des souris vaccinées avec les anticorps anti-idiotypiques ont survécu à une épreuve virale avec 10 DL₅₀ de virus infectieux alors que toutes les souris témoins, ayant reçues des immunoglobulines normales de lapin, sont mortes des suites de l'infection (Fig. 20).

Depuis la publication de notre étude en 1991, peu de groupes ont rapporté l'induction d'une immunité protectrice par vaccination anti-idiotypique. Le groupe de Tsuda *et al.* a cependant observé le développement d'une immunité protectrice contre le virus de la pseudorange suite à l'immunisation de souris avec un anticorps anti-idiotypique polyclonal produit chez le lapin (Tsuda *et al.*, 1992). Une autre équipe a rapporté la protection partielle de poussins vaccinés avec des anticorps anti-idiotypiques xénogéniques produits chez le lapin et la chèvre contre le virus de la maladie de Marek (Dandapat *et al.*, 1994). Finalement, des anticorps anti-idiotypiques

de lapin dirigés contre divers anticorps neutralisants spécifiques au virus de l'herpès bovin, ont pu inhiber l'infection de cellules MDBK par le virus suggérant qu'ils reconnaissent une protéine cellulaire essentielle pour l'infection virale (AbdelMagid *et al.*, 1992).

Notre étude représente donc l'une des rares démonstrations de l'induction d'une réponse immunitaire spécifique à un antigène suite à une vaccination avec des anticorps anti-idiotypiques, n'étant apparemment pas une représentation structurelle de cet antigène (Sacks et Sher, 1983, Erit et Finberg, 1984, et Zhou *et al.*, 1990). En effet, plusieurs Ac2 γ ne possèdent pas cette capacité. A titre d'exemples, un Ac2 γ produit contre l'anticorps 4-11G, dont l'épitope semble pourtant chevaucher celui de 7-10A (Daniel et Talbot, 1990), n'a pu protéger des souris contre l'infection par le MHV-A59 (Yu et Talbot, 1995). Similairement, sept anticorps anti-idiotypiques monoclonaux classifiés d'Ac2 γ et dirigés contre un anticorps neutralisant spécifique au virus de l'encéphalite "tick-borne", n'ont pu induire la production d'Ac3 ou protéger des souris contre l'infection, démontrant la rareté de telles observations (Kopecky *et al.*, 1995). Les mécanismes impliqués dans l'induction, par certains Ac2 γ , d'une réponse immunitaire spécifique à l'antigène, sont encore mal connus. Il a cependant été suggéré que la liaison d'anti-idiotypes, même ceux ne mimant pas l'antigène, sur les anticorps de surface de clones de cellules B silencieux, pourrait activer leur prolifération et induire la production d'anticorps spécifiques à l'antigène, qui sont normalement absents de la réponse immunitaire induite par l'antigène lui-même (Zhou *et al.*, 1990). La protection de souris de différentes lignées vaccinées avec l'anticorps anti-

idiotypiques anti-7-10A semble justement corrélérer avec la présence d'Ac3 neutralisants (Yu *et al.*, 1996). De plus, la protection n'est pas restreinte à l'haplotype H-2^d de la souris BALB/c mais s'observe également chez les souris DBA/1 et SWR toutes deux d'haplotype H-2^q. Cependant, l'élément majeur responsable de la protection de ces souris semble être situé à l'extérieur du complexe majeur d'histocompatibilité (Yu *et al.*, 1996).

Une autre façon d'expliquer comment un anticorps anti-idiotypique pourrait induire une réponse d'Ac3 sans mimer l'antigène serait par le biais de l'expression d'idiotopes récurrents présents sur une famille d'anticorps spécifique à cet antigène. En effet, dans le cas où le même idiotope se retrouve sur divers anticorps spécifiques pour le même antigène, les anticorps anti-idiotypiques dirigés contre cet idiotope commun pourraient alors induire la production d'anticorps porteurs de cet idiotope et appartenant donc à cette famille d'anticorps de spécificité commune (Rajewsky, 1983). Cependant, on pourrait s'attendre à retrouver cet idiotope sur divers anticorps spécifiques pour l'antigène, ce qui n'est pas le cas dans notre étude. Il semble donc que l'idiotope commun présent sur l'anticorps 7-10A se retrouve faiblement représenté dans la réponse antivirale des souris portant les haplotypes H-2^d et H-2^q et que l'administration d'anticorps anti-idiotypiques spécifiques à cet idiotope chez ces souris, déclenche la production d'une population restreinte d'Ac3 mais présentant une puissante activité antivirale. Des études ultérieures devront donc se concentrer sur l'identification de cet idiotope dans la structure de l'anticorps 7-10A, possiblement en faisant la synthèse de peptides séquencés à partir des diverses régions hypervariables de l'anticorps 7-10A pour tester leur réactivité contre l'anticorps anti-idiotypique.

Suite à l'identification de la séquence de cet idiotope, il serait alors possible de rechercher cette séquence chez divers anticorps anti-MHV-A59 ou dans le répertoire de la souris BALB/c et ainsi identifier les bases moléculaires du mimétisme fonctionnel de l'anticorps anti-idiotypique produit dans cette étude.

Ce travail a donc permis de démontrer la faisabilité d'utiliser les anticorps anti-idiotypiques pour vacciner la souris contre l'infection par le coronavirus murin MHV-A59. Par ailleurs, l'induction d'une réponse immunitaire protectrice avec des anticorps anti-idiotypiques ne mimant pas la structure de l'antigène démontre bien la versatilité du réseau idiotypique. Par contre, une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans ce phénomène sera essentielle avant que l'utilisation d'anticorps anti-idiotypiques pour la prévention de maladies virales humaines puisse être envisagée.

2.2. ISOLEMENT DE FRAGMENTS D'ANTICORPS ANTI-IDIOTYPIQUES EXPRIMÉS À LA SURFACE DE PHAGES FILAMENTEUX

Une banque de phages filamenteux contenant plus de 10^9 phages différents et exprimant à leur surface des scFv humains, a été criblée par adsorption sur trois anticorps neutralisants anti-MHV-A59, dans le but de faire l'isolement d'anticorps anti-idiotypiques recombinants. La procédure de sélection a été validée par un test ELISA qui analysait la liaison, sur divers antigènes, de la population de phages polyclonaux obtenus après cinq rondes de sélections (Fig. 21). Un très fort enrichissement de la population de phages spécifiques pour l'anticorps qui a servi à la sélection a été observé,

alors qu'aucune réactivité n'a pu être démontrée pour le KLH utilisé comme témoin négatif. Cette expérience démontre bien l'efficacité de la technique utilisée pour la sélection. Seulement une faible proportion des phages sélectionnés ont montré une réaction croisée pour les deux autres anticorps anti-MHV-A59, démontrant le nombre restreint de phages reconnaissant des déterminants isotypiques ou allotypiques communs aux trois anticorps. Par la suite, des clones isolés après cinq rondes de criblage ont été testés par ELISA pour leur capacité de lier l'anticorps utilisé pour la sélection (Fig. 22). Entre 32 et 84 % de tous les clones analysés ont montré une réaction positive par ELISA. La séquence nucléotidique de la région variable de la chaîne lourde des clones ayant démontré la plus grande réactivité a été déterminée. Plusieurs des clones sélectionnés ont montré une séquence nucléotidique identique tant au niveau du segment V_H que de la boucle hypervariable 3 (CDR3) (Tableau VII). En effet, trois des six clones anti-7-10A séquencés étaient identiques au clone 7H9 et quatre des cinq clones anti-5B19 avaient le même segment V_H que le clone 5D5 alors qu'un seul d'entre eux avait un CDR3 différent. Finalement les six clones anti-4-11G séquencés étaient identiques.

Les sept clones ayant présenté des séquences variables distinctes ont été injectés à des souris BALB/c et C57BL/6. La souris BALB/c a été utilisée parce que nous avons démontré qu'elle pouvait être protégée contre le MHV-A59 par vaccination anti-idiotypique (Lamarre *et al.*, 1991). Quant à elle, la C57BL/6 a été choisie parce qu'une étude a suggéré que l'haplotype H-2^b de la C57BL/6 serait en mesure de reconnaître des épitopes T présents sur la protéine mineure de la capsid du phage filamenteux, sur laquelle sont

fusionnés les scFv, alors que l'haplotype H-2^d de la BALB/c ne le serait pas (De la Cruz *et al.*, 1988). La présence d'anticorps antiviraux ou neutralisants n'a pu être mise en évidence dans le sérum des souris immunisées avec les différents clones. Une protection partielle des deux lignées de souris a cependant été observée avec les clones 7G9 et 5D5 alors que le clone 5E2 a provoqué un délai dans la mortalité des souris BALB/c et a partiellement protégé les souris C57BL/6 (Fig. 23).

Le mimétisme moléculaire, au niveau de la séquence primaire en acides aminés, a été proposé comme mécanisme pouvant expliquer l'induction d'une réponse immunitaire spécifique à un antigène suite à l'administration d'anticorps anti-idiotypiques. La découverte d'une homologie entre un anticorps monoclonal anti-idiotypique et l'hémagglutinine du réovirus de type 3, vient renforcer cette hypothèse (Bruck *et al.*, 1986). Dans le but de vérifier si un tel mimétisme pourrait expliquer la protection partielle observée avec certains clones, une comparaison de la séquence en acides aminés de la région variable de la chaîne lourde des différents clones sélectionnés, et celle de la glycoprotéine de surface (S) du coronavirus MHV-A59, a été effectuée. Aucune homologie significative n'a été retrouvée, indiquant que la protection observée n'est pas le résultat d'un mimétisme au niveau de la structure primaire mais possiblement au niveau structurel ou fonctionnel. Ces résultats sont en accord avec les conclusions tirées à la section précédente, avec les anticorps anti-idiotypiques polyclonaux, et suggèrent que le mimétisme antigénique de la glycoprotéine S du MHV-A59 n'est pas essentiel pour induire une protection contre l'infection virale par vaccination anti-idiotypique

mais qu'elle serait plutôt le résultat de l'expression récurrente de l'idiotope 7-10A chez une population restreinte d'anticorps anti-MHV-A59.

Comme quatre des cinq clones anti-5B19 séquencés avaient un segment V_H identique au clone 5D5 et trois le même CDR3 (Tableau VII), il est probable que l'affinité de ce clone soit supérieure à celle des autres clones spécifiques à 5B19 de la banque, ce qui pourrait expliquer qu'il est été isolé plus fréquemment. La protection partielle des deux lignées de souris, observée avec ce clone, serait possiblement due à une plus grande affinité pour l'anticorps 5B19. L'affinité moyenne des phages isolés à partir de cette banque de taille réduite devait cependant être relativement faible, comme il a été démontré pour une banque de taille similaire (Griffiths *et al.*, 1994). Le développement de banque de phages ayant une plus grande diversité sera sans doute nécessaire, avant que l'isolement d'anticorps anti-idiotypiques de haute affinité et ayant de fortes propriétés vaccinales, puisse se faire. Néanmoins, cette étude démontre la faisabilité d'isoler des anticorps anti-idiotypiques à partir de banques de phages filamenteux, qui pourront éventuellement remplacer la technique conventionnelle de fusion cellulaire.

CONCLUSION

Nous avons démontré que les fragments $F(ab')_2$ et Fab de l'anticorps monoclonal 7-10A ont la capacité de neutraliser le coronavirus murin MHV-A59 et de protéger la souris contre l'infection virale. Par ailleurs, un scFv produit chez *E. coli* a pu neutraliser le MHV-A59, mais n'a pas protégé les souris contre l'infection virale et ce, probablement en raison d'une demi-vie trop courte. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent des mécanismes de neutralisation et de protection indépendants du fragment Fc et de la bivalence des immunoglobulines, éliminant ainsi la lyse dépendante du complément, l'ADCC et l'agrégation virale comme modes d'action potentiels de l'anticorps 7-10A. Les résultats obtenus lors de ce projet de doctorat contribuent donc à l'avancement des connaissances sur les mécanismes de protections contre les infections virales en apportant le premier exemple de protection par transfert passif de fragments monovalents d'anticorps. Ces résultats font entrevoir un avenir prometteur pour l'utilisation de ces fragments en immunothérapie antivirale alors qu'au contraire, elle suggère que la courte demi-vie des scFv limitera probablement leur utilisation pour cette application. Des travaux supplémentaires sur le processus de dégradation tissulaire des fragments d'anticorps recombinants, et sur les approches potentielles pouvant augmenter leur demi-vie *in vivo* seront nécessaire avant que leur utilisation en immunothérapie antivirale puisse se faire. Les recherches futures dans ce domaine devront donc porter sur l'identification de séquences sur l'immunoglobuline complète qui contribuent à sa stabilité tissulaire, et sur les façons d'introduire ces séquences sur les fragments d'anticorps recombinants.

Nous avons également démontré le potentiel vaccinal des anticorps anti-idiotypiques contre l'infection par le coronavirus murin MHV-A59 et ce, par deux approches différentes. Dans un premier temps, des anticorps anti-idiotypiques polyclonaux ont pu complètement protéger la souris contre l'infection virale en absence de mimétisme de l'antigène viral. Alternativement, des fragments anti-idiotypiques monoclonaux recombinants, exprimés à la surface de phages filamenteux, et isolés à partir d'une banque de phages ont induit, chez la souris, une protection partielle contre l'infection virale. Aucune homologie entre la séquence en acides aminés de la région variable de la chaîne lourde des clones anti-idiotypiques obtenus, et celle de la glycoprotéine de surface du coronavirus murin MHV-A59, n'a pu être mise en évidence. Dans l'ensemble, ces résultats démontrent les propriétés vaccinales des anticorps anti-idiotypiques contre l'infection par le MHV-A59, et ce, sans mimétisme structurel apparent de l'antigène viral, et témoignent de la complexité du réseau idiotypique. En ce sens, l'élucidation des mécanismes de protection contre l'infection virale par des anticorps anti-idiotypiques ne mimant pas l'antigène sera de la plus grande importance. Les anticorps produits lors de ce projet pourront donc, lors de travaux futurs, servir de modèle pour fixer les bases structurelles et fonctionnelles de l'activité de cette catégorie d'anticorps dont le potentiel vaccinal est encore sous-estimé.

REMERCIEMENTS

En premier lieu, j'aimerais adresser mes sincères remerciements au docteur Pierre Talbot pour avoir accepté la direction de mes études de maîtrise et de doctorat et pour avoir toujours montré une disponibilité et une efficacité remarquable. Je désire aussi remercier le docteur Jacqueline Lecomte pour avoir accepté de co-diriger mes travaux de maîtrise.

Je remercie également tous les membres présents et passés du laboratoire du Dr. Talbot, avec qui j'ai toujours eu d'amicales et stimulantes interactions et plus particulièrement, madame Francine Lambert, qui m'a apporté une aide technique occasionnelle grandement appréciée.

Un merci particulier va à mes parents et à ma soeur pour leurs encouragements fréquents et constants, même et surtout pendant les moments plus difficiles.

Un grand merci à tous les amis, trop nombreux pour les nommer, que j'ai eu la chance de rencontrer durant mon séjour à l'Institut. Sans eux, le temps m'aurait sans doute semblé beaucoup plus long.

Enfin, je remercie l'Institut Armand-Frappier, le Fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche et le Conseil de recherches médicales du Canada pour m'avoir octroyé des bourses d'études pour la maîtrise et le doctorat.

RÉFÉRENCES

ABDELMAGID, O. Y., D. J. ORTEN, W. XUE, F. BLECHA, et H. C. MINOCHA. 1992. Anti-idiotypic antibodies to bovine herpesvirus-1 inhibit virus infection in cell cultures. *Arch. Virol.* **122**: 163-173.

ANDERS, E. M, G. P. KAPAKLIS-DELIYANNIS, et D. O. WHITE. 1989. Induction of immune response to influenza virus with antiidiotypic antibodies. *J. Virol.* **63**: 2758-2767.

AVNER, B., L. SWINDELL, E. SHARP, S. K. LIAO, J. R. OGDEN, B. P. AVNER, et R. K. OLDHAM. 1991. Evaluation and clinical relevance of patient immune responses to intravenous therapy with murine monoclonal antibodies conjugated to adriamycin. *Mol. Biother.* **3**: 14-21.

BARBAS III, C. F., E. BJÖRLING, F. CHIODI, N. DUNLOP, D. CABABA, T. M. JONES, S. L. ZEBEDEE, M. A. A PERSSON, P. L. NARA, E. NORRBY, et D. R. BURTON. 1992a. Recombinant human Fab fragments neutralize human type 1 immunodeficiency virus *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 9339-9343.

BARBAS III, C. F., J. E. CROWE, JR., D. CABABA, T. M. JONES, S. L. ZEBEDEE, B. R. MURPHY, R. M. CHANOCK, et D. R. BURTON. 1992b. Human monoclonal Fab fragments derived from a combinatorial library bind to respiratory syncytial virus F glycoprotein and neutralize infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 10164-10168.

BENTLEY, G. A., G. BOULOT, M. M. RIOTTOT, et R. J. POLJAK. 1990. Three-dimensional structure of an idiotope-anti-idiotope complex. *Nature* **348**: 254-257.

BERGMANN, C. C., Q. YAO, M. LIN, et S. A. STOHLMAN. 1996. The JHM strain of mouse hepatitis virus induces a spike protein-specific Db-restricted cytotoxic T cell response. *J. Gen. Virol.* **77**: 315-25.

BETTER, M., C. P. CHANG, R. R. ROBINSON, et A. H. HORWITZ. 1988. *Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science* **240**: 1041-1043.

BONA, C., R. HOOGHE, P. A. CAZENAVE, C. LEGUÉRN, et W. E. PAUL. 1979. Cellular basis of regulation of expression of idiotype. II. Immunity to anti-MOPC-460 idiotype antibodies increases the level of anti-trinitrophenyl antibodies bearing 460 idiotypes. *J. Exp. Med.* **149**: 815-823.

BONA, C. A., et H. KOHLER. 1984. Anti-idiotypic antibodies and internal-images. In "Monoclonal and antiidiotypic antibodies: Probes for receptor structure and function". J. C. Venter, C. M. Fraser, et J. Lindstrom, Éd. Alan R. Liss, New York, p. 141-149.

BONAVIA, A., N. ARBOUR' V. W. YONG, et P. J. TALBOT. 1997. Infection of primary cultures of human neural cells by human coronaviruses 229E and OC43. *J. Virol.* **71**: (sous presse).

BRUCK, C., M. S. CO, M. SLAOUI, G. N. GAULTON, T. SMITH, B. N. FIELDS, J. I. MULLINS, et M. I. GREENE. 1986. Nucleic acid sequence of an internal image-bearing monoclonal anti-idiotypic and its comparison to the sequence of the external antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 6578-6582.

BUCHMEIER, M. J., 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. Naturel 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 tissue of two multiple sclerosis patients. *Science* **209**: 933-934.

CASTRO, R. F., et S. PERLMAN. 1995. CD8+ T-cell epitopes within the surface glycoprotein of a neurotropic coronavirus and correlation with pathogenicity. *J. Virol.* **69**: 8127-31.

CAVANAGH, D., D. A. BRIAN, M. A. BRINTON, L. ENJUANES, K. V. HOLMES, M. C. HORZINEK, M. M. C. LAI, H. LAUDE, P. G. W. PLAGEMANN, S. G. SIDDELL, W. J. M. SPAAN, F. TAGUCHI, et P. J. TALBOT. 1995. *Coronaviridae*. In: "Virus taxonomy. classification and nomenclature of viruses. 6th report of the International Commitee on Taxonomy of Viruses". F. A. Murphy, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Marteli, M. A. Mayo, et M. D. Summers (éds.). Springer-Verlag, New York, 407-411.

CHANOCK, R. M., J. E. CROWE JR., B. R. MURPHY, et D. R. BURTON. 1993. Human monoclonal antibody Fab fragments cloned from combinatorial libraries: potential usefulness in prevention and/or treatment of major human viral diseases. *Infect. Agents Dis.* **2**: 118-131.

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.

CHEN, D. S., M. ASANAKA, K. YOKOMORI, F. I. WANG, S. B. HWANG, H. P. LI, et M. M. C. LAI. 1995. A pregnancy-specific glycoprotein is expressed in the brain and serves as a receptor for mouse hepatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 12095-12099.

CHEUNG, S. C., B. DIETZSCHOLD, H. KOPROWSKI, A. L. NOTKINS, et R. F. RANDO. 1992. A recombinant human Fab expressed in *Escherichia coli* neutralizes rabies virus. *J. Virol.* **66**: 6714-6720.

CLACKSON, T., H. R. HOOGENBOOM, A. D. GRIFFITHS, et G. WINTER. 1991. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* **352**: 624-628.

CLEVELAND, W. L., N. H. WASSERMANN, R. SARANGARAJAN, A. S. PENN, et B. F. ERLANGER. 1983. Monoclonal antibodies to the acetylcholine receptor by a normally functioning auto-antiidiotypic mechanism. *Nature* **305**: 56-57.

CO, M. S., G. N. GAULTON, B. N. FIELDS, et M. I. GREENE. 1985. Isolation and biochemical characterization of the mammalian reovirus type 3 cell-surface receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 1494-1498.

COLCHER, D., R. BIRD, M. ROSELLI, K. D. HARDMAN, S. JOHNSON, S. POPE, S. W. DODD, M. W. PANTOLIANO, D. E. MILENIC, et J. SCHLOM. 1990. *In vivo* tumor targeting of a recombinant single-chain antigen-binding protein. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**: 1191-1197.

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.

CONDRA, J. H., V. V. SARDANA, J. E. TOMASSINI, A. J. SCHLABACH, M. -E. DAVIES, D. W. LINEBERGER, D. J. GRAHAM, L. GOTLIB, et R. J. COLONNO. 1990. Bacterial expression of antibody fragments that block human rhinovirus infection of cultured cells. *J. Biol. Chem.* **265**: 2292-2295.

DALES, S. et R. ANDERSON. 1995. Pathogenesis and diseases of the central nervous system caused by murine coronaviruses. *In: The Coronaviridae.* S. G. Siddell, Éd. Plenum press, New York, 257-292.

DANDAPAT, S., H. K. PRADHAN, et G. C. MOHANTY. 1994. Anti-idiotypic antibodies to Marek's disease-associated tumour surface antigen in protection against Marek's disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **40**: 353-366.

DANIEL, C., R. ANDERSON, M. J. BUCHMEIER, J. O. FLEMING, W. J. M. SPAAN, WEGE, H., et P. J. TALBOT. 1993. Identification of an immunodominant linear neutralization domain on the S2 portion of the murine coronavirus spike glycoprotein and evidence that it forms part of a complex tridimensional structure. *J. Virol.* **67**: 1185-1194.

DANIEL, C., A. LAMARRE, et P. J. TALBOT. 1994. Increased viral titers and enhanced reactivity of antibodies to the spike glycoprotein of murine coronavirus produced by infection at pH 6. *J. Virol. Methods* **50**: 237-244.

DANIEL, C., et P. J. TALBOT. 1987. Physico-chemical properties of murine hepatitis virus, strain A 59. *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 LA CRUZ, V. F., A. A. LAL, et T. F. MCCUTCHAN. 1988. Immunogenicity and epitope mapping of foreign sequences via genetically engineered filamentous phage. *J. Biol. Chem.* **263**: 4318-4322.

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.

DICHTER, M. A., H. L. WEINER, B. N. FIELDS, G. MITCHELL, J. NOSEWORTHY, G. GAULTON, et M. GREENE. 1986. Antiidiotypic antibody to reovirus binds to neurons and protects from viral infection. *Ann. Neurol.* **19**: 555-558.

DIMMOCK, N. J. 1993. Neutralization by fragments of antibody. *In* "Neutralization of animal viruses". A. Capron, R. W. Compans, M. Cooper, H. Koprowski, I. McConnell, F. Melchers, M. Oldstone, S. Olsnes, M. Potter, H. Saedler, P. K. Vogt, H. Wagner, et I. Wilson, Éd. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, p. 67-70.

DIVGI, C. R., et S. M. LARSON. 1989. Radiolabeled monoclonal antibodies in the diagnosis and treatment of malignant melanoma. *Semin. Nucl. Med.* **19**: 252-261.

DOYLE, L. P., et L. M. HUTCHINGS. 1946. A transmissible gastroenteritis in pigs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **108**: 257-259.

DUAN, L., O. BAGASRA, M. A. LAUGHLIN, J. W. OAKES, et R. J. POMERANTZ. 1994. Potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by an intracellular anti-Rev single-chain antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 5075-5079.

DVEKSLER, G. S., C. W. DIEFFENBACH, C. B. CARDELLICHIO, K. MCCUAIG, M. N. PENSIERO, G. S. JIANG, N. BEAUCHEMIN, et K. V. HOLMES. 1993. Several members of the mouse carcinoembryonic antigen-related glycoprotein family are functional receptors for the coronavirus mouse hepatitis virus-A59. *J. Virol.* **67**: 1-8.

DVEKSLER, G. S., M. N. PENSIERO, C. B. CARDELLICHIO, R. K. WILLIAMS, G. S. JIANG, et K. V. HOLMES. 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.

EICHMANN, K., et K. RAJEWSKI. 1975. Induction of T and B cell immunity by anti-idiotypic antibody. *Eur. J. Immunol.* **5**: 661-666.

ERLT H. C., et R. W. FINBERG. 1984. Sendai virus specific T cell clones: induction of cytolytic T cells by an anti-idiotypic antibody directed against a helper T cell clone. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **81**: 2850-2854.

ESCOBAR, J. C., S. A. KOCHIK, E. SKALETSKY, J. S. ROSENBERG, et T. R. BEARDSLEY. 1992. Immunization of cats against feline infectious peritonitis with anti-idiotypic antibodies. *Viral Immunol.* **5**: 71-79.

FIELDS, B. A., F. A. GOLDBAUM, X. YSERN, R. J. POLJAK, et R. A. MARIUZZA. 1995. Molecular basis of antigen mimicry by an anti-idiotope. *Nature* **374**: 739-42.

FISHMAN, P. S., J.-S. GASS, P. T. SWOVELAND, E. LAVI, M. K. HIGHKIN, et S. R. WEISS. 1985. Infection of the basal ganglia by a murine coronavirus. *Science* **229**: 877-879.

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.

FLORY, E., M. PFLEIDERER, A. STUHLER, et H. WEGE. 1993. Induction of protective immunity against coronavirus-induced encephalomyelitis: evidence for an important role of CD8+ T cells in vivo. *Eur. J. Immunol.* **23**: 1757-61.

FOON, K. A., M. CHAKRABORTY, W. J. JOHN, A. SHERRATT, H. KOHLER, et M. BHATTACHARYA-CHATTERJEE. 1995. Immune response to the carcinoembryonic antigen in patients treated with an anti-idiotypic antibody vaccine. *J. Clin. Invest.* **96**: 334-42.

FRIEDMAN, P. N., D. F. CHACE, P. A. TRAIL, et C. B. SIEGALL. 1993. Antitumor activity of the single-chain immunotoxin BR96 sFv-PE40 against established breast and lung tumor xenografts. *J. Immunol.* **150**: 3054-3061.

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.

GARCIA, K. C., S. V. DESIDERIO, P. M. RONCO, P. J. VERROUST, et L. M. AMZEL. 1992. Recognition of angiotensin II: Antibodies at different level of an idiotypic network are superimposable. *Science* **257**: 528-531.

GAULTON, G. N., A. H. SHARPE, D. W. CHANG, B. N. FIELDS, et M. I. GREENE. 1986. Syngeneic monoclonal internal image anti-idiotopes as prophylactic vaccines. *J. Immunol.* **137**: 2930-2936.

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.

GREENSPAN, N. S., et C. A. BONA. 1993. Idiotypes: structure and immunogenicity. *FASEB J.* **7**: 437-444.

GRIFFITHS, A. D., S. C. WILLIAMS, O. HARTLEY, I. M. TOMLINSON, P. WATERHOUSE, W. L. CROSBY, R. E. KONTERMANN, P. T. JONES, N. M. LOW, T. J. ALLISON, T. D. PROSPERO, H. R. HOOGENBOOM, A. NISSIM, J. P. L. COX, J. L. HARRISON, M. ZACCOLO, E. GHERARDI, et G. WINTER. 1994. Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J.* **13**: 3245-3260.

GRZYCH, J. M., M. CAPRON, P. H. LAMBERT, C. DISSOUS, S. TORRES, et A. CAPRON. 1985. An anti-idiotypic vaccine against experimental schistosomiasis. *Nature* **316**: 74-76.

GUESDON, J.-L., T. TERNYNCK, et S. AVRAMEAS. 1979. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J. Histochem. Cytochem.* **27**: 1131-1139.

HARIHARAN, K., S. SRIKUMARAN, R. A. MOXLEY, F. A. OSORIO, et A. A. MORALES. 1989. Induction of neutralizing antibodies to transmissible gastroenteritis virus by anti-idiotypic antibodies. *Viral Immunol.* **2**: 133-142.

HIERNAUX, J. R. 1988. Idiotypic vaccines and infectious diseases. *Infect. Immun.* **56**: 1407-1413.

HOLMES, K. V., et M. M. C. LAI. 1996. *Coronaviridae*: The viruses and their replication. In: "Virology" 2e édition. B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, et S. E. Straus. (éds). Lippincott-Raven, Philadelphia, 1075-1093.

HOOGENBOOM, H. R., et G. WINTER. 1992. By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline V_H gene segments rearranged *in vitro*. *J. Mol. Biol.* **227**: 381-388.

HORTON, R. M., H. D., HUNT, S. N., HO, J. K. PULLEN, et L. R. PEASE. 1977. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* **77**: 61-68.

HUSE, W. D., L. SASTRY, S. A. IVERSON, A. S. KANG, M. ALTING-MEES, D. R. BURTON, S. J. BENKOVIC, et R. A. LERNER. 1989. Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science* **246**: 1275-1281.

HUSTON, J. S., D. LEVINSON, M. MUDGETT-HUNTER, M. S. TAI, J. NOVOTNY, M. N. MARGOLIES, R. J. RIDGE, R. E. BRUCCOLERI, E. HABER, R. CREA, et H. OPPERMANN. 1988. Protein engineering of antibody binding sites: Recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 5879-5883.

JERNE, N. K. 1974. Towards a network theory of the immune system. *Ann. Immunol.* **125C**: 373-389.

JIANG, W., T. P. BONNERT, K. VENUGOPAL, et E. A. GOULD. 1994. A single chain antibody fragment expressed in bacteria neutralizes tick-borne flaviviruses. *Virology* **200**: 21-28.

JIANG, W., K. VENUGOPAL, et E. A. GOULD. 1995. Intracellular interference of tick-borne flavivirus infection by using a single-chain antibody fragment delivered by recombinant sindbis virus. *J. Virol.* **69**: 1044-1049.

KABAT, E. A., T. T. WU, H. M. PERRY, K. S. GOTTESMAN, et C. FOELLER. 1991. Sequences of proteins of immunological interest, 5th ed. National Institutes of Health, Bethesda, MD.

KENNEDY, R. C., J. W. EICHBERG, R. E. LANFORD, et G. R. DREESMAN. 1986. Anti-idiotypic antibody vaccine for type B viral hepatitis in chimpanzees. *Science* **232**: 220-223.

KENNEDY, R. C., I. IONESCU-MATIU, Y. SANCHEZ, et G. R. DREESMAN. 1983. Detection of interspecies idiotypic cross-reactions associated with antibodies to hepatitis B surface antigen. *Eur. J. Immunol.* **13**: 232-235.

KÖHLER, G., et C. MILSTEIN. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495-497.

KOOI, C., M. CERVIN, R. ANDERSON. 1991. Differentiation of acid-pH-dependent and -nondependent entry pathways for mouse hepatitis virus. *Virology* **180**: 108-119.

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.

KOPECKY, J., R. KREJCI, et E. A. GOULD. 1995. Induction and characterization of monoclonal anti-idiotypic antibodies to tick-borne encephalitis virus neutralizing antibody. *J. Immunoassay* **16**: 437-465.

KOPROWSKI, H., D. HERLYN, M. LUBECK, E. DEFREITAS, et H. F. SEARS. 1984. Human anti-idiotypic antibodies in cancer patients: Is the modulation of the immune response beneficial for the patient? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 216-219.

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.

KUNKEL, H. G., M. MANNICK, et R. C. WILLIAMS. 1963. Individual antigenic specificity of isolated antibodies. *Science* **140**: 1218-1219.

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 protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

LAI, M. M. C. 1990. Coronavirus: organization, replication and expression of genome. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**: 303-333.

LAKE, D. F., K. S. LAM, L. PENG, et E. M. HERSH. 1994. Molecular cloning, expression and mutagenesis of an anti-insulin single chain Fv (scFv). *Mol. Immunol.* **31**: 845-856.

LAMARRE, A., et P. J. TALBOT. 1995. Protection from lethal coronavirus infection by immunoglobulin fragments. *J. Immunol.* **154**: 3975-3984.

LAMARRE, A., J. LECOMTE, et P. J. TALBOT. 1991. Antiidiotypic vaccination against murine coronavirus infection. *J. Immunol.* **147**: 4256-4262.

LAROCHE, Y., M. DEMAAYER, J. M. STASSEN, Y. GANSEMANS, E. DEMARSIN, G. MATTHYSSENS, D. COLLEN, et P. HOLVOET. 1991. Characterization of a recombinant single-chain molecule comprising the variable domains of a monoclonal antibody specific for human fibrin fragment D-dimer. *J. Biol. Chem.* **266**: 16343-16349.

LAWLER, A. M., J. F. KEARNEY, M. KUEHL, et P. J. GEARHART. 1989. Early rearrangements of genes encoding murine immunoglobulin K chains, unlike genes encoding heavy chains, use variable gene segments dispersed throughout the locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 6744-6747.

LECOMTE, J., V. CAINELLI-GEBARA, 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, V. K., T. G. HARRIOTT, V. K. KUCHROO, W. J., HALLIDAY, I. HELLSTRÖM, et K. E. HELLSTRÖM. 1985. Monoclonal antiidiotypic antibodies related to a murine oncofetal bladder tumor antigen induce specific cell-mediated tumor immunity. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 6286-6290.

LEFRANC, G., et M. P. LEFRANC. 1990. Antibody engineering and perspectives in therapy. *Biochimie* **72**: 639-651.

LIU, D. X., et S. C. INGLIS. 1991. Association of the infectious bronchitis virus 3c protein with the virion envelope. *Virology* **185**: 911-917.

LOMBES, M., B. DESFOSES, N. CITTANOVA, et B. F. ERLANGER. 1989. A syngeneic monoclonal anti-idiotypic antibody with internal image properties restricted to a single aldosterone-binding system. *J. Immunol.* **143**: 4078-4083.

LUYTJES, W., L. S. STURMAN, P. J. BREDENBEEK, J., CHARITEVAN, B. A. M. 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.

MA, J. K.-C., M. HUNJAN, R. SMITH, C. KELLY, et T. LEHNER. 1990. An investigation into the mechanism of protection by local passive immunization with monoclonal antibodies against *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* **58**: 3407-3414.

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.

MARASCO, W. A., W. A. HASELTINE, et S. Y. CHEN. 1993. Design, intracellular expression, and activity of a human anti-human immunodeficiency virus type 1 gp120 single-chain antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 7889-7893.

MARKS, J. D., H. R. HOOGENBOOM, T. P. BONNERT, J. MCCAFFERTY, A. D. GRIFFITHS et G. WINTER. 1991. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.* **222**: 581-597.

MARRIOTT, S. J., D. J. ROEDER, et R. A. CONSIGLI. 1987. Anti-idiotypic antibodies to a polyomavirus monoclonal antibody recognize cell surface components of mouse kidney cells and prevent polyomavirus infection. *J. Virol.* **61**: 2747-2753.

MATHEWS, J. H., J. T. ROHRIG, et D. W. TRENT. 1985. Role of complement and the Fc portion of immunoglobulin G in immunity to Venezuelan equine encephalomyelitis virus infection with glycoprotein-specific monoclonal antibodies. *J. Virol.* **55**: 594-600.

MCCAFFERTY, J., A. D. GRIFFITHS, G. WINTER, et D. J. CHISWELL. 1990. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**: 552-554.

MCINTOSH, K. 1990. Coronaviruses. In "Virology", 2nd edition. B. N. Fields, D. M. Knipe *et al.*, Éd. Raven Press, New York, p. 857-864.

MCMILLAN, S., M. V. SEIDEN, R. A. HOUGHTEN, B. CLEVINGER, J. M. DAVIE, et R. A. LERNER. 1983. Synthetic idiotypes: the third hypervariable region of murine anti-dextran antibodies. *Cell* **35**: 859-863.

MCNAMARA, M. K., R. E. WARD, et H. KOHLER. 1984. Monoclonal idiotope vaccine against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Science* **226**: 1325-1326.

MOBLEY, J., G. EVANS, M. O. DAILEY et S. PERLMAN. 1992. Immune response to a murine coronavirus: identification of a homing receptor-negative CD4+ T cell subset that responds to viral glycoproteins. *Virology* **187**: 443-452.

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.

MOUNTAIN, A., et J. R. ADAIR. 1992. Engineering antibodies for therapy. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **10**: 1-142.

MURRAY, R. S., B. BROWN, D. BRIAN, et G. F. CABIRAC. 1992a. Detection of coronavirus RNA and antigen in multiple sclerosis brain. *Ann. Neurol.* **32**: 525-533.

MURRAY, R. S., G. Y. CAI, K. HOEL, J. Y. ZHANG, K. F. SOIKE, et G. F. CABIRAC. 1992b. Coronavirus infects and cause demyelination in primate central nervous system. *Virology* **188**: 274-284.

MYINT, S. H. 1995. Human coronavirus infections. *In: . The Coronaviridae*. S. G. Siddell, Éd. Plenum press, New York, 389-401.

NELSON, K. A., E. GEORGE, C. SWENSON, J. W. FORSTROM, et K. E. HELLSTRÖM. 1987. Immunotherapy of murine sarcomas with auto-anti-idiotypic monoclonal antibodies which bind to tumor-specific T cells. *J. Immunol.* **139**: 2110-2117.

NEPOM, J. T., H. L. WEINER, M. A. DICHTER, M. TARDIEU, D. R. SPRIGGS, C. F. GRAMM, M. L. POWERS, B. N. FIELDS, et M. I. GREENE. 1982. Identification of a hemagglutinin-specific idiootype associated with reovirus recognition shared by lymphoid and neural cells. *J. Exp. Med.* **155**: 155-167.

NISSIM, A., H. R. HOOGENBOOM, I. M. TOMLINSON, G. FLYNN, C. MIDGLEY, D. LANE, et G. WINTER. 1994. Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents. *EMBO J.* **13**: 692-698.

NOSEWORTHY, J. H., B. N. FIELDS, M. A. DICHTER, C. SOBOTKA, E. PIZER, L. L. PERRY, J. T. NEPOM, et M. I. GREENE. 1983. Cell receptors for the mammalian reovirus. I. Syngeneic monoclonal anti-idiotypic antibody identifies a cell surface receptor for reovirus. *J. Immunol.* **131**: 2533-2538.

OAKES, J. E., et R. N. LAUSCH. 1981. Role of Fc fragments in antibody-mediated recovery from ocular and subcutaneous herpes simplex virus infections. *Infect. Immun.* **33**: 109-114.

OOSTERLAKEN, T. A. M., M. HARMSSEN, S. S. JHAGJHOOR-SINGH, G. L. EKSTIJN, C. A. KRAAIJEVELD, et H. SNIPPE. 1991. A protective monoclonal anti-idiotypic vaccine to lethal Semliki Forest virus infection in BALB/c mice. *J. Virol.* **65**: 98-102.

ORLANDI, R., D. H. GÜSSOW, P. T. JONES, et G. WINTER. 1989. Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 3833-3837.

LOUDIN, J., et M. MICHEL. 1963. Une nouvelle forme d'allotypie des globulines gamma du sérum de lapin apparemment liée à la fonction et la spécificité des anticorps. *C. R. Séances Acad. Sci.* **257**: 805-808.

PEARSON, J., et C. A. MIMS. 1985. Differential susceptibility of cultured neural cells to the human coronavirus OC43. *J. Virol.* **53**: 1016-1019.

PERCY, A. J. et D. A. HARN. 1988. Monoclonal anti-idiotypic and anti-anti-idiotypic antibodies from mice immunized with a protective monoclonal antibody against *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* **140**: 2760-2762.

POURCHO, R. G., et D. J. GOEBEL. 1987. Visualization of endogenous glycine in cat retina; an immunocytochemical study with Fab fragments. *J. Neurosci.* **7**: 1189-1197.

PRIDE, M. W., H. SHI, J. M. ANCHIN, D. S. LINTHICUM, P. T. LOVERDE, A. THAKUR, et Y. THANAVALA. 1992. Molecular mimicry of hepatitis B surface antigen by an anti-idiotypic-derived synthetic peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 11900-11904.

PRINCE, G. A., V. G. HEMMING, R. L. HORSWOOD, P. A. BARON, B. R. MURPHY, et R. M. CHANOCK. 1990. Mechanism of antibody-mediated viral clearance in immunotherapy of respiratory syncytial virus infection of Cotton rats. *J. Virol.* **64**: 3091-3092.

RAJADHYAKSHA, M., et Y. THANAVALA. 1995. Delineation of the minimal hepatitis B surface antigen-specific B- and T-cell epitope contained within an anti-idiotypic-derived pentadecapeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 1575-9.

RAJEWSKY, K. 1983. Symmetry and assymetry in idiotypic interactions. *Ann. Immunol.* **134D**: 133-141.

REAGAN, K. J., W. H. WUNNER, T. J. WIKTOR, et H. KOPROWSKI. 1983. Anti-idiotypic antibodies induce neutralizing antibodies to rabies virus glycoprotein. *J. Virol.* **48**: 660-666.

REITER, Y., L. H. PAI, U. BRINKMANN, Q. C. WANG, et I. PASTAN. 1994. Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of a recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment. *Cancer Res.* **54**: 2714-2718.

SACKS, D. L., et A. SHER. 1983. Evidence that anti-idiotypic induced immunity to experimental african trypanosomiasis is genetically restricted and requires recognition of combining site-related idiotopes. *J. Immunol.* **131**: 1511-1515.

SACKS, D. L., K. ESSER, et A. SHER. 1982. Immunization of mice against African trypanosomiasis using anti-idiotypic antibodies. *J. Exp. Med.* **115**: 1108-1119.

SACKS, D. L., L. V. KIRCHHOFF, S. HIENY, et A. SHER. 1985. Molecular mimicry of a carbohydrate epitope on a major surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi* by using anti-idiotypic antibodies. *J. Immunol.* **135**: 4155-4159.

SALMI, A., B. ZIOLA, T. HOVI, et M. REUNANEN. 1982. Antibodies to coronaviruses OC43 and 229E in multiple sclerosis patients. *Neurology.* **32**: 292-295.

SANGER, F., S. NICKLEN, et A. R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.

SANNA, P. P., A. DE LOGU, R. A. WILLIAMSON, Y. -L. HOM, S. E. STRAUS, F. E. BLOOM, et D. R. BURTON. 1996. Protection of nude mice by passive immunization with a type-common human recombinant monoclonal antibody against HSV. *Virology* **215**: 101-106.

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. Assoc.* **78**: 413-422.

SCHREIBER, A. B., P. O. COURAUD, C. ANDRE, B. VRAY, et A. D. STROSBURG. 1980. Anti-alprenolol anti-idiotypic antibodies bind to β -adrenergic receptors and modulate catecholamine-sensitive adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 7385-7389.

SEGE, K., et P. A. PETERSON. 1978. Use of anti-idiotypic antibodies as cell-surface receptor probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 2443-2447.

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.

SHARPE, A. H., G. N. GAULTON, K. K. MCDADE, B. N. FIELDS, et M. I. GREENE. 1984. Syngeneic monoclonal antiidiotypic can induce cellular immunity to reovirus. *J. Exp. Med.* **160**: 1195-1205.

SIDDELL, S. G. 1995. The *Coronaviridae*. S. G. Siddell, Éd. Plenum press, New York, p. VII-VIII.

SIDDELL, S. G., R. ANDERSON, D. CAVANAGH, K. FUJIWARA, H. D. KLENK, M. R. MACNAUGHTON, M. PENZAERT, S. A. STOHLMAN, L. STURMAN, et B. A. M. VAN DER ZEIJST. 1983a. *Coronaviridae. Intervirolog.* **20**: 181-189.

SIDDELL, S., H. WEGE, et V. TER MEULEN. 1983b. The biology of coronaviruses. *J. gen. Virol.* **64**: 761-776.

SKERRA, A., et A. PLÜCKTHUN. 1988. Assembly of a functional immunoglobulin F_v fragment in *Escherichia coli*. *Science* **240**: 1038-1041.

SMITH, G. P. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors for that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**: 1315-1317.

SPAAN, W., D. CAVANAGH, et M. C. HORZINEK. 1990. Coronaviruses. In "Immunochemistry of viruses. The basis for serodiagnosis and vaccines", vol 2. M.H.V. van Regenmortel, et A.R. Neurath, Éd. Elsevier Science Publishers B. V. , Amsterdam, p. 359-379.

STEIN, K. E. 1985. Network regulation of the immune response to bacterial polysaccharide antigens. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **119**: 57-74.

STEIN, K. E., et T. SÖDERSTRÖM. 1984. Neonatal administration of idiotype or antiidiotype primes for protection against *Escherichia coli* K13 infection in mice. *J. Exp. Med.* **160**: 1001-1011.

STEWART, J. N., S. MOUNIR, et P. J. TALBOT. 1992. Human coronavirus gene expression in the brains of multiple sclerosis patients. *Virology* **191**: 502-505.

STOHLMAN, S. A., C. C. BERGMANN, R. C. VAN DER VEEN, et D. R. HINTON. 1995. Mouse hepatitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes protect from lethal infection without eliminating virus from the central nervous system. *J. Virol.* **69**: 684-94.

STOHLMAN, S. A., G. R. MATSUSHIMA, N. CASTEEL, et L. P. WELTER. 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.

SUNE, C., C. SMERDOU, I. M. ANTON, P. ABRIL, J. PLANA, et L. ENJUANES. 1991. A conserved coronavirus epitope, critical in virus neutralization, mimicked by internal-image monoclonal anti-idiotypic antibodies. *J. Virol.* **65**: 6979-6984.

TALBOT, P. J. 1995. Implication des virus dans la sclérose en plaques. *Médecine/Sciences* **11**: 837-843.

TALBOT, P. J., et M. J. BUCHMEIER. 1987. Catabolism of homologous murine monoclonal hybridoma IgG antibodies in mice. *Immunology* **60**: 485-489.

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., S. ÉKANDÉ, N. R. CASHMAN, S. MOUNIR, et J. N. STEWART. 1994. Neurotropism of human coronavirus 229E. *Adv. Exp. Med. Biol.* **32**: 339-346.

TALBOT, P. J., J. -S. PAQUETTE, C. CIURLI, J. P. ANTEL, et F. OUELLET. 1996. Myelin basic protein and human coronavirus 229E cross-reactive T cells in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **39**: 233-240.

- TALBOT, P. J., A. A. SALMI, R. L. KNOBLER, et M. J. BUCHMEIER. 1984. 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**: 121-126.
- TAVLADORAKI, P., E. BENVENUTO, S. TRINCA, D. DE MARTINIS, A. CATTANEO, et P. GALEFFI. 1993. Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. *Nature* **366**: 469-472.
- TOMLINSON, I. M., G. WALTER, J. D. MARKS, M. B. LLEWELYN, et G. WINTER. 1992. The repertoire of human germline V_H sequences reveals about fifty groups of V_H segments with different hypervariable loops. *J. Mol. Biol.* **227**: 776-798.
- TSUDA, T., T. ONODERA, T. SUGIMURA, et Y. MURAKAMI. 1992. Induction of protective immunity and neutralizing antibodies to pseudorabies virus by immunization of anti-idiotypic antibodies. *Arch. Virol.* **124**: 291-300.
- 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.
- 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.

UYTDEHAAG, F. G. C. M., et A. D. M. E. OSTERHAUS. 1985. Induction of neutralizing antibody in mice against poliovirus type II with monoclonal anti-idiotypic antibody. *J. Immunol.* **134**: 1225-1229.

VOSS JR, E. W., K. M. WEIDNER, et L. K. DENZIN. 1992. Importance of dynamic properties of idiotopes in interactions with anti-Id antibodies. *Immunol. Invest.* **21**: 71-83.

WARD, E. S. 1992. Antibody engineering: the use of *Escherichia coli* as an expression host. *FASEB J.* **6**: 2422-2427.

WARD, E. S., D. GÜSSOW, A. D. GRIFFITHS, P. T. JONES, et G. WINTER. 1989. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature* **341**: 544-546.

WASSERMANN, N. H., A. S. PENN, P. I. FREIMUTH, N. TREPTOW, S. WENTZEL, W. L. CLEVELAND, et B. F. ERLANGER. 1982. Anti-idiotypic route to anti-acetylcholine receptor antibodies and experimental myasthenia gravis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **79**: 4810-4814.

WATANABE, R., H. WEGE, 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., ST. SIDDELL, et V. TER MEULEN. 1982. The biology and pathogenesis of coronaviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **99**: 165-200.

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.

WILLIAMS, R. K., G. S. JIANG, S. W. SNYDER, M. F. FRANA, et K. V. HOLMES. 1990. Purification of the 110-kilodalton glycoprotein receptor for mouse hepatitis virus (MHV)-A59 from mouse liver and identification of a nonfunctional, homologous protein in MHV-resistant SJL/J mice. *J. Virol.* **64**: 3817-3823.

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.

WINTER, E., A. RADBRUCH, et U. KRAWINKEL. 1985. Members of novel VH gene families are found in VDJ regions of polyclonally activated B-lymphocytes. *EMBO J.* **4**: 2861-2867.

YAMAGUSHI, 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.

YANG, Y. F., et Y. THANAVALA. 1995. A comparison of the antibody and T cell response elicited by internal image and noninternal image anti-idiotypes. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **75**: 154-8.

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.

YODEN, S., H. KIDA, et R. YANAGAWA. 1985. Is bivalent binding of monoclonal antibodies to different antigenic areas on the hemagglutinin of influenza virus required for neutralization of viral infectivity? *Arch. Virol.* **85**: 209-216.

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**: 2865-2874.

YU, M. W. N., S. LEMIEUX, et P. J. TALBOT. 1996. Genetic control of anti-idiotypic vaccination against coronavirus infection. *Eur. J. Immunol.* **26**: (sous presse).

YU, M., et P. J. TALBOT. 1995. Induction of a protective immune response to murine coronavirus with non-internal image anti-idiotypic antibodies. *In*: "Corona- and related viruses". P. J. TALBOT et G. A. LEVY (éds.). Plenum Press, New York, 165-172.

YU, X., W. BI, S. R. WEISS, et J. L. LEIBOWITZ. 1994. Mouse hepatitis virus gene 5b is a new virion envelope protein. *Virology* **202**: 1018-1023.

ZHOU, E.-M., K. L. LOHMAN, et R. C. KENNEDY. 1990. Administration of noninternal image monoclonal anti-idiotypic antibodies induces idio-
type-restricted responses specific for human immunodeficiency virus envelope glycoprotein epitopes. *Virology* **174**: 9-17.

ANNEXE 1

Liste des publications et des communications

PUBLICATIONS

- LAMARRE, A., CHAGNON, F. and TALBOT, P. J. (1996).** A recombinant single chain antibody neutralizes coronavirus but fails to protect mice: perspectives for antiviral immunotherapy (submitted to *The Journal of Immunology*).
- LAMARRE, A. and TALBOT, P. J. (1996).** Phage-displayed anti-idiotypic antibody fragments partially protect against murine coronavirus infection without apparent structural homology to virus (submitted to *Virology*).
- McCLINTOCK, K., LAMARRE, A., LALIBERTÉ, J.-F. and FORTIN, M. G. (1996).** Identification of a plant cell receptor for turnip mosaic virus coat protein by using anti-idiotypic antibodies. (submitted to *P.N.A.S.*).
- LAMARRE, A. and TALBOT P., J. (1995).** Protection from lethal coronavirus infection by immunoglobulin fragments. *J. Immunol.* **154**: 3975-3984.
- DANIEL, C., LAMARRE, A. and TALBOT, P. J.(1994).** Increased viral titers and enhanced reactivity of antibodies to the spike glycoprotein of murine coronavirus produced by infection at pH 6. *J. Virol. Methods* **50**: 237-244.
- LAMARRE, A., LECOMTE, J. and TALBOT, P. J. (1991).** Antiidiotypic vaccination against murine coronavirus infection. *J. Immunol.* **147**: 4256-4262.
- LAMARRE, A. and TALBOT, P. J. (1989).** Effect of pH and temperature on the infectivity of human coronavirus 229E. *Can. J. Microbiol.* **35**: 972-974.

COMMUNICATIONS

LAMARRE, A. and TALBOT P. J. (1996). Isolation and characterization of recombinant anti-idiotypic antibodies specific for a murine coronavirus using a phage-display library. Canadian Society for Immunology Spring '96 meeting, Sainte-Adèle, Québec.

YU, M., **LAMARRE, A.** and TALBOT, P. J. (1995). "Vaccination against coronavirus infection in different strains of mice by non-internal image anti-idiotypic antibody". 9th International Congress of Immunology, San-Francisco, Californie.

TALBOT, P. J., CHAGNON, F., COTÉ, G., DANIEL, C., ÉKANDÉ, S., **LAMARRE, A.**, MOUNIR, S., OUELLET, F., STEWART, J. and YU, M. (1994). "Neurotropism of coronaviruses in humans and protective immunity in the mouse". 7th International Conference on Comparative and Applied Virology, Montréal, Québec.

YU, M., **LAMARRE, A.** and TALBOT, P. J. (1994). "Partial lack of genetic restriction for anti-coronaviral protection by a polyclonal anti-idiotypic antibody of the gamma type." 6th International Symposium on Corona and Related Viruses, Québec, Québec.

LAMARRE, A. and TALBOT, P. J. (1994). "Studies on the molecular basis for antibody neutralization for a murine neurotropic coronavirus". American Society for Virology 13th Annual Meeting, University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin.

- LAMARRE, A.** and TALBOT, P. J. (1994). "Biological properties of F(ab')₂, Fab and scFv fragments of a monoclonal antibody to a murine coronavirus". Canadian Society for Immunology spring '94 meeting, Sainte-Adèle, Québec.
- LAMARRE, A.**, MOUNIR, S. and TALBOT, P. J. (1992). "Cloning and sequencing of a neutralizing anti-coronavirus single-chain Fv". Third Annual Conference on "Antibody Engineering", San Diego, Californie.
- YU, M., **LAMARRE, A.**, et TALBOT, P. J. (1992). "Production d'anticorps anti-idiotypiques spécifiques au coronavirus murin neurotrope". 60e réunion annuelle de l'Association Canadienne-Française pour l'Avancement des Sciences, Université de Montréal, Montréal, Québec.
- LAMARRE, A.**, LECOMTE, J. and TALBOT, P. J. (1991). "Anti-idiotypic antibodies mimic a conformational neutralization epitope on the spike glycoprotein of a murine coronavirus". American Society for Virology 10th Annual Meeting, Colorado State University, Fort-Collins, Colorado.
- DANIEL, C., **LAMARRE, A.** and TALBOT, P. J.(1991). "Enhanced antigenicity of murine coronavirus spike glycoprotein produced at pH 6". 41e réunion annuelle de la Société Canadienne des Microbiologistes, London, Ontario.
- LAMARRE, A.**, LECOMTE, J. and TALBOT, P. J.(1990). "Characterization of polyclonal anti-idiotypic antibodies induced against a murine coronavirus neutralizing monoclonal antibody". 8e congrès international de virologie Berlin, Allemagne.

LAMARRE, A., LECOMTE, J. and TALBOT, P. J.(1990). "Production and characterization of anti-idiotypic antibodies against a murine coronavirus neutralizing monoclonal antibody". 40e réunion annuelle de la Société Canadienne des Microbiologistes, Calgary, Alberta.

LAMARRE, A. et TALBOT, P. J. (1989). "Étude de stabilité du coronavirus humain 229E". 39e réunion annuelle de la Société Canadienne des Microbiologistes, Laval, Québec.

ANNEXE 2

Copie des articles publiés