

2m11.2659.10

Université de Montréal

Purification d'IgY de poule par chromatographie d'affinité à l'aide
d'une protéine de *Streptococcus suis* sérotype 2
liant les immunoglobulines de façon non-immune

par

Karima Boudjeroua

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires, option microbiologie

Juin 1998

©Karima Boudjeroua, 1998



at 1200 10

SF
607
U54
1999
V.002

Unité de travail

Publication 1999 de l'Institut de Technologie de l'Université de
de l'Université de Technologie de l'Université de Technologie de
de l'Université de Technologie de l'Université de Technologie de

1999

Centre de Recherche

Le Centre de Recherche en Technologie de l'Université de

Le Centre de Recherche en Technologie de l'Université de

Le Centre de Recherche en Technologie de l'Université de

Le Centre de Recherche en Technologie de l'Université de

Le Centre de Recherche en Technologie de l'Université de

Le Centre de Recherche en Technologie de l'Université de

1999

Le Centre de Recherche en Technologie de l'Université de



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

Purification d'IgY de poule par chromatographie d'affinité à l'aide d'une protéine de
Streptococcus suis sérotype 2 liant les immunoglobulines de façon non-immune

présenté par:
Karima Boudjeroua

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr M. Gottschalk:	Président du jury
Dr J. D. Dubreuil:	Directeur de recherche
Dr M. Jacques:	Codirecteur de recherche
Dr N. Larivière:	Membre du jury

Mémoire accepté le 98 - 11 - 16

SOMMAIRE

À date, plusieurs protéines liant les immunoglobulines (Ig) de façon non-immune (PLIg) exprimées par des bactéries ont été décrites. *Streptococcus suis* sérotype 2 produit une PLIg possédant la propriété unique de réagir de manière non-immune avec les IgY de poule (*Gallus domesticus*). Les œufs de poule sont une source journalière d'anticorps polyclonaux en concentration 10 fois supérieure aux 1 à 2 mg/ml contenus dans le sérum de lapin.

L'objectif de notre recherche était d'utiliser la propriété liante de la PLIg de *S. suis* sérotype 2 afin de purifier par chromatographie d'affinité des IgY issues d'œufs de poule. Un gel "Triazine activated agarose" nous a permis de coupler efficacement la protéine en présence de 3 M d'hydrochlorure de guanidine à température ambiante. La concentration de ligand couplé était de 1 mg/ml de gel. L'évaluation de la capacité de liaison de la colonne d'affinité a été effectuée à l'aide d'IgY commerciales. Des rendements variants de 56 à 80 % selon la quantité d'IgY déposée ont été obtenus. Par la suite, une extraction au chloroforme qui permet d'éliminer les lipides contenus dans le jaune d'œuf a été effectuée et une composante aqueuse contenant les IgY a été obtenue. La fraction hydrosoluble (FH) fût alors appliquée à la colonne d'affinité. Cette dernière a permis de récupérer 19 % des IgY par rapport aux protéines totales de la FH. Cette quantité représente 51 % des IgY contenues dans la FH. La pureté des IgY analysée par densitométrie quantitative du gel était d'environ 83 %.

Nos résultats suggèrent que l'immobilisation de la PLIg de *S. suis* sérotype 2 à un gel représente un outil intéressant pour la purification des IgY contenues dans le jaune d'œuf. La purification des IgY par chromatographie d'affinité est simple, rapide et peu coûteuse, car la colonne d'affinité peut être régénérée plusieurs fois sans perdre son activité liante spécifique aux IgY de poule.

TABLE DES MATIÈRES

	page
IDENTIFICATION DU JURY	ii
SOMMAIRE	iii
TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	x
REMERCIEMENTS.....	xii
I. INTRODUCTION	1
II. REVUE DE LA LITTÉRATURE	3
1. Les protéines liant les immunoglobulines de façon non-immune (PLIg).....	4
1. 1. Introduction.....	4
1. 2. Structure de l’immunoglobuline	6
1. 3. Récepteurs Fc et nature de l’interaction avec l’immunoglobuline	8
1. 3. 1. Type I.....	8
1. 3. 2. Type II	9
1. 3. 3. Type III.....	12
1. 3. 4. Type IV.....	13
1. 3. 5. Type V	15
1. 3. 6. Type VI.....	16
1. 3. 7. Autres types de protéines liant les immunoglobulines	16
1. 4. Récepteurs Fab et nature de l’interaction avec l’immunoglobuline	17
1. 5. Relations antigéniques et fonctionnelles entre les PLIg	19
1. 5. 1. Protéines distinctes antigéniquement et fonctionnellement	19
1. 5. 2. Protéines reliées antigéniquement et fonctionnellement	19
1. 5. 3. Protéines reliées antigéniquement mais distinctes fonctionnellement	20
1. 6. Rôle des récepteurs Fc dans la pathogénie.....	20

1. 7. Applications impliquant les récepteurs Fc	22
1. 8. Protéines liant les immunoglobulines de façon non-immune produites par <i>Streptococcus suis</i> sérotype 2	22
1. 8. 1. Rétrospective sur <i>Streptococcus suis</i>	22
1. 8. 2. PLIg de <i>Streptococcus suis</i>	24
2. Les œufs de poule comme source d'anticorps	27
2. 1. Composition de l'œuf	28
2. 2. Transfert des IgY de la poule, du sérum à l'œuf.....	28
2. 3. Structure et caractéristiques physico-chimiques des IgY de poule.....	29
2. 3. 1. Introduction	29
2. 3. 2. Structure et caractéristiques.....	29
2. 4. Différentes techniques d'extraction de l'IgY contenue dans le jaune d'œuf	34
2. 4. 1. Séparation du blanc du jaune d'œuf	34
2. 4. 2. Obtention d'une fraction hydrosoluble.....	34
2. 4. 3. Purification des IgY à partir de la fraction hydrosoluble	35
2. 4. 3. 1. Précipitation	35
2. 4. 3. 2. Ultrafiltration	36
2. 4. 3. 3. Chromatographie échangeuse d'ions	37
2. 4. 3. 4. Chromatographie par interaction de chélateurs de métaux	38
2. 4. 3. 5. Chromatographie d'affinité spécifique	38
2. 5. Comparaison de la spécificité, de l'avidité et du titre entre les IgY aviaires et les IgG de mammifères	39
2. 6. Applications impliquant les Ig Y	40
2. 6. 1. Avantages de l'utilisation des IgY	40
2. 6. 2. Applications en immunodiagnostic	42
2. 6. 3. Applications en immunothérapie et immunoprophylaxie	43
3. Chromatographie d'affinité.....	45

III. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS	49
Article: Purification of IgY by affinity chromatography using an immobilized <i>Streptococcus suis</i> serotype 2 immunoglobulin-binding protein. Journal of Applied Microbiology (soumis pour publication)	50
IV. DISCUSSION ET CONCLUSIONS	74
V. BIBLIOGRAPHIE	81
VI. ANNEXES	xiv
Annexe 1: Détermination par électrophorèse de la masse moléculaire de la protéine de <i>Streptococcus suis</i> sérotype 2 liant les IgY	xv
Annexe 2: Tableau et figure complémentaires	xviii
Annexe 3: Acte de colloque (Proceeding) du 15 ^{ème} Congrès de l'“ International Pig Veterinary Society ” (IPVS), Birmingham, Grande-Bretagne, 5-9 Juillet 1998	xx
Annexe 4: Communication orale aux Journées de recherche en productions animales, Conseil des Productions Animales du Québec (CPAQ), Québec, Canada, 21-22 Mai 1998	xxiii
Annexe 5: Affiche à la 78 ^{ème} “ Conference of Research Workers in Animal Diseases ” (CRWAD), Chicago, USA, 10-11 Novembre 1997	xxv
Annexe 6: Affiche au Congrès de l'Association des Microbiologistes du Québec (AMQ), Montréal, Canada, 31 Octobre-1 ^{er} Novembre 1997	xxvii

LISTE DES TABLEAUX

	page
REVUE DE LA LITTÉRATURE	
Tableau 1. Profil d'activité de liaison des différentes PLIg du type II exprimées par les streptocoques du groupe A	10
ANNEXES	
Annexe 2	
Tableau 1. Couplage de la PLIg de <i>S. suis</i> sérotype 2 à différents gels	xix

LISTE DES FIGURES

	page
REVUE DE LA LITTÉRATURE	
Figure 1.	5
Classification fonctionnelle des protéines bactériennes liant de façon non-immune les IgG de différentes espèces animales.....	
Figure 2.	7
Représentation schématique d'une immunoglobuline G de mammifère.....	
Figure 3.	9
Représentation schématique de la protéine A de <i>Staphylococcus aureus</i>	
Figure 4.	11
Représentation schématique de la protéine M1 exprimée par un streptocoque du groupe A.....	
Figure 5.	14
Représentation schématique de la protéine G.....	
Figure 6.	27
Représentation schématique des régions A et B répétées à l'extrémité 3' du gène codant pour la PLIg de <i>S. suis</i> sérotype 2	
Figure 7.	30
Schéma général pour la production d'IgY à partir d'une poule immunisée contre un antigène X	
Figure 8.	33
Représentation schématique d'une immunoglobuline Y de poule	
Figure 9.	46
Principe général de la chromatographie d'affinité.....	
Figure 10.	48
Profil d'une purification par chromatographie d'affinité	
 MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS	
Figure 1.	63
SDS-PAGE and Western blot analyses of <i>Strep. suis</i> IBP	
Figure 2.	64
Protocol used for isolation (A) and purification (B) of IgY from egg yolk	
Figure 3.	65
Recovery of chicken IgY (%) using the IBP-Triazine Activated Agarose affinity column as a function of the quantity of commercial IgY (mg) loaded.....	
Figure 4.	66
Affinity chromatography purification of IgY using Triazine Activated Agarose coupled with IBP	

Figure 5.	SDS-PAGE and Western blot analyses of affinity-purified IgY from egg yolk using the IBP-Triazine Activated Agarose column	67
-----------	---	----

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Figure 1.	Groupements actifs des différents gels testés pour le couplage de la PLIg de <i>S. suis</i> sérotype 2 à une matrice.....	77
-----------	---	----

ANNEXES

Annexe 1

Figure 1.	Courbe de calibration établie en utilisant des standards de faible masse moléculaire	xvii
-----------	--	------

Annexe 2

Figure 1.	Rendement d'IgY de poule (%) en utilisant la colonne PLIg couplée au gel TAA en fonction de la quantité d'IgY commerciale déposée	xix
-----------	---	-----

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN:	Acide désoxyribonucléique
ARN:	Acide ribonucléique
C _H :	“ Heavy constant domain ” (domaine constant de la chaîne lourde de l’Ig)
CHO-IL-6:	Forme glycosylée de l’interleukine 6
C _L :	“ Light constant domain ” (domaine constant de la chaîne légère de l’Ig)
CDR:	“ Complementarity determining region ” (région hypervariable du domaine variable)
ECOR:	Collection de référence de 72 souches sauvages d’ <i>Escherichia coli</i>
EF:	“ Extracellular factor ” (facteur extracellulaire)
ELISA:	“ Enzyme-linked immunosorbent assay ” (ELISA, test immunoenzymatique)
Fab:	“ Antigen-binding fragment ” (fragment liant l’antigène)
Fc:	“ Crystallizable fragment ” (fragment cristallisable)
FCA:	“ Freund complet adjuvant ” (adjuvant complet de Freund)
FIA:	“ Freund incomplet adjuvant ” (adjuvant incomplet de Freund)
FH:	Fraction hydrosoluble
FR:	“ Framework region ” (région charpente du domaine variable)
Gnd-HCl:	Hydrochlorure de guanidine
H:	“ Heavy chain ” (chaîne lourde de l’Ig)
hCG:	“ Human chorionic gonadotrophin ” (gonadotropine chorionique humaine)
Hsp:	“ Heat shock protein ” (protéine de stress ou de choc thermique)
HTM:	“ Hunter’s Titermax adjuvant ” (adjuvant Titermax d’Hunter)
Ig:	Immunoglobuline
kDa:	Kilodalton
L:	“ Light chain ” (chaîne légère de l’Ig)
LPS:	Lipopolysaccharide
M:	Molaire
Mr:	Masse moléculaire

MRP:	“ Muramidase released protein ” (protéine relâchée par la muramidase)
PA:	Protéine A
PEG:	Polyéthylèneglycol
PG:	Protéine G
PLIg:	Protéine liant les Ig de manière non-immune
RF:	Facteur rhumatoïde
RIA:	“ Radioimmunoassay ” (test radioimmunologique)
rhIL-6:	Interleukine humaine recombinante
SDS-PAGE:	“ Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis ” (électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium)
TAA:	“ Triazine activated agarose gel ”, gel d’agarose activé par la triazine
V _H :	“ Heavy variable domain ” (domaine variable de la chaîne lourde de l’Ig)
V _L :	“ Light variable domain ” (domaine variable de la chaîne légère de l’Ig)

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier:

Le docteur J. Daniel Dubreuil, professeur titulaire au département de pathologie et de microbiologie de la faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour sa confiance, ses conseils, pour son soutien financier, pour sa grande disponibilité tout au long de ce projet et pour son sens de l'humour intarissable.

Le docteur Mario Jacques, professeur titulaire au département de pathologie et de microbiologie de la faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, pour sa co-direction et ses commentaires tout le long du projet.

La docteure Bouchra Serhir, pour tous ses conseils pour amorcer ce projet et durant toute ma maîtrise, pour sa constante présence, pour ses encouragements et pour son amitié.

Mohamed Djebbar de l'imprimerie Relicop' à Montréal pour avoir habilement exécuté une partie des figures contenues dans ce mémoire, pour sa disponibilité et son amitié.

Les docteurs Marcelo Gottschalk et Normand Larivière de la faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, membres de mon comité conseil pour leur attention, leur conseils durant nos différentes réunions et d'avoir accepté de faire partie des membres de mon jury.

Madame Thérèse Gendron-Bernard, secrétaire, pour sa bonne humeur, ses sourires quotidiens et sa disponibilité. Madame Annie Borduas, secrétaire, pour tous les services qu'elle m'a généreusement accordés.

Tous les étudiants du GREMIP, pour m'avoir supportée, pour les bons moments et les coups durs que nous avons surmontés ensemble.

Tous mes amis, d'ici et d'ailleurs qui m'ont soutenue lors de toutes mes années d'études.

Les étudiants Élodie, Sonia-Elaine, Hans et Vincent et ex-étudiant Riad, de mon laboratoire, qui ont égayés mes journées tout le long de ma maîtrise.

Ma famille, pour tous leurs encouragements, leur soutien moral et leur confiance.

Tous ceux et celles que je n'ai pas nommés ici, (faute d'espace) et qui méritent mes remerciements pour leur aide technique et/ou leur soutien moral.

Cette étude a été rendue possible grâce au support financier du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRNSG-Stratégique STR 181516) accordé aux Dr. J. D. Dubreuil, M. Jacques, J. Harel et M. Gottschalk.

Merci à tous

I- INTRODUCTION

Plusieurs protéines liant les immunoglobulines de manière non-immune (PLIg) exprimées par différentes bactéries ont été décrites, notamment la protéine A de *Staphylococcus aureus*, qui est la plus étudiée. La différence de réactivité avec les immunoglobulines a permis de définir six types. *Streptococcus suis* sérotype 2 produit une PLIg ne correspondant à aucun des types précédemment décrits et possédant la propriété unique de réagir de manière non-immune avec les immunoglobulines Y de poule (IgY). L'intérêt en immunodiagnostic et immunothérapie de l'utilisation des IgY contenues dans le jaune d'œuf de poule a augmenté de façon très marquée ces quinze dernières années. Le jaune d'œuf a été reconnu comme une source quotidienne d'anticorps abondante et peu coûteuse. La concentration d'IgY dans le jaune d'œuf de poule est en effet 10 fois supérieure à celle retrouvée dans le sérum de lapin (1-2 mg/ml), utilisé régulièrement pour l'obtention d'IgG polyclonaux. Dûe à sa différence structurale avec les IgG de mammifères, l'utilisation des IgY de poule dans les tests immunoenzymatiques évite les inconvénients liés aux réactions croisées souvent rencontrées lors de l'utilisation des IgG de mammifères. Malgré ces avantages, les IgY de poule ne sont pas encore largement utilisées comme source alternative aux IgG de mammifères. Une raison majeure est la difficulté à purifier les IgY contenues dans le jaune d'œuf. Plusieurs techniques ont été mises au point, mais souvent elles nécessitent plusieurs étapes laborieuses.

Le but de notre étude était d'utiliser la propriété liante de la PLIg de *S. suis* sérotype 2 afin de purifier par chromatographie d'affinité des IgY issues d'œufs de poule. Notre premier objectif était donc de coupler la PLIg de *S. suis* à un gel de chromatographie. Le second était d'évaluer la colonne de chromatographie construite pour sa capacité à purifier les IgY à partir du jaune d'œuf.

II- REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. Les protéines liant les immunoglobulines de façon non-immune

1. 1. Introduction

Les recherches réalisées au cours des années 60 ont permis d'effectuer un grand pas dans la connaissance des immunoglobulines (Ig). Les classes et sous classes des Ig furent décrites ainsi que leur structure moléculaire (Edelman, 1959; Porter, 1959; Natvig et Kunkel, 1979). Tous ces travaux permirent d'établir un modèle de l'interaction des anticorps par son fragment Fab avec les antigènes et par son fragment Fc avec les structures de l'hôte (Porter, 1963).

Ce modèle fut remis en question par la découverte d'une protéine de *Staphylococcus aureus* qui était capable de lier l'IgG *via* son fragment Fc (Forsgren et Sjöquist, 1966). Initialement, on pensait que cette interaction se faisait dans la région charnière entre le Fab et le Fc, plus tard, il a été montré qu'elle avait lieu au niveau du Fc (Christensen *et al.*, 1976). Ce type d'interaction fut d'abord appelé "liaison pseudo-immune" (Forsgren et Sjöquist, 1966), puis le terme "liaison non-immune" apparut plus approprié (Kronvall, 1973), enfin le terme "récepteur Fc" fut accepté (Kronvall, 1990). Des études ultérieures ont démontré que différents microorganismes notamment des streptocoques (Myhre et Kronvall, 1980; Yarnall et Boyle, 1986) mais aussi d'autres bactéries Gram positif et Gram négatif (Lindahl et Kronvall, 1988; Yarnall *et al.*, 1988; Grenier et Michaud, 1994), des virus (Yee *et al.*, 1982), des mycoplasmes (Sawa *et al.*, 1992) et des parasites (Balber et Sturtevant, 1986) exprimaient des protéines liant les Ig de façon non-immune.

Les protéines liant les immunoglobulines de manière non-immune (PLIg) des staphylocoques et des streptocoques ont été les plus largement étudiées et leur différence de réactivité pour les Ig de divers mammifères a permis de définir six types de récepteurs à Ig (Myhre et Kronvall, 1977). Le type I représente la protéine A de *S. aureus*. Le type II est décrit chez les streptocoques du groupe A (Yarnall et Boyle, 1986). Le type III correspond à la protéine G des streptocoques des groupes C et G (Kronvall, 1973; Björck et Kronvall, 1984). Le type IV a été identifié chez des streptocoques bovins β -hémolytiques appartenant au groupe G. Finalement, les types V et VI ont été décrits chez différentes souches de *Streptococcus zooepidemicus* (Myhre et Kronvall, 1980; Reis *et al.*, 1988). Cette classification est résumée dans la Figure 1.

	Type I	Type II	Type III	Type IV	Type V	Type VI	PLIg de <i>S. suis</i>
Humain	●	●	●	●	●	●	+
Lapin	●	●	●	●	●	●	+
Porc	●	●	●	●	●	●	+
Souris	●	○	●	□	●	●	+
Rat	●	○	●	□	□	●	ND
Vache	●	●	●	○	●	●	+
Chèvre	●	○	●	○	●	●	ND
Mouton	●	●	●	○	●	●	ND
Chat	●	○	○	●	□	ND	ND
Chien	●	○	●	ND	○	ND	ND
Poule	□	□	□	□	□	□	+

Figure 1. Classification fonctionnelle des protéines bactériennes liant de façon non-immune les IgG de différentes espèces animales. Pour les types de I à VI; le cercle plein représente le degré d'affinité pour l'IgG, sa grandeur est proportionnelle à l'affinité; le cercle vide, aucune affinité; ND, non déterminé. Pour la PLIg de *S. suis*, + représente une réactivité et ND, non déterminé (modifiée de Boyle et Reis, 1990 et de Serhir *et al.*, 1995)

Les récepteurs Fc bactériens interagissent avec leur ligand, l'Ig, de manière hautement spécifique. La nature de cette interaction a été clairement établie dans le cas des récepteurs Fc de type I et III, par contre elle est moins connue dans le cas des autres récepteurs Fc ou Fab. Avant de décrire les différentes PLIg, nous allons d'abord considérer la structure de l'Ig pour une meilleure compréhension de l'interaction.

1. 2. Structure de l'immunoglobuline

L'Ig est formée de deux chaînes lourdes (H) identiques d'environ 50 kDa chacune et de deux chaînes légères (L) identiques d'environ 25 kDa par chaîne (Figure 2). Sa Mr totale est approximativement de 150 kDa. Les chaînes légères font partie de la région Fab, tandis que les chaînes lourdes sont réparties entre les régions Fab et Fc. Un pont disulfure (S-S) relie les chaînes lourdes et légères entre elles et un nombre variable de ponts disulfures, selon la classe et sous classe de l'Ig, relie les chaînes lourdes. Les régions Fab et Fc sont reliées par une région charnière, conférant ainsi une certaine flexibilité à l'Ig.

La chaîne L existe sous deux formes connues comme kappa (κ) et lambda (λ). La chaîne H existe sous cinq formes connues comme gamma (γ) pour les IgG, alpha (α) pour les IgA, mu (μ) pour les IgM, delta (δ) pour les IgD et epsilon (ϵ) pour les IgE. Chez l'homme on distingue quatre formes pour les IgG: γ_1 , γ_2 , γ_3 et γ_4 correspondant aux sous classes IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 respectivement. Dans une même molécule, les deux chaînes H sont identiques ainsi que les deux chaînes L, des molécules hybrides ne sont pas retrouvées.

L'Ig est organisée en 12 domaines, possédant chacun un pont disulfure interne. La chaîne L consiste en deux domaines, une région variable (V_L) et une constante (C_L), retrouvées seulement dans le bras Fab. La chaîne H consiste en quatre domaines, V_H et C_{H1} retrouvés dans le bras Fab, C_{H2} et C_{H3} retrouvés dans le bras Fc. Chaque région variable est constituée d'une région hypervariable (CDR) et d'une région charpente (FR). Tous les domaines, exceptés C_{H2} , sont associés latéralement avec un autre domaine, phénomène connu sous le terme interaction en trans ou «domain pairing». Les domaines C_{H2} ont deux chaînes glucidiques (CHO) liées en N et interposées entre eux. Des forces de van der Waals et des liaisons hydrogènes relient les deux sous-unités de C_{H3} formant ainsi un dimère compact réduisant ainsi l'accessibilité aux solvants. La liaison des deux C_{H2} par les chaînes

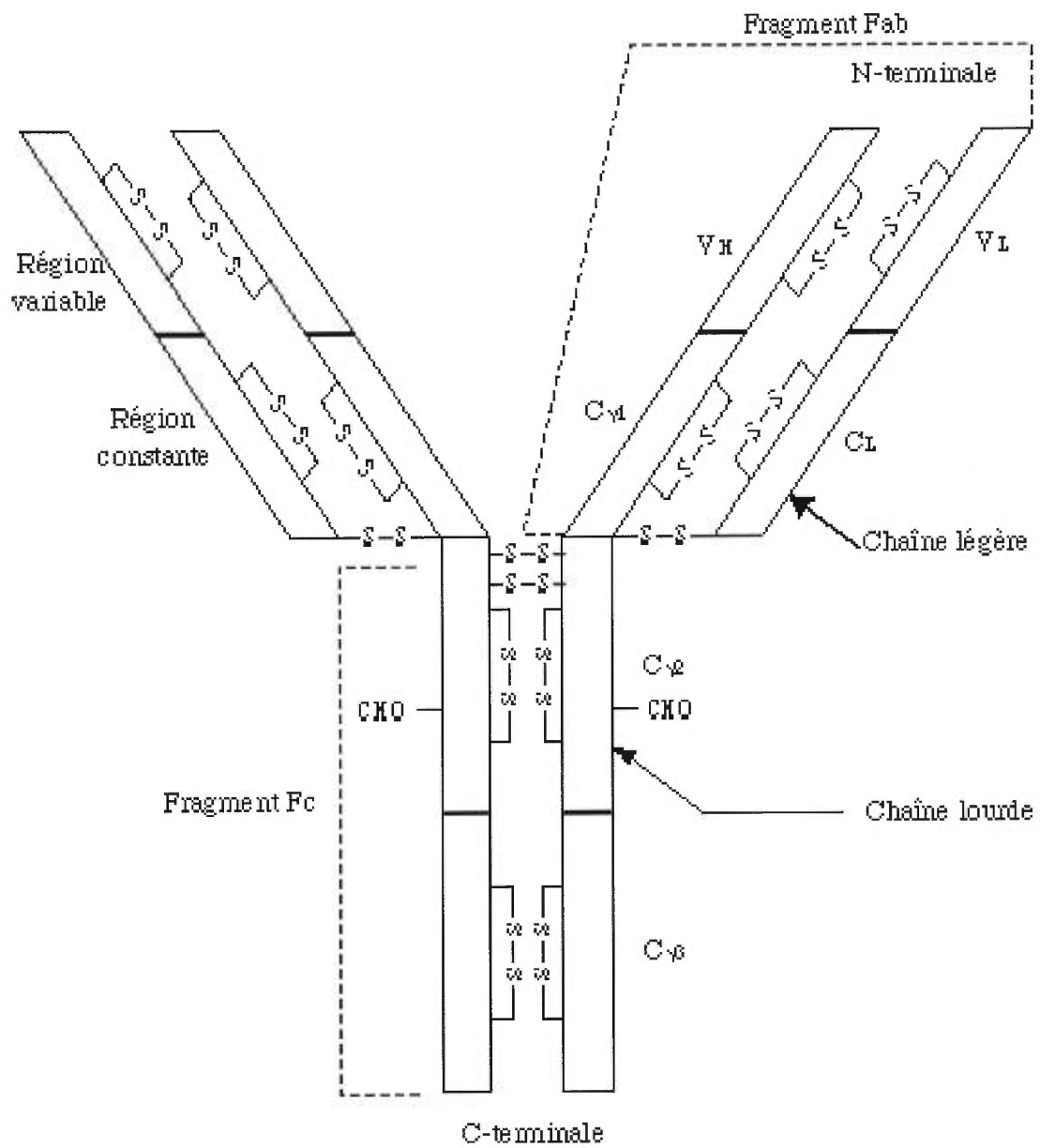


Figure 2. Représentation schématique d'une immunoglobuline G de mammifère. $M_r = 150$ kDa.

glucidiques agit comme subsitut de l'interaction interchaîne et contribue ainsi à la stabilité du domaine C_{H2} (Woof et Burton, 1990). L'analyse par cristallographie du Fc humain indique que plusieurs résidus du C_{H2} interrégissent longitudinalement avec des résidus du C_{H3} et que ces derniers sont hautement conservés (Deisenhofer *et al.*, 1976; Huber *et al.*, 1976). L'interaction entre C_{H2}-C_{H3} contribue à la stabilité du domaine C_{H2}.

1. 3. Récepteurs Fc et nature de l'interaction avec l'immunoglobuline

1. 3. 1. Type I

La protéine A (PA), produite par la plupart des souches humaines et quelques souches animales de *S. aureus*, est le «prototypé» des protéines liant les immunoglobulines par le fragment Fc (Langone, 1982). La souche Cowan I de *S. aureus* exprime, de façon stable, une quantité de PA supérieure à celles des autres souches de *S. aureus* (Boyle, 1990b). La souche Cowan I peut produire jusqu'à 1850 ± 200 ng/ml de PA retrouvées dans le surnageant de culture, alors que la souche Wood n'en produit que 162 ± 7 ng/ml (Reis *et al.*, 1983).

Il a été démontré que la souche Cowan I sécrète environ 9 % de la PA totale produite, 90 à 95 % reste liée à la surface et 1 % se retrouve dans le cytoplasme (Lindmark *et al.*, 1977). Plusieurs approches peuvent être utilisées pour solubiliser la PA de la membrane cellulaire, telle que l'extraction à la chaleur, à l'aide de détergents ou encore d'enzymes. Le produit le plus homogène est obtenu par traitement avec la lysostaphine (Sjöquist *et al.*, 1972). La protéine soluble obtenue peut ensuite être purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne contenant des IgG immobilisées (Hjelm *et al.*, 1972). La PA est stable à des pH extrêmes, elle peut résister 10 min à 80 °C et elle peut être radiomarquée sans perte de son activité liante (Boyle, 1990b). Sa masse moléculaire (Mr) varie de 42 à 45 kDa, avec un point isoélectrique de 5,1 et une viscosité intrinsèque de 29 ml/g suggérant qu'elle a tendance à polymériser pour donner une molécule de forme allongée (Langone, 1982). La PA démontre une forte réactivité avec les IgG humaines, porcines, canines et de lapins, et de plus faible affinité avec celles de souris, rat, vache, chèvre, mouton et chat (Boyle, 1990b). Une réactivité est aussi observée avec les Ig de certaines espèces aviaires incluant le canard, le colvert, la bécasse, le merle et l'étourneau (Erntell *et al.*, 1988b).

Le gène codant pour la PA a été cloné (Uhlén *et al.*, 1984). L'analyse de la séquence a

confirmé les travaux de Sjödhall (1977) suggérant que la PA serait formée de deux domaines fonctionnels, l'un responsable de la liaison aux IgG et l'autre, nommé région X, responsable de la liaison au peptidoglycane de la paroi bactérienne. La trypsinisation de la PA purifiée génère cinq fragments homologues d'environ 7 kDa (E, D, A, B et C) liant les IgG et un fragment inactif liant la paroi. Le fragment inactif ou région X est composé de deux domaines, un octapeptide répété 12 fois (Xr) qui lie la protéine à la paroi cellulaire et un domaine transmembranaire (Xc) non répété (Figure 3) (Moks *et al.*, 1986).

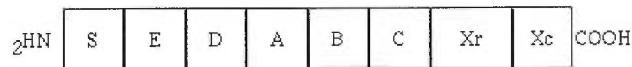


Figure 3. Représentation schématique de la protéine A de *Staphylococcus aureus*. Ss correspond à la séquence signal. E, D, A, B et C correspondent aux fragments homologues liant les IgG. Xr est la partie répétée de la région X suivie de Xc le domaine transmembranaire à l'extrémité carboxy-terminale (modifiée de Guss *et al.*, 1990).

En solution, le fragment B se lie entre les domaines C_{H2} et C_{H3} impliquant des résidus hydrophobes de l'extrémité C-terminale du C_{H2} et des résidus hydrophobes de C_{H3} (Deisenhofer, 1981). L'interaction PA-Ig, dans le cas des IgG1 humaines n'est pas modifiée par une alkylation, réduction ou délétion dans la région charnière (Klein *et al.*, 1981). La région C_{H2} - C_{H3} est présumément non perturbée par ces modifications. Le pH optimal pour l'interaction est de 8.0 (Akerström et Björck, 1986).

1. 3. 2. Type II

Streptococcus pyogenes est l'exemple le plus représentatif des streptocoques du groupe A. Les infections dues aux streptocoques du groupe A sont strictement associées à l'espèce humaine (Alouf et Muller-Alouf, 1996). Un des facteurs de virulence de *S. pyogenes* le plus étudié est la protéine M. La famille des protéines M comprend un large groupe de protéines multifonctionnelles qui affectent la phagocytose et qui lient les protéines du plasma. Les protéines M sont des molécules fibrillaires de 41 à 80 kDa (Alouf et Muller-Alouf, 1996) et sont exprimées à la surface cellulaire de la bactérie sous forme de

dimères, ancrés dans la membrane cellulaire et la paroi *via* leur extrémité C-terminale hautement conservée (Krebs *et al.*, 1996). Cette famille inclut les protéines M classiques et les protéines liant les IgG et/ou IgA (Kehoe, 1994).

Les PLIg de type II sont classifiées comme membre de la famille des protéines M en raison de leur ressemblance structurale (Husmann *et al.*, 1995) et de leur homologie de séquence (Bessen et Fischetti, 1992). Le type II représente le groupe le plus diversifié de PLIg dans une même famille de bactéries. Les PLIg de type II ont été classifiées en cinq formes fonctionnelles selon leur réactivité avec différentes sous classes d'IgG humaines, IgA et autres espèces d'IgG (Tableau 1) (Boyle *et al.*, 1994). Le traitement par le CNBr est le plus efficace pour la solubilisation dans le milieu de culture des PLIg présentes à la surface des streptocoques du groupe A (Raeder *et al.*, 1992).

La protéine M et la famille de la protéine M sont constituées à l'extrémité N-terminale d'une région contenant des séquences répétées internes, d'une région permettant la liaison à la membrane incluant un domaine riche en proline, glycine, thréonine et sérine (PGTS), ainsi qu'un domaine pour l'ancrage à la paroi à l'extrémité C-terminale (Figure 4) (Krebs *et al.*, 1996).

Tableau 1. Profil d'activité des différentes PLIg du type II exprimées par les streptocoques du groupe A (modifié de Boyle *et al.*, 1994).

Désignation fonctionnelle	Réactivité avec:						
	Immunoglobulines G humaines						
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgG lapin	IgG porc	IgG cheval
IIo	+	+	+	+	+	+	+
II'o	+	+	+	+	+	-	-
IIa	+	+	-	+	+	+	+
IIb	-	-	+	-	-	-	-
IIc	+	-	-	+	+	+	+

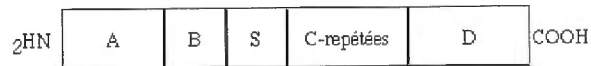


Figure 4. Représentation schématique de la protéine M1 exprimée par un streptocoque du groupe A. Les régions C-répétées et D possèdent une séquence en acide aminé hautement homologue tandis que A et B sont des régions non-homologues (modifiée de Cedervall *et al.*, 1995).

En se basant sur la séquence du domaine PGTS, la famille de ces protéines et de leurs correspondants peuvent être divisés en quatre sous-familles, FcrA/Mrp (Heath et Cleary, 1989), M de classe I, M de classe II et Enn (Haanes et Cleary, 1989). Les gènes respectifs *fcrA/mrp*, *emm* et *enn* se retrouvent dans un même locus chromosomal, à l'intérieur du régulon *vir* (Cleary *et al.*, 1991).

Le sérotype AP4 de *S. pyogenes* produit la protéine Mrp4 qui lie les Ig mais aussi le fibrinogène (Lindahl, 1989; Stenberg *et al.*, 1992). Une protéine de 42 kDa nommée Arp4 (pour "IgA receptor protein") est exprimée par des isolats du sérotype M4, elle lie les IgA, faiblement les IgG, mais non le fibrinogène (Lindahl et Akerström, 1989; Stenberg *et al.*, 1992). Certaines souches des streptocoques du groupe A de type M1 expriment en plus des produits du gène M1, la protéine H, une PLIg répertoriée dans le type II'o, capable de lier les quatre sous-classes d'IgG humaines mais ne possédant aucune affinité pour les IgA, IgD, et IgM (Gomi *et al.*, 1990; Raeder *et al.*, 1991a; Akesson *et al.*, 1994). Erntell *et al.* (1988b) montrent que les streptocoques du groupe A sont capables de lier les Ig du merle.

Par la suite d'autres protéines apparentées aux protéines M ont été décrites telles que la protéine Sir qui lie les IgG et IgA (Stenberg *et al.*, 1992) et la protéine ML2.2 qui lie les IgA seulement (Bessen et Fischetti, 1990). Également, la protéine Bac (liant les IgA) des streptocoques du groupe B (Stenberg *et al.*, 1994) et la protéine V des streptocoques du groupe G (Smirnov *et al.*, 1993) ont été répertoriées parmi les PLIg du type II. Une approche pour localiser le site du récepteur Fc de type II sur l'Ig a été d'utiliser des fragments d'IgG modifiés enzymatiquement pour inhiber l'interaction (Schroder *et al.*, 1986). Ni le fragment pFc'(dimère C_H3), ni le fragment F(ab')₂ ou un fragment Facb (sans C_H3) n'inhibe l'interaction. Ces résultats suggèrent que le site d'interaction nécessite la contribution des domaines C_H2 et C_H3. La modification chimique de l'IgG indique que les

tyrosines et histidines sont importantes pour la liaison des streptocoques du groupe A. L'interaction IgG-type II pourrait être semblable à celle de IgG-type I, impliquant les tyrosines et histidines de la région de l'interface C_H2-C_H3. Le site d'interaction du type IIb apparaît être strictement spécifique aux IgG3 humaines. La plus grande différence entre l'IgG3 et les autres sous classes humaines se situe dans la région charnière qui est plus étendue dans le cas de l'IgG3. On peut postuler que le site pour le type IIb sur IgG3 serait situé au niveau de cette région (Woof et Burton, 1990). Dans le cas de la protéine Arp, Åkerström *et al.* (1994) démontrent qu'elle lie la partie carboxy-terminale de la chaîne α de l'IgA. La force de la liaison est affectée par la formation du complexe et non par l'oligomérisation de l'IgA ou encore par la présence de la chaîne J.

1. 3. 3. Type III

Les PLI_g du type III sont présentes chez la majorité des souches de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus dysgalactiae*, ainsi que chez des isolats humains de streptocoques du groupe G (Reis et Boyle, 1990b). Pour une classification plus simple, le terme protéine G (PG) a été adopté pour les récepteurs Fc du type III (Björck et Akerström, 1990b). Indépendamment, Reis *et al.* (1986) ont démontré que la molécule isolée d'un streptocoque de groupe G ne se distingue pas de celle exprimée par un streptocoque de groupe C. Comparée aux autres types de PLI_g, la PG possède le plus large spectre d'affinité, elle semble lier les sous classes des IgG de presque toutes les espèces de mammifères (Reis *et al.*, 1984a) et même de certains aviaires (Erntell *et al.*, 1988b) sauf celles de la poule. Elle possède aussi la propriété de lier l'albumine (Sjöbring, 1992) et l' α_2 -macroglobuline (Jonsson et Müller, 1994).

La souche 26RP6G de *S. equisimilis* (groupe C) est le candidat de choix pour extraire la PG. Plusieurs procédures d'extraction ont été étudiées pour la purification, produisant diverses formes de PG, ainsi que des produits de dégradation (Reis et Boyle, 1990b). La solubilisation à la mutanolysine, une endo-N-acétylmuramidase hydrolysant le peptidoglycane de la paroi cellulaire, permet d'obtenir une protéine majeure de 65 kDa qui semble être la PG entière (Björck et Akerström, 1990b). Les propriétés physicochimiques de la PG suggèrent qu'il s'agit d'une protéine filamenteuse similaire à la PA (Björk *et al.*, 1972) et aux protéines M (Fischetti *et al.*, 1976). Tout comme la PA, la PG est de nature

acide (Björck et Akerström, 1990b). Les streptocoques du groupe L expriment aussi une activité IgG liante identique à celle décrite chez *S. dysgalactiae* (Lämmler et Blobel, 1990).

Fahnestock *et al.* (1986) clonent le gène *spg* codant pour la PG. La PG est organisée de façon similaire aux protéines A et M, avec des séquences répétées d'acides aminés. Proche de l'extrémité C-terminale, elle possède une région riche en proline, appelée W, qui est impliquée dans la liaison avec la paroi cellulaire. En C-terminale, elle possède une région appelée M impliquée dans l'ancrage de la protéine au niveau de la membrane. Le peptide signal (S_S) est situé à l'extrémité N-terminale suivi des différentes séquences répétées E, A, B, C et D (Figure 5). Les régions C et D seraient responsables de la liaison aux IgG (Guss *et al.*, 1986). Le pH optimum pour l'interaction du type III à l'IgG est de 4.0 - 5.0 et diffère donc de celui de la PA (pH 8.0), suggérant ainsi des mécanismes moléculaires différents pour l'interaction (Akerström et Björck, 1986). Comme pour le type II, l'approche enzymatique a été la première utilisée pour identifier le site de liaison de la protéine sur l'IgG. Aucun des fragments utilisés n'a été capable d'inhiber la liaison. La modification chimique suggère que les tyrosines et histidines de l'IgG au niveau du C_H2 - C_H3 sont cruciales. Le site de liaison pourrait être semblable à celui du type I et II et se trouver dans l'interface des domaines C_H2 - C_H3 (Woof et Burton, 1990).

Récemment, Kato *et al.* (1995) proposent un modèle basé sur des analyses de spectroscopie en résonance magnétique nucléaire pour le complexe entre la protéine et le fragment Fc de l'IgG en solution. Comme pour la PA, la PG se lie au niveau de l'interface des domaines C_H2 - C_H3 . Par contre, l'orientation des hélices diffère de 180^0 permettant ainsi au troisième brin du feuillet β de la protéine d'interagir uniquement avec le domaine C_H3 . Cependant le C_H2 contribue plus fortement à l'interaction de l'IgG avec la PA (Kato *et al.*, 1995).

1. 3. 4. Type IV

Suite à la découverte de la PA, Myhre et Kronvall (1977) entreprennent l'analyse systématique des autres bactéries pour l'expression des PLIg. Les PLIg exprimées par les streptocoques bovins β -hémolytiques du groupe G ont un profil de réactivité différent de celui des autres PLIg, ces protéines ont alors été désignées du type IV (Myhre et Kronvall, 1981). Les PLIg de type IV lient préférentiellement les sous-classes IgG1 et IgG4 humaines

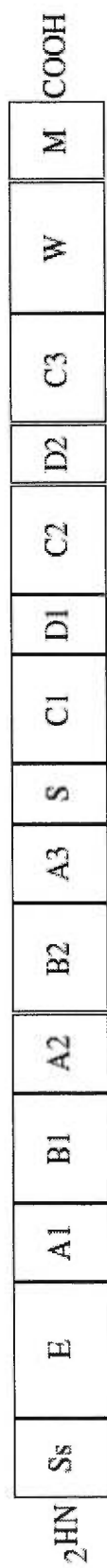


Figure 5. Représentation schématique de la protéine G. Ss correspond à la séquence signal; C et D aux domaines de liaison avec les IgG; W au domaine de liaison avec la paroi et M permet l'ancrage de la protéine dans la membrane (modifiée d'Olsson *et al.*, 1987)

par rapport à celles des bovins (Reis *et al.*, 1990), mais aussi à celles du porc, lapin et certaines sous-classes d'IgG équine.

Plusieurs techniques ont été utilisées pour solubiliser la PLIg de type IV. La méthode permettant d'avoir le plus de PLIg fonctionnelle est un traitement de la bactérie avec des acides chauds. L'analyse du surnageant par SDS-PAGE et immunobuvardage montre deux bandes majoritaires de Mr d'environ 58 et 116 kDa (Raeder *et al.*, 1991b). Le matériel obtenu démontre une hétérogénéité de taille considérable. Ainsi, en utilisant la même technique, Reis *et al.* (1990) observent une seule protéine majoritaire de 75 kDa après SDS-PAGE et immunobuvardage. La purification d'une PLIg de type IV sur une colonne de chromatographie d'affinité donne une protéine perdant rapidement son activité liante (Raeder *et al.*, 1991b), elle devient donc difficile à étudier. Le type IV ne peut être un outil intéressant comme réactif immunochimique en raison de sa faible affinité et de son spectre d'activité étroit pour les différentes Ig. Afin de déterminer le site d'interaction sur le Fc, une comparaison de séquences entre les domaines C_{H2} et C_{H3} des sous classes d'IgG humaines a été entreprise. L'étude révèle que tous les acides aminés conservés chez les IgG1 et IgG4 le sont aussi chez les IgG2 et IgG3. Ainsi, cette dernière n'offre aucune explication en ce qui concerne la spécificité de la liaison du récepteur Fc de type IV (Woof et Burton, 1990).

1. 3. 5. Type V

Les isolats non humains des streptocoques du groupe C furent analysés pour la présence de récepteurs Fc à leur surface. Une nouvelle PLIg fût mise en évidence chez *Streptococcus zooepidemicus*, cette dernière ne correspond à aucun des types précédemment décrits, elle fût désignée type V (Myhre et Kronvall, 1980). *S. zooepidemicus* est l'agent étiologique d'une variété de syndrômes cliniques chez les chevaux. Tout comme la PA, ce récepteur Fc possède une activité pour les IgG1, IgG2 et IgG4 humaines et aucune pour les IgG3 humaines. Par contre ce récepteur Fc est capable de lier les IgG d'autres espèces (Myhre et Kronvall, 1980).

Après une extraction à la chaleur, l'analyse par SDS-PAGE et immunobuvardage montre deux bandes de Mr d'environ 45 et 130 kDa réagissant avec des fragments Fc d'IgG équine. Lorsque la PLIg de 130 kDa est électroéluée et soumise de nouveau à un SDS-

PAGE, elle migre au même niveau que la protéine de 45 kDa, ceci suggère que la protéine de 130 kDa est un trimère. La Mr et le profil d'activité des PLIg du type V varient selon les isolats (Yarnall et Widders, 1990). Les PLIg du type V ont un spectre de liaison pratiquement similaire à celui de la PA, à part qu'elles ne lient pas les IgG canines ou félines. Cette similarité dans la spécificité de liaison pourrait indiquer que le site de liaison potentiel se trouverait dans la région de l'interface C_H2-C_H3 (Woof et Burton, 1990).

1. 3. 6. Type VI

Une souche de *S. zooepidemicus* (S212) démontre une activité IgG liante, dont le profil fonctionnel est distinct de celui du type V (Reis et Boyle, 1990a). Un nouveau profil est ainsi décrit et correspond au type VI. Deux protéines majeures sont obtenues après traitement avec des acides chauds, une de 90 kDa et l'autre de 46 kDa. Le type VI est le seul à réagir avec les IgG de rat, cette protéine pourrait être utile pour une variété de techniques immunologiques impliquant les Ig de rat. Par sélection de colonies individuelles, Reis et Boyle (1990a) ont pu obtenir une souche exprimant des quantités élevées de PLIg ayant une forte affinité pour les IgG de rat. Les séquences d'IgG de rat sont encore mal connues rendant très difficiles des explications pour cette haute affinité en terme de localisation de site sur l'IgG (Woof et Burton, 1990).

1. 3. 7. Autres types de protéines liant les immunoglobulines

Les IgD se retrouvent, en faible quantité, au niveau du sérum humain et sont surtout localisées à la surface des lymphocytes B (Tedder, 1990). Des protéines liant les IgD sont décrites chez *Branhamella catarrhalis* (Forsgren et Grubb, 1979) mais aussi chez *Haemophilus influenzae* et des souches appartenant aux groupes A, B, C, et D des streptocoques. Le rôle de ce type de réactivité dans la pathogénie est peu connu. (Tedder, 1990; Janson *et al.*, 1992). Nielsen *et al.* (1981) décrivent chez un Gram négatif, *Brucella abortus*, une protéine qui possède une affinité non-immune pour le fragment Fc des IgM. Une protéine d'environ 58 kDa liant les Ig est mise en évidence chez les streptocoques du groupe U et possède une forte affinité pour les IgG de souris et de rat mais aussi pour les IgG humaines, de chien, lapin, chèvre, mouton, cheval et veau (Chhatwal et Blobel, 1987). Chez *Haemophilus somnus*, un groupe de PLIg de haute Mr (de 130 à 150 kDa) est mis en

évidence, ainsi qu'une protéine de 76 kDa (Corbeil *et al.*, 1997). *Yersinia pestis* exprime une protéine nommée PsaA ayant un spectre d'affinité pour les IgG restreint (Zav'yalov *et al.*, 1996). *Taylorella equigenitalis*, un pathogène équin, exprime une PLIg se liant fortement aux Fc et Fab des IgG équines avec des différences dans le degré, suggérant que la spécificité de liaison peut impliquer un épitope dans la région charnière de la molécule d'Ig (Widders *et al.*, 1985).

Les protéines de chocs thermiques (Hsp) sont des protéines hautement conservées chez toutes les cellules procaryotes et eucaryotes. Elles sont généralement présentes dans les cellules à un niveau basal, mais leur quantité augmente en état de stress. Une protéine de 60 kDa produite par *Helicobacter pylori* présente en plus de sa fonction Hsp, une activité non-immune pour les IgG (Amini *et al.*, 1996).

Prevotella intermedia, un pathogène anaérobie impliqué dans les maladies parodontales exprime une protéine d'environ 65 kDa, liée à l'enveloppe cellulaire et possédant une activité liante non-immune pour les IgG (Labbé et Grenier, 1995). Un autre pathogène causant des parodontites juvéniles, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, exprime une activité liante pour les IgG. Ce récepteur Fc de 25 kDa est lié à la membrane cellulaire, mais est aussi retrouvé dans le matériel capsulaire et le surnageant de culture (Mintz et Fives-Taylor, 1994). Par la suite l'expression de nouvelles PLIg par d'autres bactéries de la cavité buccale tel que: *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Capnocytophaga* sp., *Veillonella* sp., *Streptococcus mutans*, *sanguis*, *mitis*, *salivarius*, *intermedius* et *Prevotella loescheii* ont été mises en évidence (Grenier et Michaud, 1994).

Certaines souches d'*E. coli* de la collection de référence ECOR expriment des PLIg. En SDS-PAGE, ces PLIg se retrouvent en multiples bandes de Mr apparentes variant de 110 à 195 kDa. Ces dernières sont associées à la membrane (Sandt *et al.*, 1997). D'autres recherches ont permis de mettre en évidence des PLIg chez *Schistosoma* (Torpier *et al.*, 1979), chez *Trypanosoma* (De Miranda-Santos et Compos-Neto, 1981), chez le virus Epstein-Barr (Yee *et al.*, 1982) et le virus de l'herpès (Christensen et Schalèn, 1990).

1. 4. Récepteurs Fab et nature de l'interaction

Après la découverte des liaisons non-immunes *via* le Fc des Ig impliquant des

protéines bactériennes, certains auteurs démontrent que la PA de *S. aureus* est capable de lier les Ig *via* la région Fab (Endresen, 1979; Ingnas, 1981). Le terme liaison non-immune alternative fût proposé pour la distinguer de la liaison non-immune *via* le fragment Fc des Ig (Ingnas, 1981; Erntell *et al.*, 1983).

Des expériences d'inhibition utilisant des fragments (Fab')₂ et Fc purifiés démontrent qu'aucun de ces fragments n'interfère dans la liaison de l'autre, suggérant ainsi la présence de deux sites différents sur la protéine (Erntell *et al.*, 1985). Par contre, la liaison de la PA aux IgM semble être exclusivement de type alternatif (Ingnas, 1981). En utilisant des anticorps de spécificité connue, Endresen (1979) démontre que le site de liaison de la PA sur le Fab se fait en dehors du site de liaison de l'antigène. Erntell *et al.* (1986) démontrent par des tests d'inhibition que le site de liaison de la PA sur le Fab se situe au niveau de la chaîne lourde et plus précisément au niveau du V_H.

La capacité pour les streptocoques à lier le (Fab')₂ a été démontrée seulement chez les souches possédant un récepteur Fc de type III et IV. Dans le cas de la PG, après séparation par électrophorèse de quatre fragments de Mr 28, 35, 42 et 65 kDa, Erntell *et al.* (1988a) démontrent que tous les fragments, sauf celui de 28 kDa, sont capables de lier le Fab. La comparaison des séquences d'acides aminés de différents fragments démontrent que la liaison au (Fab')₂ impliquerait l'extrémité N-terminale de la protéine, tandis que celle au Fc se ferait par l'extrémité C-terminale (Myhre, 1990). En ce qui concerne le site de liaison sur l'Ig, Erntell *et al.* (Erntell *et al.*, 1985) démontrent par des tests d'inhibition que le site de liaison de la PG sur le Fab se situe au niveau de la chaîne lourde. Par contre, ils ne sont pas arrivés à déterminer laquelle des régions V_H ou C_{H1} est impliquée dans la liaison. D'après l'analyse en spectroscopie en résonance magnétique nucléaire, la protéine G se lierait au bord du domaine C_{H1} du Fab (Kato *et al.*, 1995).

Les récepteurs Fab sont divisés en trois types. Le type 1 représente la PA de *S. aureus* (récepteur Fc de type I). Le type 2 représente la PG des streptocoques humains du groupe G, de *S. equisimilis* et de *S. dysgalactiae* (tous des récepteurs Fc de type III). Finalement le type 3 est représenté par la protéine L de 95 kDa produite par *Peptostreptococcus magnus*. La protéine L lie les IgG de lapin, de souris, de rat, de porc et d'humain (Myhre, 1990). Cette dernière lie les IgG exclusivement *via* les chaînes légères (Myhre et Erntell, 1985; Kastern *et al.*, 1990), avec une prédominance pour les chaînes κ (Björck, 1988). Elle

semble se lier à la région charpente du V_L (Nilson *et al.*, 1992).

Par la suite, des récepteurs Fab différents des types définis ont été mis en évidence. La protéine P de *Clostridium perfringens* démontre aussi une liaison non-immune alternative préférentiellement pour les IgM par rapport aux IgG et IgA (Lindahl, 1990). Les récepteurs Fc d'*E. coli* sont capables de lier le (Fab')₂ des IgG de l'âne mais pas celui des IgG humaines (Sandt *et al.*, 1997) tandis que ceux de *Prevotella intermedia* sont capables de lier le (Fab')₂ des IgG humaines (Labbé et Grenier, 1995).

1. 5. Relations antigéniques et fonctionnelles entre les PLIg

En comparant les protéines liant les IgG, des auteurs suspectent que ces protéines partagent des structures communes expliquant leur propriété commune et qu'elles lient des sites similaires ou identiques de la chaîne lourde des IgG. Il est à noter qu'aucun des six types décrits par Myhre et Kronvall (1981) ne lie les IgY de poule. Cette propriété fait de la poule l'espèce de choix pour la production d'anticorps polyclonaux reconnaissant les récepteurs Fc *via* la région (Fab')₂. Ainsi, en se basant sur les relations antigéniques et fonctionnelles, les protéines liant les IgG peuvent présenter trois profils différents.

1. 5. 1. Protéines distinctes antigéniquement et fonctionnellement

Des anticorps sont produits chez la poule contre les protéines des types I, II et III. Les anticorps anti-type I sont capables d'inhiber la liaison des fragments Fc à la PA, cependant ils sont incapables d'interférer avec la liaison des fragments Fc aux protéines des cinq autres types. De même les anti-type II et type III démontrent une spécificité sélective vis à vis des protéines correspondantes (Boyle et Reis, 1990). Ces résultats suggèrent qu'une classification reposant sur les structures antigéniques peut aboutir aux mêmes conclusions que celle basée sur la réactivité fonctionnelle.

1. 5. 2. Protéines reliées antigéniquement et fonctionnellement

Le type III possède le plus large spectre d'affinité. Ce type est isolé chez *S. equisimilis*, une souche humaine des streptocoques du groupe C (Reis *et al.*, 1984b). Par la suite, une protéine correspondante, la protéine G a été isolée à partir d'un streptocoque du groupe G (Björck et Kronvall, 1984). Une série d'études comparatives démontre que les

protéines des groupes C et G sont membres d'une même famille de protéines et sont identiques fonctionnellement (Boyle et Reis, 1990).

1. 5. 3. Protéines reliées antigéniquement mais distinctes fonctionnellement

En étudiant les protéines du type II associées aux streptocoques du groupe A, Yarnall et Boyle (1986) décrivent une souche (64/14), obtenue par 14 cultures en laboratoire de la souche 64, qui exprime trois protéines dont les activités fonctionnelles sont différentes. Le type IIa, représenté par deux protéines de faible et de forte Mr, lie les IgG1, IgG2, IgG4 humaines ainsi que les IgG de porc et de lapin. Ces protéines sont fonctionnellement identiques mais leur expression est régulée de façon opposée (Boyle, 1995). Par contre la protéine du type IIb possède une Mr de 38 kDa et lie exclusivement les IgG3 humaines. Ces trois protéines sont hautement reliées sur le plan antigénique, la différence fonctionnelle est probablement due à une variation du nombre d'acides aminés d'une protéine hautement conservée (Boyle et Reis, 1990).

1. 6. Rôle des récepteurs Fc dans la pathogénie

Etant donné que les PLIg sont retrouvées chez plusieurs pathogènes majeurs, elles doivent jouer un rôle important pour la survie de ces microorganismes. Jusqu'à maintenant, l'implication des PLIg dans la pathogénie est controversée, différentes études ont été entreprises et n'aboutissent pas aux mêmes conclusions.

Sachant que le C1q du complément se lie au niveau du C_H2 (Stanworth *et al.*, 1986), les PLIg se fixant pour la plupart au niveau du C_H2-C_H3, sont susceptibles de gêner la fixation du complément, empêchant ainsi la cascade de la voie classique du complément d'avoir lieu. De même, les PLIg doivent inhiber la cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps (Christensen et Schalèn, 1990).

Des expériences d'opsonophagocytose démontrent que la PA ou récepteur Fc de streptocoques purifiés empêchent l'action d'élimination dépendant du complément par les granulocytes humains envers des souches de streptocoques du groupe B ne produisant pas de PLIg (Christensen et Schalèn, 1990).

Il a été démontré que la protéine PsaA de *Y. pestis* a pour rôle de médier l'attachement de la bactérie aux macrophages, il est suggéré aussi que la liaison avec les

IgG humaines permettrait à la bactérie d'être complètement recouverte et d'échapper ainsi aux anticorps spécifiques (Zav'yalov *et al.*, 1996).

Le facteur rhumatoïde (RF), un anti-IgG produit par l'organisme, se lie aussi au niveau du C_H2-C_H3, il apparaît ainsi que le RF soit l'image interne du récepteur Fc microbien (Christensen et Schalèn, 1990). Il est connu que l'immunisation d'animaux avec des streptocoques induit la production d'anti-IgG (Bokisch *et al.*, 1972; Onica *et al.*, 1977). Les récepteurs Fc joueraient donc, *via* la production de RF, un rôle pathogénique dans l'arthrite rhumatoïdale (Christensen et Schalèn, 1990).

Des résultats contradictoires sont retrouvés par deux équipes, Patel *et al.* (1987) démontrent que des mutants négatifs pour la PA sont moins virulents que la souche sauvage, tandis que Jonsson *et al.* (1985) n'observent aucune différence. Par contre la production de la PA par *Staphylococcus intermedius*, une souche isolée du chien, suggère qu'il pourrait y avoir corrélation entre la sévérité de l'infection dermatologique du chien et la quantité de PA secrétée (Fehrer *et al.*, 1988).

Il semble, d'après l'analyse génomique chez *S. pyogenes*, que la protéine M, les PLIg de type II et la C5a peptidase constituent les éléments d'un locus de virulence obéissant à une régulation génétique coordonnée (McLandsborough et Cleary, 1995). Le rôle de ces récepteurs dans la pathogénie reste encore à établir avec certitude. Toutefois, plusieurs arguments plaident en faveur de leur implication dans la virulence de ces bactéries, leur invasivité tissulaire, leur rôle d'adhésion aux muqueuses et leur interférence avec les fonctions effectrices des Ig (Alouf et Muller-Alouf, 1996). Raeder et Boyle (Raeder et Boyle, 1993) démontrent que l'expression des PLIg est amplifiée suite à une pression sélective provoquée par des passages dans le sang.

Seulement 10 % des souches de *P. magnus*, une bactérie opportuniste, portent le gène pour la protéine L. Mais ces souches sont fréquemment associées aux infections, suggérant que la protéine L pourrait être un facteur de virulence (Kastern *et al.*, 1990). La protéine L est aussi capable d'induire le relâchement de l'histamine contenue dans les mastocytes et les basophiles humains, *via* une interaction avec les IgG cytophiliques (Patella *et al.*, 1990).

Dans leur étude récente sur les PLIg produites par les souches d'*Escherichia coli* de la collection de référence ECOR, Sandt *et al.* (1997) ne trouvent aucune corrélation entre la virulence des souches et la production des récepteurs Fc.

1. 7. Applications impliquant les récepteurs Fc

À ce jour, trois protéines liant les immunoglobulines ont été commercialisées. La protéine A est introduite sur le marché en 1978 par Pharmacia, la protéine G par Calbiochem en 1987 et la protéine L recombinante par Actinova Ltd en 1997.

Elles sont commercialisées sous forme libre, conjuguées à un marqueur ou immobilisées à une matrice. Les applications de ces dernières sont multiples et ne cessent de s'accroître.

La PA et la PG ont été les plus étudiées et donc sont largement utilisées dans les réactions d'immunoprécipitation, dans les essais de coagglutination, dans les travaux de microscopie immunoélectronique, pour détecter des antigènes de surface, pour purifier des IgG par chromatographie d'affinité et pour bien d'autres applications (Boyle, 1990a). Plus récemment la protéine L, liant exclusivement les chaînes légères κ de l'Ig, permettrait de purifier par chromatographie d'affinité aussi bien les IgG, IgM, IgA ou IgE de différents mammifères. Elle peut donc être utilisée dans les tests d'immunodiagnostic nécessitant la mesure de la réponse d'anticorps total.

Une meilleure connaissance des autres PLIg pourrait agrandir le spectre d'application de ces dernières en immunotechnologie et dans de potentielles applications thérapeutiques.

1. 8. Protéines liant les immunoglobulines de façon non-immune produites par *Streptococcus suis* sérotype 2

1. 8. 1. Rétrospective sur *Streptococcus suis*

Streptococcus suis est un coque Gram positif retrouvé en paires et rarement en courtes chaînes (Erickson *et al.*, 1984). En laboratoire, ce microorganisme est cultivé en aérobiose et préférentiellement dans des conditions microaérophiles. La plupart des souches produisent une hémolyse incomplète sur gélose au sang de bovin après 24 h d'incubation (Higgins et Gottschalk, 1990). Des études basées sur l'homologie des séquences d'ADN (Kilpper-Bälz et Schleifer, 1987) et sur le typage de l'ARN 16 S (Bentley *et al.*, 1991; Harel *et al.*, 1994; Chatellier *et al.*, 1998) montrent que *S. suis* est une espèce génétiquement homogène et non apparentée aux autres streptocoques du groupe D. Ainsi,

depuis 1987, *S. suis* est considéré comme une espèce appartenant officiellement au genre *Streptococcus* (Kilpper-Bälz et Schleifer, 1987). Actuellement 35 sérotypes sont décrits (types 1 à 34 et type 1/2). Le sérotype 2 est le plus souvent associé aux pathologies les plus sévères (Windsor et Elliott, 1975; Perch *et al.*, 1983; Gottschalk *et al.*, 1989; Gottschalk *et al.*, 1991; Gottschalk *et al.*, 1992; Higgins *et al.*, 1995) telles que des pneumonies, des méningites, des endocardites et des polysérosites (Higgins et Gottschalk, 1990; Vecht *et al.*, 1992; Devriese *et al.*, 1993) chez les porcs, bovins, caprins, équins, oiseaux et humains (Perch *et al.*, 1983; Arends et Zanen, 1988; Sihvonen *et al.*, 1988; Touil *et al.*, 1988; Devriese *et al.*, 1993; Devriese *et al.*, 1994). Tous les isolats du sérotype 2 ne sont pas pathogènes et la virulence varie selon l'isolat dans un même sérotype (Vecht *et al.*, 1989).

Plusieurs facteurs de virulence potentiels ont été récemment identifiés et partiellement caractérisés. Par microscopie électronique et après stabilisation à l'aide d'un sérum homologue, d'un marquage à la ferritine ou d'une fixation combinant la lysine et le glutaraldéhyde, Jacques *et al.* (1990) détectent sur toutes les souches de référence une capsule à leur surface, son épaisseur variant de 20 à 375 nm. La capsule du sérotype 2 est riche en acide sialique (Elliott et Tai, 1978), toutefois, l'acide sialique ne semble pas être un facteur de virulence important pour *S. suis* (Charland *et al.*, 1996). Des mutants de *S. suis* sérotype 2 sans capsule ont été produits, ces derniers sont avirulents dans un modèle d'infection chez le porc et la souris, et sont phagocytés plus rapidement que la souche sauvage par les macrophages de souris et les monocytes porcins (Charland *et al.*, 1998). Ces résultats démontrent l'importance de la capsule comme facteur de virulence pour *S. suis* de sérotype 2. Cette bactérie exprime aussi des fimbriae d'environ 2 nm de diamètre et jusqu'à 250 nm de long (Jacques *et al.*, 1990). Kurl *et al.* (1989) observent que *S. suis* possède une activité hémagglutinante, probablement due à une adhésine de nature protéique. L'activité hémagglutinante et la présence de fimbriae n'affectent pas nécessairement la virulence de *S. suis* mais pourraient probablement contribuer à la pathogénie du microorganisme (Gottschalk *et al.*, 1990). Vecht *et al.* (1992) rapportent que deux protéines de 110 et 136 kDa sont associées à la virulence. La protéine de 136 kDa est à la fois liée à la paroi et relâchée suite à un traitement à la muramidase, d'où le nom de «Muramidase Released Protein» ou MRP. Par contre la protéine de 110 kDa est retrouvée uniquement dans le surnageant de culture d'où le nom «Extracellular Factor» ou EF. Vecht

et al. (1992) démontrent que la sévérité des lésions dépend du phénotype de la souche et que le rôle de la protéine EF serait plus important que celui de MRP. D'autres protéines seraient impliquées dans la virulence de *S. suis*. Gottschalk *et al.* (1992) ont proposé une protéine de 44 kDa liée à la paroi et exprimée par une souche virulente du sérotype 2 mais absente chez une souche mutante avirulente. D'autres part, Quessy *et al.* (1997) ont décrit une protéine de 39 kDa capable de lier l'albumine. Cette liaison contribuerait probablement à augmenter la phagocytose par les macrophages ainsi que la survie à l'intérieur des phagocytes. Une hémolysine produite par *S. suis* sérotype 2 de Mr variant entre 54 et 65 kDa a été identifiée et partiellement caractérisée (Feder *et al.*, 1994; Jacobs *et al.*, 1994; Gottschalk *et al.*, 1995). Elles sont apparentées antigéniquement aux toxines cytolitiques liant le cholestérol. Leur rôle dans la pathogénie n'a pas encore été déterminé.

Vecht *et al.* (1991) suggèrent l'expression d'une protéine analogue à la protéine M, responsable des propriétés anti-phagocytaires, par *S. suis* sérotype 2. Par contre, Mogollon *et al.* (1992) examinent, par hybridation d'ADN, 55 souches de *S. suis* pour détecter le gène codant pour une protéine M. Aucune des souches de *S. suis* testées ne s'avère positive (Mogollon *et al.*, 1992).

Le ribotypage a été utilisé pour différencier les isolats virulents de ceux avirulents, mais les résultats n'ont pas été concluants (Beaudoin *et al.*, 1992).

1. 8. 2. PLIg de *Streptococcus suis*

Serhir *et al.* (1993) ont recherché la présence de PLIg chez *S. suis*. Des bactéries entières ont été incubées en présence d'IgG humaines et porcines conjuguées à des particules d'or et observées en microscopie électronique. Les deux souches de *S. suis* utilisées sont positives et l'activité est observée à la surface bactérienne. Par la suite, par immunobuvardage en présence d'IgG humaines et porcines, la présence de PLIg est détectée chez les 29 sérotypes de *S. suis* testés. Les Mr apparentes varient de 52 à 80 kDa et plus. Les profils sont identiques pour toutes les souches, et une bande majeure est visible vers 52 kDa (Serhir *et al.*, 1993). La variation de Mr pour les PLIg est aussi observée chez les streptocoques des groupes B et C (Yarnall et Widders, 1990). Par contre, le profil en immunobuvardage n'est pas identique pour les différentes souches de *S. suis* et les cinq souches de streptocoques du groupe D testées (Serhir *et al.*, 1993).

La liaison à l'IgG est médiée par une molécule protéique car l'activité disparaît suite à une digestion à la protéinase K (Serhir *et al.*, 1993). Il semble donc que la protéine de 52 kDa est commune à toutes les souches de référence de *S. suis* et pourrait servir de marqueur moléculaire pour une rapide identification de *S. suis*. En immunobuvardage, il est remarqué aussi que cette protéine est relâchée dans le surnageant de culture et qu'elle est capable de lier le fragment Fc des IgG humaines. Ces résultats suggèrent que la protéine de 52 kDa est un nouveau récepteur Fc et comme la plupart des récepteurs, il peut être lié à la membrane cellulaire et relâché dans le surnageant de culture (Yarnall *et al.*, 1988).

Serhir *et al.* (1995) purifient alors la protéine de 52 kDa par chromatographie d'affinité, à l'aide d'un gel ECH-Sepharose 4B (Pharmacia, Baie d'Urfé, Canada) couplé à des IgG de porc. L'activité liante aux IgG est retrouvée dans un même pic d'élution. Après SDS-PAGE et immunobuvardage, ils obtiennent deux bandes majoritaires, l'une à 52 kDa et l'autre à 56 kDa. Ils suggèrent que ces deux bandes représentent deux formes de la même protéine. Ils évaluent la concentration de la PLIg de *S. suis* à 400 ng/ml de surnageant de culture.

En microscopie électronique, cette PLIg a tendance à polymériser et donne des structures filamenteuses d'un diamètre approximatif de 4 nm (Serhir *et al.*, 1995). Plusieurs auteurs ont montré que les PLIg de type I, II, III et la protéine L ont tendance à se retrouver sous forme de molécules allongées (Björck et Akerström, 1990a; Björck et Akerström, 1990b; Schalèn et Christensen, 1990; Stenberg *et al.*, 1992). En ce qui concerne son spectre d'activité les PLIg de 52 et 56 kDa de *S. suis* sérotype 2 sont capables de lier les IgG de porc, d'humain, de bovin, de souris, de lapin et de poule (Figure 1). Elles sont, ainsi que les protéines de haute Mr (>80 kDa), capables de lier les IgA humaines. Elles réagissent aussi avec la fibronectine humaine, faiblement avec l'haptoglobuline humaine et pas du tout avec l'albumine humaine (Serhir *et al.*, 1995). Les PLIg de *S. suis* sérotype 2, de part leur spectre d'activité, ne font partie d'aucun des types de PLIg établies par Myrhe et Kronvall (1977). Parmi les PLIg connues, la PLIg de *S. suis* sérotype 2 est la seule à lier les IgY de poule. Par contre, la protéine de 52 kDa a plus de similarités avec les PLIg de type II, de par sa capacité à lier les IgA et sa structure filamenteuse. Il a été démontré que la déglycosylation de l'IgG, n'affecte pas les capacités de liaison des protéines de 52 et 56 kDa, indiquant que la chaîne glucidique de l'Ig ne participerait pas à l'interaction (Serhir *et al.*, 1995).

Des études menées par Salasia et Lämmli (1996) démontrent que des cultures des souches P43 et P143 de *S. suis* sont capables de lier les IgG-I¹²⁵, l'albumine- I¹²⁵, mais non l'haptoglobuline 2- I¹²⁵ humaines et les IgY-I¹²⁵ de poule. Ces contradictions entre ces deux équipes peuvent être dûes à la différence des tests utilisés pour la mise en évidence de l'activité liante des PLIg.

Serhir *et al.* (1995) déterminent la séquence N-terminale des 22 premiers acides aminés comme étant: SIITDVYAXEVLDSXGNPTLEV. Par comparaison avec la banque de donnée Swiss-Prot, aucune homologie avec d'autres protéines bactériennes n'a été montrée à ce moment là. La composition en acide aminé de la protéine de 52 kDa de *S. suis* indique qu'elle contient environ 506 résidus, riches en glycine, acide aspartique et glutamique et qu'elle contient de fortes concentrations en alanine et sérine. Le nombre de résidus acides est supérieur à celui des résidus basiques, ce qui est confirmé par son point isoélectrique de 4,6.

Le gène codant pour la PLIg de *S. suis* sérotype 2 a été partiellement séquencé. L'extrémité présumée 3' correspondant à 564 nucléotides montre des homologies avec différentes PLIg bactériennes. Une identité de 16 % et une similarité de 50 % pour 253 acides aminés a été observée avec la protéine M des streptocoques du groupe G. D'autres homologies ont été obtenues avec la protéine Emm 1 de *S. pyogenes* (26,4 % d'identité et 58 % de similarité pour 53 acides aminés); avec un récepteur Fc de type V de *S. zooepidemicus* (26 % d'identité et 60 % de similarité pour 100 acides aminés); ainsi que pour l'EMM 64/4 d'un récepteur Fc (25 % d'identité et 62 % de similarité pour 50 acides aminés). De même, 80 acides aminés transcrits de l'extrémité 3' de cette séquence partielle, montrent 71 % d'identité avec la protéine de 42 kDa de *S. pyogenes* liant la myosine. Deux régions différentes et répétées ont été identifiées dans la séquence nucléotidique de l'extrémité 3'. La région A est répétée neuf fois tandis que la région B est répétée quatre fois (Figure 6) (Serhir, 1995).

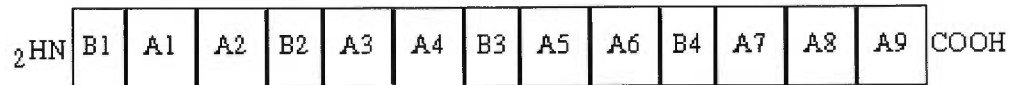


Figure 6. Représentation schématique des régions A et B répétées à l'extrémité 3' du gène codant pour la PLIg de *S. suis* sérotype 2 (modifiée de Serhir, 1995).

En utilisant des anticorps monoclonaux et polyclonaux dirigés contre différentes protéines de stress (Hsp), Benkirane *et al.* (1997) montrent par immunobuvardage une réactivité avec une protéine de 60 kDa de *S. suis* appartenants à différents sérotypes virulents et avirulents, de même que des IgG de lapin anti-PLIg 60 kDa de *S. suis* sérotype 2 réagissent avec des Hsp de différentes espèces bactériennes. Les travaux de Benkirane *et al.* (1998) démontrent que la protéine de 60 kDa de *S. suis* sérotype 2 a une fonction liant les Ig de façon non-immune et une fonction Hsp, tout comme la protéine de 60 kDa d'*Helicobacter pylori* (Amini *et al.*, 1996).

Afin de déterminer les sites responsables de la liaison aux différentes Ig sur la protéine, Benkirane *et al.* (1998) ont digéré la protéine dénaturée à l'aide de la protéase V8. Leurs résultats suggèrent trois sites potentiels différents de liaison, l'un reconnaissant les IgG de porc, bovin, humain et chèvre, un deuxième reconnaissant seulement les IgG d'humain et de chèvre et enfin un troisième pour les IgY de poule. La connaissance de la séquence nucléotidique complète de la PLIg de *S. suis* sérotype 2 est nécessaire afin de mieux délimiter les sites de liaison aux différentes Ig.

2. Les œufs de poule comme source d'anticorps

L'intérêt de l'utilisation en immunodiagnostic et immunothérapie de l'IgG de poule appelée IgY, a augmenté de façon marquée ces quinze dernières années, et ce en raison des différences structurales et fonctionnelles des IgY de poule par rapport aux IgG de mammifère. Les jaunes d'œufs ont été reconnus comme source d'anticorps peu coûteuse (Figure 7). Malgré tout, les IgY de poule ne sont pas encore largement utilisées comme source alternative aux IgG de mammifère. Une raison majeure est la difficulté de purification des IgY contenues dans le jaune d'œuf. Il est donc nécessaire de déterminer une

ou des stratégies efficaces pour séparer et purifier les IgY de l'œuf. Ces méthodes doivent être économiques ainsi que reproductibles à grande échelle.

2. 1. Composition de l'œuf

L'œuf est compartimenté en deux, le jaune et le blanc (Figure 7). Pour un jaune de 16,6 g, 8,1 g est composé d'eau, 2,78 g de protéine, 5,12 g de lipide et 0,3 g d'hydrate de carbone. Le blanc ne contient que des protéines, minéraux et vitamines, tandis que le jaune contient tous les lipides, un peu moins de la moitié de la quantité totale des protéines, une plus grande quantité de vitamines par rapport au blanc et des minéraux. Le jaune d'œuf est un aliment complexe pouvant être séparé par centrifugation à haute vitesse en particules appelées granules de couleur jaune et en un surnageant clair, le plasma (Stadelman et Cotterill, 1977). Le plasma (78 % du jaune d'œuf) est composé de lipoprotéines de faible et haute densité et de livetines qui sont des protéines de faible densité ne contenant pas de lipides. Les livetines représentant 10,6 % du poids sec du jaune d'œuf total, ont été séparées et identifiées comme β -livetine (α_2 -glycoprotéine), α -livetine (albumine du sérum de poule) et γ -livetine connue comme IgY (Williams, 1962).

2. 2. Transfert des IgY de la poule, du sérum à l'œuf

Comme pour les mammifères, les Ig maternelles aviaires sont transférées vers le futur poussin lui conférant ainsi une protection passive pour ses premiers jours. Le transfert des IgY du sérum *via* le jaune d'œuf vers l'embryon est analogue à la transmission inter-placentaire chez les mammifères. L'IgY est transportée activement du sérum vers l'ovocyte par un récepteur au niveau de l'épithélium folliculaire de l'ovaire (Loeken et Roth, 1983). Ce phénomène se produit 4 à 5 jours précédant l'ovulation (Liu et Higgins, 1990) et une concentration égale à celle du sérum maternel peut être atteinte. La phase d'accroissement de l'ovocyte permettant la mise en réserve de quantités considérables de vitellus correspond à la formation du jaune d'œuf à la surface duquel se trouve la cellule germinale. Lors de l'ovulation, l'ovocyte peut être fécondé en présence de spermatozoïdes. Fécondé ou non, il traverse les voies génitales femelles dont chaque portion contribue à la formation de l'œuf. Ainsi se forme l'albumen ou blanc contenant des protéines visqueuses (Silim et Rekik, 1992), exclusivement des IgA apparentées à celles des

mammifères (IgA-like) et des IgM provenant des sécrétions de l'oviducte (Rose *et al.*, 1974). La constitution de la coquille est la dernière étape de la formation de l'œuf avant la ponte. Dans le cas d'œufs fécondés, les IgA-like seront transportées de l'albumen vers le sac vitellin durant la dernière phase de développement de l'embryon (Kaspers *et al.*, 1996). Rose *et al.* (1974) ont démontré que les IgA-like et IgM sont transférées dans l'intestin de l'embryon par l'absorption du fluide amniotique. Ce transfert serait analogue à celui des IgG transférées par le biais du colostrum et du lait maternel chez le nouveau-né des mammifères. Par conséquent le jaune d'œuf ne contient ni IgM, ni IgA-like.

2. 3. Structure et caractéristiques physico-chimiques des IgY de poule

2. 3. 1. Introduction

Contrairement aux autres espèces de vertébrés, les espèces aviaires possèdent deux organes lymphoïdes primaires bien organisés, le thymus et la bourse de Fabricius où les cellules T et B se développent respectivement (Cooper *et al.*, 1966). Comme pour les mammifères, les cellules B expriment des récepteurs de surface dont les Ig, reconnaissant spécifiquement un seul antigène étranger (Masteller et Thompson, 1994). Seules les cellules induites se différencieront en plasmocytes sécrétant de haut taux d'anticorps. Fonctionnellement, les réponses immunitaires humorale et cellulaire chez les espèces aviaires ressemblent aux réponses immunitaires des mammifères (Benedict et Berestecky, 1987). Une autre différence concerne l'Ig majeur du sérum, l'IgG des mammifères n'a pas les mêmes caractéristiques physico-chimiques et fonctionnelles que celles des aviaires.

2. 3. 2. Structure et caractéristiques

Leslie et Clem (1969) ont proposé le terme IgY pour l'IgG aviaire de par ses différences structurales et fonctionnelles, mais ce terme n'est pas encore approuvé par l'ensemble des immunologistes (Benedict et Berestecky, 1987). Cette Ig est retrouvée chez les oiseaux mais aussi chez les reptiles, les amphibiens et probablement les poissons à poumons (« lungfish »). On retrouve aussi dans le sérum de ces animaux l'IgM pentamérique analogue à celui des mammifères et une Ig ressemblant aux IgA des mammifères (IgA-like). L'IgY, retrouvée aussi dans la littérature sous le terme IgG de poule, est formée de deux chaînes lourdes d'environ 67,5 kDa et de deux chaînes légères de

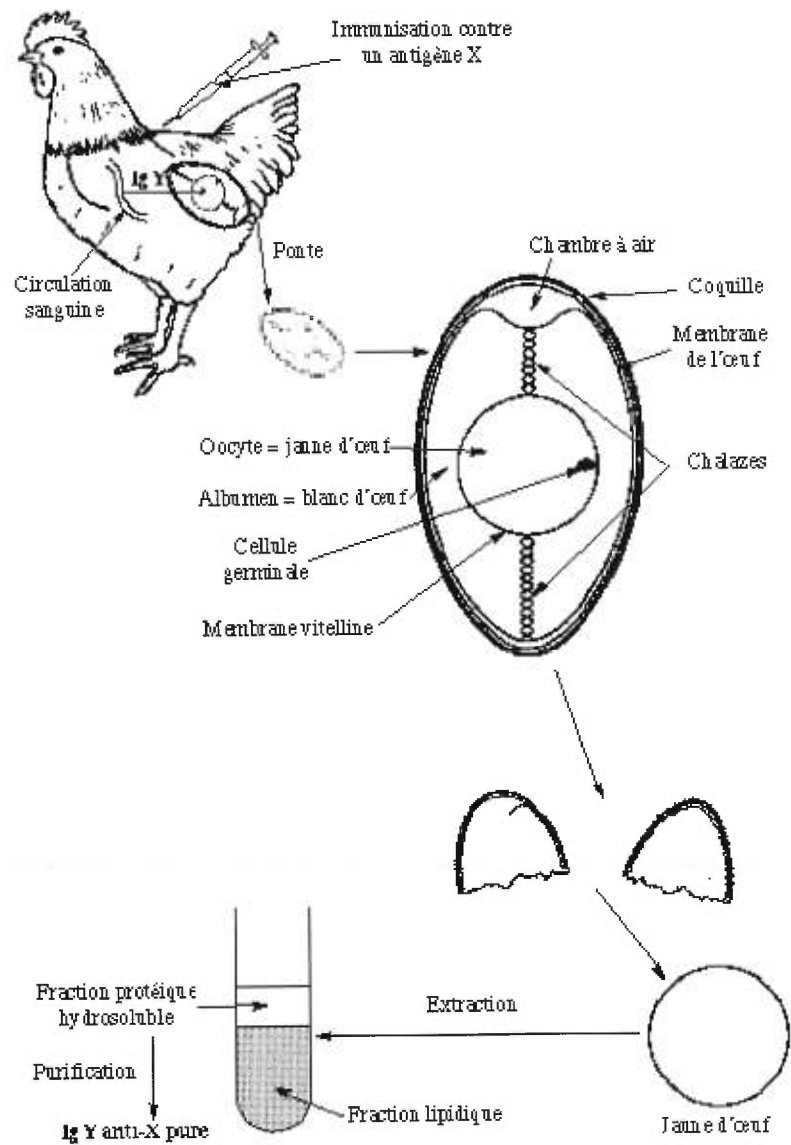


Figure 7. Schéma général pour la production d'IgY à partir d'une poule immunisée contre un antigène X. Les différentes étapes consistent en: l'immunisation de la poule, la récupération de l'œuf, l'extraction de la fraction protéique du jaune d'œuf et finalement de la purification des IgY.

22 kDa (Figure 8). Sa Mr totale est approximativement 179 kDa et son coefficient de sédimentation de 7,1. L'IgM a une Mr d'environ 180 kDa et de 900 kDa sous forme pentamérique, son coefficient de sédimentation est de 16,7 (Leslie et Clem, 1969). L'IgA-like est surtout retrouvée dans les sécrétions des surfaces mucoales sous forme monomérique ou polymérique et peu dans le sérum des aviaires. Sa Mr varie de 350 à 900 kDa, avec un coefficient de sédimentation de 9 à 16 (Benedict et Berestecky, 1987).

La chaîne légère des Ig aviaires existe sous une seule forme, λ , identique à celle des mammifères (Chen *et al.*, 1990). La chaîne lourde existe sous trois formes: upsilon (υ) pour l'IgY, alpha (α) pour l'IgA-like et mu (μ) pour l'IgM. Aucune sous classe d'Ig n'a été trouvée, toutefois certaines preuves indirectes indiquent la présence d'homologues aviaires aux IgD et IgE de mammifères (Benedict et Berestecky, 1987).

L'IgY est organisée en 14 domaines. Le fragment Fab est semblable à celui des IgG, par contre le fragment Fc comporte un domaine supplémentaire au niveau de chaque chaîne lourde: C υ 4 (Warr *et al.*, 1995). Des comparaisons de séquences des régions constantes des IgY et IgG ont montré que les domaines C γ 2 et C γ 3 ressemblent beaucoup plus aux domaines C υ 3 et C υ 4 des IgY respectivement (Magor *et al.*, 1994). L'équivalent du C υ 2 est absent dans les chaînes γ . Ce domaine se serait sûrement, au fil de l'évolution, condensé pour former la région charnière de l'IgG (Fellah *et al.*, 1993). Les IgY et IgA-like possèdent toutes les deux, quatre domaines constants dans leur chaîne lourde, mais sont dépourvues de région charnière (Parvari *et al.*, 1988). Par contre, l'IgY présente entre les domaines C υ 1-C υ 2 et C υ 2-C υ 3, des régions contenant des résidus proline et glycine, conférant à la molécule une flexibilité limitée (Helm *et al.*, 1991).

Certaines espèces ansériformes (canard et oie), quelques reptiles (tortue en particulier) et poissons à poumons (« lungfish »), expriment aussi une forme tronquée du IgY. À ces dernières, il manque les domaines (C υ 3, C υ 4) de la chaîne lourde, d'où l'appellation (Δ Fc)IgY (Grey, 1967; Zimmerman *et al.*, 1971; Leslie et Clem, 1972; Fellah *et al.*, 1993). Les formes longues et tronquées de l'IgY peuvent coexister chez un même individu (quelques tortues et oiseaux ansériformes), ou une seule forme est produite; la poule ne produit que la forme longue tandis que quelques tortues ne produisent que la forme tronquée (Grey, 1967; Leslie et Clem, 1969; Chartrand *et al.*, 1971).

L'IgY présente des ponts disulfures (S-S) intra- et inter-domaines au niveau du polypeptide

v. Tous les domaines C_v possèdent un seul pont disulfure intra-domaine, sauf pour le C_v1 qui en possède deux (Magor *et al.*, 1994). Ce phénomène est retrouvé chez les IgE des primates mais aussi au niveau de certaines chaînes γ , tel que celle du lapin (Martens *et al.*, 1984; Fellah *et al.*, 1993). Il a été reporté aussi la présence de deux ponts disulfures supplémentaires entre les chaînes lourdes au niveau du C_v2 - C_v3 , de même qu'un site de glycosylation supplémentaire au niveau du C_v3 par rapport aux IgG des mammifères. L'activité des IgY diminue à des pH proches de 3,5 et devient pratiquement nulle à pH 3.0, ainsi qu'après un chauffage pendant 15 min à 70°C et plus (Shimizu *et al.*, 1992). Des résultats similaires ont été reportés par Hatta *et al.* (1993). En conditions alcalines, l'activité est stable jusqu'à un pH de 11.0, mais diminue significativement à des pH >12.0, de même que l'IgY est plus susceptible aux protéases que les IgG de lapin (Shimizu *et al.*, 1992). L'IgG de lapin possède une liaison disulfide entre les domaines C_L et V_L de la chaîne κ , cette dernière occupe 95 % de la chaîne légère. Elle semble stabiliser la structure de la chaîne légère de l'IgG de lapin, diminuant ainsi l'inactivation de l'IgG dans des conditions acides, alcalines, chaleur ou en présence d'hydrochlorure de guanidine. Ce genre de liaison inexistant chez l'IgY doit être une des causes majeures de la plus grande sensibilité de l'IgY face à différents traitements dénaturants (Shimizu *et al.*, 1992). Des changements de la conformation de la structure secondaire de l'IgY à pH 2.0, ainsi qu'en présence de 3,5 M d'hydrochlorure de guanidine sont observés. La température correspondant au maximum de dénaturation endotherme a été calculée pour l'IgY et est de 73,9°C (Hatta *et al.*, 1993).

D'après Pilz *et al.* (1977), la région charnière permettant la flexibilité de l'Ig, influence l'ensemble des propriétés de l'Ig. Ainsi la rapide inactivation de l'IgY par différents traitements peut être causée par l'absence de région charnière chez l'IgY de poule. Le contenu en feuillets β de l'IgG de mammifères, généralement prédominant et important pour la structure secondaire, l'est moins dans le cas des IgY (Shimizu *et al.*, 1992). Plusieurs travaux laissent penser que l'IgY serait l'ancêtre de l'IgG et IgE des mammifères, cette théorie repose sur trois faits: la structure polypeptidique de la chaîne lourde, la structure et expression des gènes de la chaîne lourde et enfin sur la fonction de ces anticorps (Warr *et al.*, 1995).

En terme d'activité, l'IgY semble combiner les deux fonctions qui sont attribuées séparément aux IgG et IgE. Comme l'IgG, l'IgY est l'anticorps majeur de faible Mr du

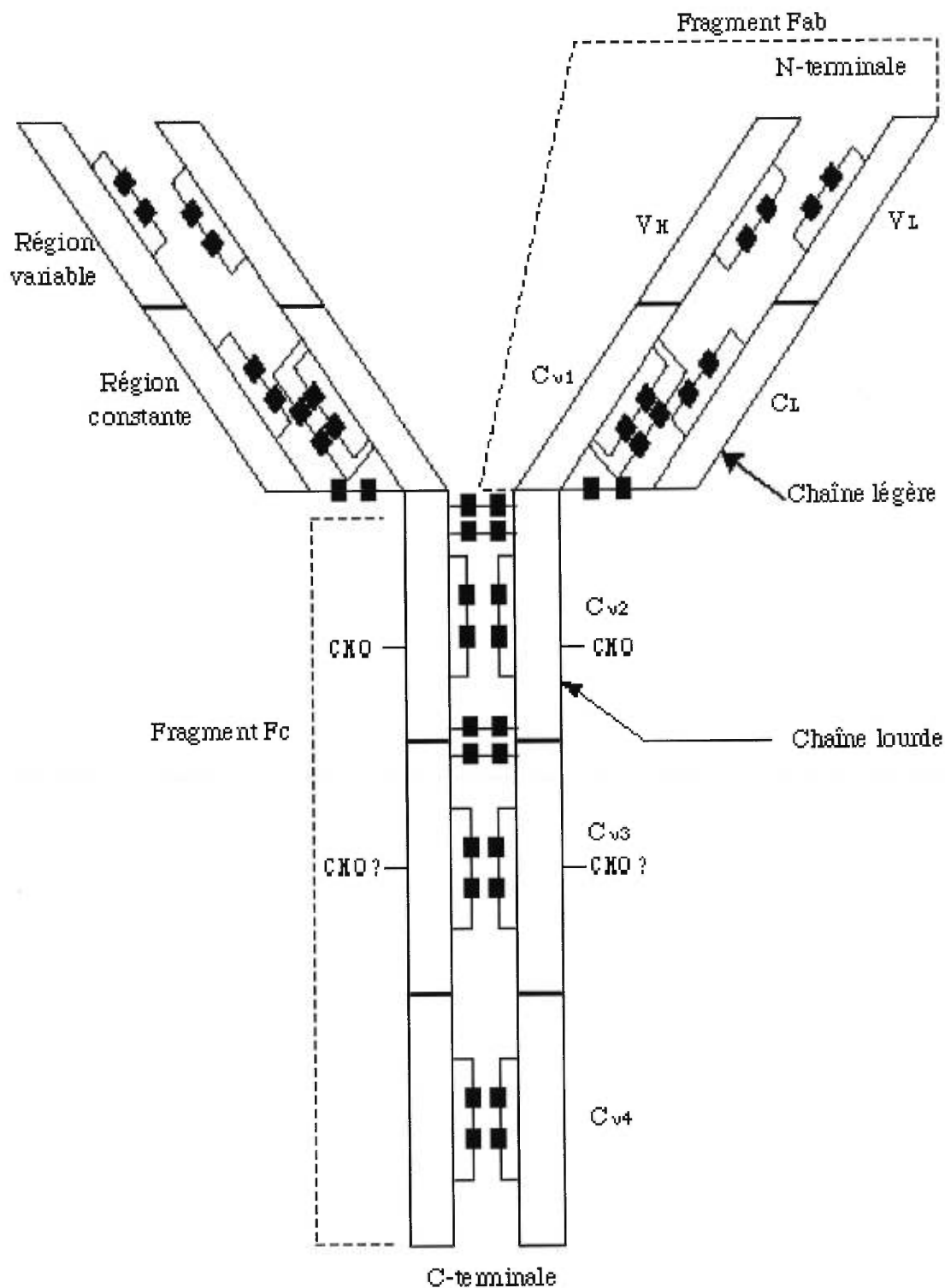


Figure 8. Représentation schématique d'une immunoglobuline Y de poule. ? représente un site hypothétique de glycosilation (modifiée de Warr *et al.*, 1995; Shimizu *et al.*, 1992). Mr = 179 kDa.

sérum et est responsable du mécanisme principal de défense contre les infections systémiques. Toutefois, comme l'IgE, l'IgY possède la capacité de médier les réactions anaphylactiques (Faith et Clem, 1973). D'ailleurs les IgG de cobaye ont conservé les propriétés anaphylactiques des IgY (Haynes *et al.*, 1978).

2. 4. Différentes techniques d'extraction de l'IgY contenue dans le jaune d'œuf

Afin de récupérer les IgY de l'œuf, trois grandes étapes sont nécessaires. La première consiste à séparer le blanc du jaune d'œuf, la deuxième à séparer la fraction hydrosoluble contenant les IgY des lipides du jaune d'œuf, finalement la troisième étape pouvant être décomposée en plusieurs sous étapes, selon la technique mise au point par les différents chercheurs, consiste à la purification de l'IgY à partir de la fraction hydrosoluble.

2. 4. 1 Séparation du blanc du jaune d'œuf

La séparation du jaune et blanc d'œuf peut se faire manuellement, le jaune est récupéré en prenant soin de ne pas déchirer la membrane vitelline. Certains auteurs ont décrit un rinçage du jaune à l'eau distillée (Polson *et al.*, 1980b; Svendsen *et al.*, 1995), d'autres le roulent sur du papier absorbant (Denzin et Henrion, 1996), ou utilisent les deux manières consécutivement (Akita et Nakai, 1993b). Cette étape permet d'éliminer le maximum d'albumine et de blanc d'œuf à la surface de la membrane. Certains rapportent l'utilisation d'un séparateur domestique (Svendsen *et al.*, 1995) ou encore d'un séparateur industriel, permettant de casser jusqu'à 2400 douzaines d'œufs par heure. Dans le cas d'un séparateur industriel, le jaune contient encore 5,5 % sur la base du poids sec de contaminant du blanc d'œuf (Fichtali *et al.*, 1994).

Dans tous les cas, la membrane vitelline du jaune d'œuf est par la suite perforée afin de laisser s'écouler le contenu, qui sera alors mélangé à de l'eau ou à un tampon selon la technique utilisée pour l'obtention de la fraction hydrosoluble.

2. 4. 2. Obtention d'une fraction hydrosoluble

La deuxième étape pour l'extraction des IgY du jaune d'œuf est l'obtention d'une fraction hydrosoluble (FH), résultant de la séparation des lipides et des livetines. Trois manières sont les plus souvent rapportées dans la littérature.

Une dilution dans de l'eau (pH 5.0) du jaune d'œuf, suivie d'une incubation à 4⁰C pendant 6 heures permet de récupérer un surnageant contenant seulement 1-2 % de contaminants lipidiques (Akita et Nakai, 1992).

Une délipidation du jaune d'œuf avec différentes gommés naturelles (ex. xanthane, alginate de sodium ou λ -carragenane) est aussi rapportée, par contre les auteurs démontrent que l' λ -carragenane est le plus efficace parmi les 12 gommés naturelles testées avec une efficacité de délipidation de 99,6 % (Hatta *et al.*, 1990).

Finalement, la troisième manière consiste à la formation de la FH par ajout de 3,5 % de polyéthylène glycol de Mr de 6000 Da (PEG 6000) (Polson *et al.*, 1980b). Ce composé induit la coagulation des substances lipidiques et des solides du jaune d'œuf. Polson (1990) améliore le rendement d'IgY contenu dans la FH en remplaçant le PEG 6000, par ajout du même volume de chloroforme à celui du jaune d'œuf.

La FH obtenue peut alors être utilisée pour la purification des IgY selon différentes techniques.

2. 4. 3. Purification des IgY à partir de la fraction hydrosoluble

Les méthodes recensées dans la littérature sont diverses, mais reposent souvent sur un même principe avec des produits différents. On peut donc les regrouper en grands groupes pour une meilleure compréhension.

2. 4. 3. 1. Précipitation

Polson *et al.* (1980b) rapportent que le PEG 6000 à 12 % est un meilleur précipitant que le sulfate d'ammonium, ou encore les solvants organiques, tel que l'éther et le toluène. Ils obtiennent un rendement de 70 % et récupèrent 6-12 mg/ml d'IgY. Ils améliorent la méthode (Polson *et al.*, 1985) en précipitant à nouveau les IgY obtenues dans 25 % d'éthanol à -20⁰C, de façon à éliminer le PEG contaminant. Les traces d'alcool peuvent être ensuite éliminées par évaporation ou dialyse. Clarke *et al.* (1994) modifient la technique de Polson (1990), en remplaçant la précipitation par le PEG 6000 à 12 % par deux précipitations avec le PEG 8000 à 14 %. Un rendement final de 75 \pm 5,4 % est obtenu avec 85 % de pureté d'IgY. Ces dernières dirigées contre une mycotoxine, l'ochratoxine A, se sont révélées être spécifiques du groupe, car elles réagissent aussi avec d'autres molécules

d'ochratoxine A apparentées.

La précipitation des IgY peut être obtenue par l'utilisation de sulfate de dextrane, auquel est ajouté du chlorure de calcium afin d'induire la précipitation de l'excès de sulfate de dextrane, suivie de deux précipitations au sulfate d'ammonium. Cette technique permet d'obtenir une pureté de 90 % (Jensenius *et al.*, 1981).

Akita et Nakai (1992) précipitent et purifient les IgY de la FH avec du sulfate d'ammonium, suivi de sulfate de sodium ou éthanol. Les IgY obtenues sont pures à environ 93 % avec un rendement supérieur à 98 %. Le sulfate d'ammonium comme précipitant a été aussi utilisée par Denzin et Henrion (1996). Après deux précipitations, le titre des IgY de poule dirigées contre *Aeromonas salmonicida ssp salmonicida*, est 4 à 5 fois supérieur à celui obtenu chez un lapin.

Une précipitation à l'acide caprylique à une concentration finale de 6 % suivie d'une précipitation au sulfate d'ammonium à une concentration de 1,75 M a permis d'obtenir 136 mg d'IgY par œuf par rapport à une concentration initiale de 371 ± 20 mg d'IgY par œuf (McLaren *et al.*, 1994).

Svendsen *et al.* (1995) comparent trois méthodes de purification d'IgY par précipitation soit au sulfate d'ammonium, au PEG 6000 ou à l'acide caprylique, chacune à des concentrations croissantes. En ce qui concerne le rendement des IgY, les meilleurs résultats sont obtenus à l'aide du sulfate d'ammonium, suivi du PEG 6000 et enfin de l'acide caprylique, avec des pourcentages de 61, 58 et 54 % respectivement. La pureté a été déterminée selon le nombre de bandes obtenus après SDS-PAGE et une coloration au nitrate d'argent. Le plus haut taux de pureté a été obtenu grâce au sulfate d'ammonium (6 bandes), tandis que le PEG 6000 a été moins efficace (11 bandes), l'acide caprylique n'a permis aucune purification des IgY, car aucune différence du nombre de bande n'a été observée (18 bandes).

2. 4. 3. 2. Ultrafiltration

L'ultrafiltration basée sur la différence de M_r , pour la séparation des IgY de la FH est difficilement réalisable et ceci dû à l'obstruction de la membrane par les lipides du jaune d'œuf. Akita et Nakai (1992) ont pu utiliser l'ultrafiltration avec succès, mais seulement après une séparation préliminaire par précipitation au sulfate d'ammonium. Cette étape

augmente la pureté des IgY de 30 à > 93 %. Récemment, Nakai *et al.* (1994) ont appliqué directement l'ultrafiltration à la FH, en ajustant le pH de la fraction à 9.0. Une pureté de 80 % d'IgY est obtenue avec un rendement de 95 %.

2. 4. 3. 3. Chromatographie échangeuse d'ions

Les celluloses échangeuses d'anions et cations ont été toutes les deux utilisées pour la purification d'IgY. La chromatographie échangeuse d'anions est reportée dans la littérature comme étape finale à la purification des IgY (Carroll et Stollar, 1983; Hatta *et al.*, 1990).

Une colonne de DEAE-Sephacel (cellulose diéthylaminoéthyl: échangeuses d'anions) a été utilisée pour séparer les IgY de la FH du jaune d'œuf obtenue de poules immunisées contre des lipopolysaccharides (LPS) d'*Escherichia coli* et de la β -lactoglobuline (McCannel et Nakai, 1990). Un rendement de 20,2 % a été observé avec une pureté de 40,1 %, dans le premier gradient d'éluion. Un test ELISA indique de hauts niveaux d'activité spécifique d'anticorps. Le second gradient permet l'éluion de 15,8 % des IgY appliquées, avec une pureté de 59,8 % mais avec une faible activité spécifique d'anticorps et spécialement pour les LPS. Cette technique est donc intéressante pour séparer les IgY immunologiquement actives d'une sous-population inactive. Hatta *et al.* (1990) obtiennent de meilleurs résultats à savoir 98 % de pureté avec un rendement de 70 %, avec la même colonne. Dans leur cas, la chromatographie est suivie de deux désalages avec du sulfate de sodium afin d'éliminer les derniers contaminants. Par contre, Svendsen *et al.* (1995) pensent que la chromatographie échangeuses d'ions utilisée pour la purification des immunoglobulines du sérum des mammifères n'est pas adaptée à celle des IgY du jaune d'œuf.

Fichtali *et al.* (1994) mettent au point un système automatisé de chromatographie en utilisant deux colonnes de 1,5 litres en série, d'un milieu de cellulose carboxyméthyle interliée (Indion HC-2) échangeur de cations. Ils obtiennent 60 % de rendement avec une pureté de 70 %. Leur système a l'avantage de pouvoir charger la colonne avec un plus grand volume de FH sans en altérer la pureté ou le rendement par rapport à une colonne de 50 ml. Akita et Nakai (1993a) comparent quatre méthodes de purification d'IgY de poules immunisées contre une souche d'*E. coli* entérotoxigène. Le principe commun aux 4 techniques comparées est la précipitation des granules soit par le PEG (Polson *et al.*, 1985),

par le sulfate de dextrane (Jensenius *et al.*, 1981), par les gommés de xanthane naturelles (Hatta *et al.*, 1990) ou par leur méthode de dilution dans de l'eau suivie d'une précipitation au sulfate de sodium, d'une ultrafiltration et d'une chromatographie échangeuses d'anions ou filtration sur gel. Leurs résultats suggèrent que le meilleur rendement et pureté des IgY sont obtenus avec leur méthode (rendement de 9,8 mg/ml, pureté de 94 %), suivi de celle au xanthane (7,3 mg/ml, 89 %), de celle au sulfate de dextrane (7,5 mg/ml, 87 %) et enfin par celle au PEG (4,9 mg/ml, 89 %). L'activité de l'IgY pour son antigène n'est affectée dans aucune des méthodes. L'activité de l'IgY est similaire pour le PEG, sulfate de dextrane et la méthode de dilution dans de l'eau, et supérieure par rapport à celle obtenue avec le xanthane et l'œuf non traité.

2. 4. 3. 4. Chromatographie par interaction de chélateurs de métaux

Cette méthode est largement utilisée pour séparer les immunoglobulines du sang (Al-Mashikhi et Nakai, 1988) et du petit lait (Al-Mashikhi *et al.*, 1988). Mc Cannel et Nakai (1989) démontrent que l'utilisation de la chromatographie par interactions de chélateurs de métaux ne permet pas une bonne séparation des IgY contenues dans la FH, contrairement aux IgG récupérées du sang ou petit lait. Ils obtiennent un rendement de seulement 27 % avec une pureté de 75 %. La raison suggérée est la différence de structure moléculaire de l'IgY par rapport à l'IgG de mammifères affectant ainsi l'exposition des résidus histidine nécessaire à la liaison des ions de métal *via* le groupement imidazole (Porath *et al.*, 1975).

2. 4. 3. 5. Chromatographie d'affinité spécifique

Les récepteurs Fc bactériens tel que les protéines A, G et L commercialisées sous forme immobilisée à des matrices insolubles ne lient pas les IgY de poule, comme nous l'avons vu précédemment. Ainsi la chromatographie d'affinité générale avec ce type de colonne ne peut être utilisée pour la purification des IgY.

La purification des IgY de la FH par chromatographie d'affinité ne peut alors se faire que dans le cas où l'antigène ayant servi à l'immunisation de la poule est immobilisé au gel. van Sommeren *et al.* (1996) immobilisent la gonadotropine chorionique humaine (hCG) au gel « N-hydroxysuccinimide-activated Sepharose 4 Fast Flow ». Par chromatographie d'affinité, ils purifient 330 mg d'IgY anti-hCG à partir de 100 œufs de poules immunisées

contre hCG, avec une pureté de 64 %.

2. 5. Comparaison de la spécificité, de l'avidité et du titre entre les IgY aviaires et les IgG de mammifères

Svendsen Bollen *et al.* (1996) comparent le titre et l'avidité des IgG et IgY produites respectivement dans le sérum de lapin et dans le sérum et le jaune d'œuf de la poule, suite à une injection d'IgG humaines contenues dans trois adjuvants différents: adjuvant complet de Freund (FCA), adjuvant incomplet de Freund (FIA) et adjuvant Titermax d'Hunter (HTM). Les titres d'anticorps obtenus chez le lapin se sont avérés être 1,5 à 2 fois supérieurs à ceux obtenus chez la poule. Par contre, la production d'anticorps chez la poule et plus particulièrement dans le jaune d'œuf, est 5 à 10 fois supérieure à celle du lapin selon l'adjuvant utilisé. Le FCA permet un titre d'anticorps 1,4 à 1,6 fois supérieur à celui du FIA, pour les deux espèces animales, et l'avidité des anticorps est la même pour les deux adjuvants.

Denzin et Henrion (1996) démontrent que la quantité d'IgY obtenue d'une poule est 4 à 5 fois supérieure à celle lapin et qu'elle aurait pu facilement être augmentée par une immunisation supplémentaire et une nouvelle collecte d'œufs. Par ELISA, dot-blot, la même équipe montre que les IgY de poule et IgG de lapin sont comparables en spécificité et sensibilité.

Durant une période de six semaines, 298 mg d'IgY contenues dans le jaune d'œuf de poules immunisées contre *Echinococcus granulosus* sont obtenues, comparé au 16,6 mg obtenus à partir du sérum de lapin immunisé contre le même organisme, soit 18 fois plus à partir de l'œuf (Gottstein et Hemmeler, 1985).

Voss et Watt (1977) montrent que la réponse d'anticorps chez la poule est caractérisée par une prédominance d'IgY de faible affinité, tandis que les sites actifs des IgG de lapins sont de forte affinité.

En comparant la production d'anticorps chez le mouton et la poule immunisés contre l'interleukine 6 humaine recombinante (rhIL-6), Woolley et Landon (1995) démontrent que les deux espèces produisent un antisérum de forte avidité et que la poule permet d'atteindre un taux d'avidité élevé inhabituel après une seule immunisation. Par contre, le mouton produit des anticorps hautement spécifiques, 10 fois supérieurs à ceux de la poule. Les IgG

de mouton reconnaissent moins spécifiquement la forme glycosylée (CHO-IL-6) du rhIL-6, qui ressemble beaucoup plus à la forme naturelle de l'IL-6. Ainsi, le haut degré de reconnaissance pour le CHO-IL-6 par les IgY peut être un avantage. Le titre atteint par les IgY de poule est toujours resté inférieur à celui des IgG de mouton (Woolley et Landon, 1995).

Dans une étude où mouton et poule furent immunisés contre un antigène étranger aux deux espèces, la réponse d'anticorps chez le mouton s'est avérée être 6 fois supérieure à celle de chez la poule (Erhart *et al.*, 1991).

Cette différence de titre peut être due à la demi-vie des IgG de mouton et IgY. Effectivement, l'IgG ovine a une demi-vie de 15 jours (Watson, 1992) tandis que celle de l'IgY de poule est de 35 heures (Patterson *et al.*, 1962). Les poules et moutons doivent sûrement produire des taux comparables d'immunoglobulines, mais le catabolisme rapide de l'IgY de poule ne permet pas son accumulation. Il a été démontré aussi (Polson *et al.*, 1980a) que la Mr de l'antigène utilisé pour l'immunisation de la poule est un facteur important pour un bon rendement d'IgY. Une meilleure réponse immunitaire est obtenue avec des antigènes de Mr >150 kDa, par rapport à ceux <30 kDa.

La sensibilité des IgY anti-ochratoxine A s'est révélée être généralement similaire à celle obtenue avec des anticorps polyclonaux de lapin et des anticorps monoclonaux de souris pour la même mycotoxine (Chu, 1990).

D'autres études indiquent que la spécificité et avidité des IgY de poule sont comparables à celles des IgG produites par les lapins, les souris et les cobayes (Fertel *et al.*, 1981; Bauwens *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1991).

2. 6. Applications impliquant les IgY

2. 6. 1. Avantages de l'utilisation des IgY

Les animaux les plus utilisés pour la production d'anticorps sont les lapins et les cobayes, ainsi que les chevaux, les chèvres et les moutons, mais à moins grande échelle (Polson *et al.*, 1980b), leur entretien étant dispendieux. Les lapins et cobayes sont souvent victimes de salmonellose, nécessitant l'extermination d'une partie ou de la totalité de l'élevage et d'une désinfection complète des cages afin d'éradiquer la maladie (Polson *et al.*, 1980b). Par contre, l'achat et l'entretien des poules sont plus économiques que ceux des

lapins (Wallmann *et al.*, 1990) et ces animaux sont moins susceptibles aux maladies (Nakai *et al.*, 1994).

Afin de produire des anticorps spécifiques à un antigène, il est nécessaire d'immuniser l'animal et de récupérer son sérum par plusieurs prélèvements sanguins espacés dans le temps ou par ponction cardiaque, nécessitant ainsi du personnel qualifié. Chez la poule, les IgY sont naturellement transmis à l'œuf et se retrouvent dans le jaune d'œuf tandis que les IgM et IgA-like se situent au niveau du blanc d'œuf (Rose *et al.*, 1974), ainsi le seul stress qu'aura l'animal sera celui de l'injection pour l'immunisation. Par la suite le ramassage quotidien des œufs ne nécessite pas de personnel qualifié. Les œufs stockés à 4°C peuvent être conservés jusqu'à six semaines sans qu'en soit altéré les anticorps (van Sommeren *et al.*, 1996). Une poule pond en moyenne 284,4 œufs par an (Canadian Egg Marketing Agency, 1997), sachant que la quantité d'IgY dans le jaune d'œuf varie de 9 mg/ml (Wang *et al.*, 1995) à 25 mg/ml (Rose *et al.*, 1974) et que le volume moyen d'un jaune d'œuf est de 15 ml, on peut s'attendre à une production d'IgY annuelle par poule de 40 à 100 g.

En règle générale, la réponse d'anticorps sera plus grande si l'antigène provient d'une espèce éloignée phylogéniquement de l'espèce animale immunisée. Les antigènes les plus étudiés sont d'origines humaines ou de mammifères, dans ce cas la poule semble être l'animal de choix pour la production d'anticorps par rapport au lapin ou au cobaye (Larsson et Sjöquist, 1990). Un autre avantage de la distance phylogénique est la faible quantité d'antigène nécessaire pour induire une réponse immunitaire. Tandis que Gassman *et al.* (1990) reportent que seulement 20-30 µg d'antigène induit une réponse chez la poule et que cette quantité est insuffisante pour le lapin, Mc Laren *et al.* (1994) démontrent que des quantités <2 µg sont suffisantes chez la poule. L'utilisation de la poule comme producteur d'anticorps contre des antigènes présents chez plusieurs espèces est intéressante pour les tests en médecine vétérinaire et en médecine des animaux de laboratoire, car ces anticorps produits contre une protéine d'une espèce pourront être aussi utilisés pour révéler la présence de la même protéine chez d'autres espèces animales (Svendsen *et al.*, 1995).

Alors que le lapin (Svendsen Bollen *et al.*, 1996) et le mouton (Erhart *et al.*, 1991) nécessitent l'injection de l'antigène avec un adjuvant tel que le FCA pour induire une réponse, la poule produit des anticorps spécifiques même lors d'une injection saline

contenant l'antigène (Steinberg *et al.*, 1970; Erhart *et al.*, 1991; Svendsen Bollen *et al.*, 1996). De même, le FCA est bien toléré par les poules, aucune réaction inflammatoire locale, généralement retrouvée chez les mammifères n'est observée chez la poule lors de l'utilisation du FCA (Gassmann *et al.*, 1990).

La poule a produit avec succès des anticorps spécifiques contre des haptènes (Fertel *et al.*, 1981), des macromolécules (Polson *et al.*, 1980b; McLaren *et al.*, 1994; van Sommeren *et al.*, 1996), des virus (Polson *et al.*, 1980b; Zrein *et al.*, 1986), des bactéries (Akita et Nakai, 1993a; Denzin et Henrion, 1996; Hatta *et al.*, 1997), des parasites (Gottstein et Hemmeler, 1985; Hassl *et al.*, 1987) et l'ARN polymérase II pourtant peu immunogénique chez le lapin et le cobaye (Carroll et Stollar, 1983).

Les IgY de poule offrent aussi les avantages, dues à leurs caractéristiques immunologiques, de ne pas activer le complément humain (Larsson *et al.*, 1992), de ne pas lier les anticorps hétérophiliques tel que le RF des mammifères (Larsson et Sjöquist, 1988; Larsson *et al.*, 1991) et de ne pas lier les récepteurs Fc des mammifères (Benson *et al.*, 1961). Des réactions croisées sont observées entre les anticorps anti-IgG de mammifères et les IgG de différentes espèces de mammifères, mais pas avec les IgY de poule (Shimizu *et al.*, 1992).

Un inconvénient selon l'application désirée, est que les IgY ne produisent pas de complexes de précipitations immuns en diffusion de gel (Ntakarutimana *et al.*, 1992). Une précipitation d'anticorps a été visible dans le cas d'antigène viral (Polson *et al.*, 1980b). Il a été suggéré que les antigènes de Mr <30 kDa n'induisent pas de précipitation et que la réponse immunitaire est faible (Otani *et al.*, 1989). Toutefois, Otani *et al.* (1989) ont pu produire des IgY anti- α_{s1} -caséine bovine de Mr 23,5 kDa, de même que Lee *et al.* (1991) ont été capables de produire des IgY anti-insuline humaine (< 6 kDa) chez la poule.

Malgré tous ces avantages, l'IgY n'est pas encore couramment utilisée et cela en raison de la difficulté d'extraction et de purification de l'Ig du jaune d'œuf (Hassl et Aspöck, 1988; Ntakarutimana *et al.*, 1992).

2. 6. 2. Applications en immunodiagnostic

Plusieurs études ont été entreprises pour analyser la faisabilité d'utiliser les IgY à la place des IgG de mammifères dans les tests immunologiques et les systèmes de détection.

Les IgY peuvent être utilisées pour la détection de contamination microbienne ou altération des aliments (Nakai *et al.*, 1994). Immobilisées à une colonne de chromatographie d'affinité, les IgY pourront permettre la séparation de composés bioactifs à partir de sources naturelles ou d'une culture fermentaire en une seule étape (Sada *et al.*, 1986).

Sachant que les IgY ne se lient pas au RF (Larsson et Sjöquist, 1988) et n'interagissent pas avec les IgG de mammifères (Benson *et al.*, 1961), plusieurs chercheurs se sont intéressés à leur utilisation dans différents tests impliquant les IgG de mammifère. Elles ont été utilisées avec succès en ELISA classique, de compétition ou en sandwich pour la détection de virus (Polson, 1993), de mycotoxine contaminants les aliments (Clarke *et al.*, 1994), de la protéine A contaminant les solutions d'IgG de mammifère suite à un passage du sérum sur une colonne protéine A-Sepharose pour la purification des IgG (Larsson *et al.*, 1992), d'infections à *S. aureus* (Larsson et Sjöquist, 1989), de complexes immuns circulants (Larsson *et al.*, 1992). Il est intéressant de les utiliser dans tous les tests (néphélobimétrie, agglutination au latex, ELISA, RIA) où une interférence de l'immunoglobuline est à craindre avec le RF (Larsson *et al.*, 1991), la protéine A ou protéine G (Larsson et Sjöquist, 1988).

Toutefois, Hassl *et al.* (1987) rapportent que les profils de précipitation des IgG de poule comparés à ceux de lapin ne sont pas identiques, ainsi d'après eux, l'IgY n'est peut être pas un remplaçant immédiat des IgG de lapin dans les tests immunologiques.

L'obtention de grande quantité d'immunoglobuline, comme c'est le cas pour les IgY de poule, pourrait promouvoir leur utilisation pour la détection ou l'analyse quantitative de différentes substances biologiques, pas seulement dans le domaine pharmaceutique, mais aussi en cosmétique et en industrie alimentaire (Hatta *et al.*, 1990).

2. 6. 3. Applications en immunothérapie et immunoprophylaxie

L'utilisation d'IgY ou de lyophilisat de jaune d'œuf en immunothérapie chez des humains ou animaux a été rapportée par plusieurs chercheurs. L'immunité passive due à l'administration orale d'anticorps est attribuée à l'interférence de l'adhérence bactérienne et/ou à la neutralisation des toxines produites par les pathogènes. L'effet de protection peut donc être conféré par la molécule entière ou le Fab (Akita et Nakai, 1993b).

Ebina *et al.* (1990) démontrent que les IgY produites par des poules immunisées contre un rotavirus humain et administrées oralement à des souris, leur évitent une gastroentérite. Leurs résultats sont en accord avec ceux obtenus par Bartz *et al.* (1980) et Yolken *et al.* (1988). Ceci peut s'expliquer par le fait que l'infection au rotavirus est limitée aux cellules épithéliales du tractus intestinal. L'activité immunologique de l'IgY n'étant pas affectée par une pasteurisation à 60°C pendant 3,5 min, en fait une réalité pratique pour l'application par administration orale pour prévenir des infections à rotavirus (Hatta *et al.*, 1993).

Otake *et al.* (1991) administrent oralement des IgY anti-*S. mutans* à des rats et diminuent ainsi les caries dentaires de ces derniers. Récemment, Hatta *et al.* (1997) démontrent qu'un rince-bouche contenant des IgY anti-*S. mutans* et du sucrose, permet la liaison des IgY aux glycanes insolubles de n'importe quel sérotype de *S. mutans*, prévenant ainsi la formation de plaque chez des volontaires humains. Étant donné que l'œuf contenant les anticorps est un aliment, l'IgY pourrait être un nouvel ingrédient d'aliment et de rince-bouche afin de prévenir la colonisation de *S. mutans* spécialement en présence de sucre (Hatta *et al.*, 1997).

Des IgY produites contre l'oncoprotéine P110 des cellules cancéreuses du système digestif, ont été capables de reconnaître et de se lier à des sections de différents tissus humains atteints de cancer. L'IgY pourrait servir alors de porteur de médicaments pour d'éventuels traitements contre les cancers (Jianmin *et al.*, 1997).

Hatta *et al.* (1994) ont été capables de prévenir les infections à *Edwardsiella tarda* chez des anguilles japonaises par administration orale d'IgY anti-*E. tarda*. Sugita-Konishi *et al.* (1996) démontrent que les IgY contenues dans le jaune d'œuf de poules immunisées contre un mélange de 26 souches bactériennes, sont capables d'inhiber la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* et *S. aureus*, de supprimer la production de l'enterotoxine A (poison alimentaire) par *S. aureus* et de bloquer l'adhésion de *Salmonella enteritidis* à des cellules intestinales Caco-2 *in vitro*.

D'autres chercheurs suggèrent l'utilisation potentielle des IgY pour la protection des porcelets contre la collibacillose entérique souvent fatale (Yokohama *et al.*, 1992), pour la fortification des formules infantiles (Shimizu *et al.*, 1988), tout comme le colostrum de vaches vaccinées ou un concentré d'Ig a pu prévenir les infections dues à *E. coli* (Hilpert *et*

al., 1977) ou à des rotavirus (Ebina *et al.*, 1985; Brussow *et al.*, 1987) chez l'enfant et la tourista chez l'adulte (Tacket *et al.*, 1988).

Peu de personnes sont allergiques aux protéines de l'œuf, quoiqu'il en soit, afin de réduire ou éliminer les risques d'allergies, il est possible de cliver le Fc, réduisant ainsi les risques de réactions allergiques possibles de la molécule d'IgY sans en affecter sa fonction. Akita et Nakai (1994) reportent le clivage de l'IgY, de façon à produire un Fab', par la pepsine ou une protéase d'*Aspergillus saitoi*, cette dernière étant particulièrement recommandée vu son prix peu élevé par rapport à celui de la pepsine.

3. Chromatographie d'affinité

La chromatographie d'affinité est la seule technique permettant la purification de la plupart des biomolécules sur la base de leur fonction biologique ou de leur structure chimique. C'est un type de chromatographie d'adsorption où la molécule à purifier est spécifiquement et réversiblement adsorbée par liaison à une substance complémentaire (ligand) immobilisée à un support insoluble (matrice) (Figure 9). Elle peut être utilisée pour purifier des substances à partir de mélanges biologiques complexes, pour séparer les formes natives de celles dénaturées d'une même substance et aussi pour récupérer de faible quantité de matériel biologique d'un large mélange de substances contaminantes. C'est la méthode de choix pour la purification d'anticorps polyclonaux et monoclonaux, ainsi que de l'antigène correspondant par immobilisation de l'anticorps monoclonal, de récepteurs, de protéines liant l'ADN, de protéines liant les immunoglobulines de manière non-immune et de toutes autres substances d'intérêt.

Un facteur important lors de l'attachement covalent du ligand à la matrice est le minimum de liaison entre ces derniers. Ceci augmentera la probabilité de la macromolécule attachée à retenir sa structure tertiaire, et ainsi ses propriétés ressembleront d'avantages à celles de la protéine native en solution (Cuatrecasas, 1970).

Le gel utilisé comme matrice doit être inerte biologiquement et chimiquement, ainsi que stable aux conditions de couplage et d'éluion lors de la purification. Le gel doit permettre l'entrée et la sortie uniformément des macromolécules qui ne se sont pas liées spécifiquement. Les particules de gel doivent être de préférence de tailles uniformes, sphériques et rigides (Cuatrecasas, 1970). Les gels les plus souvent utilisés sont l'agarose,

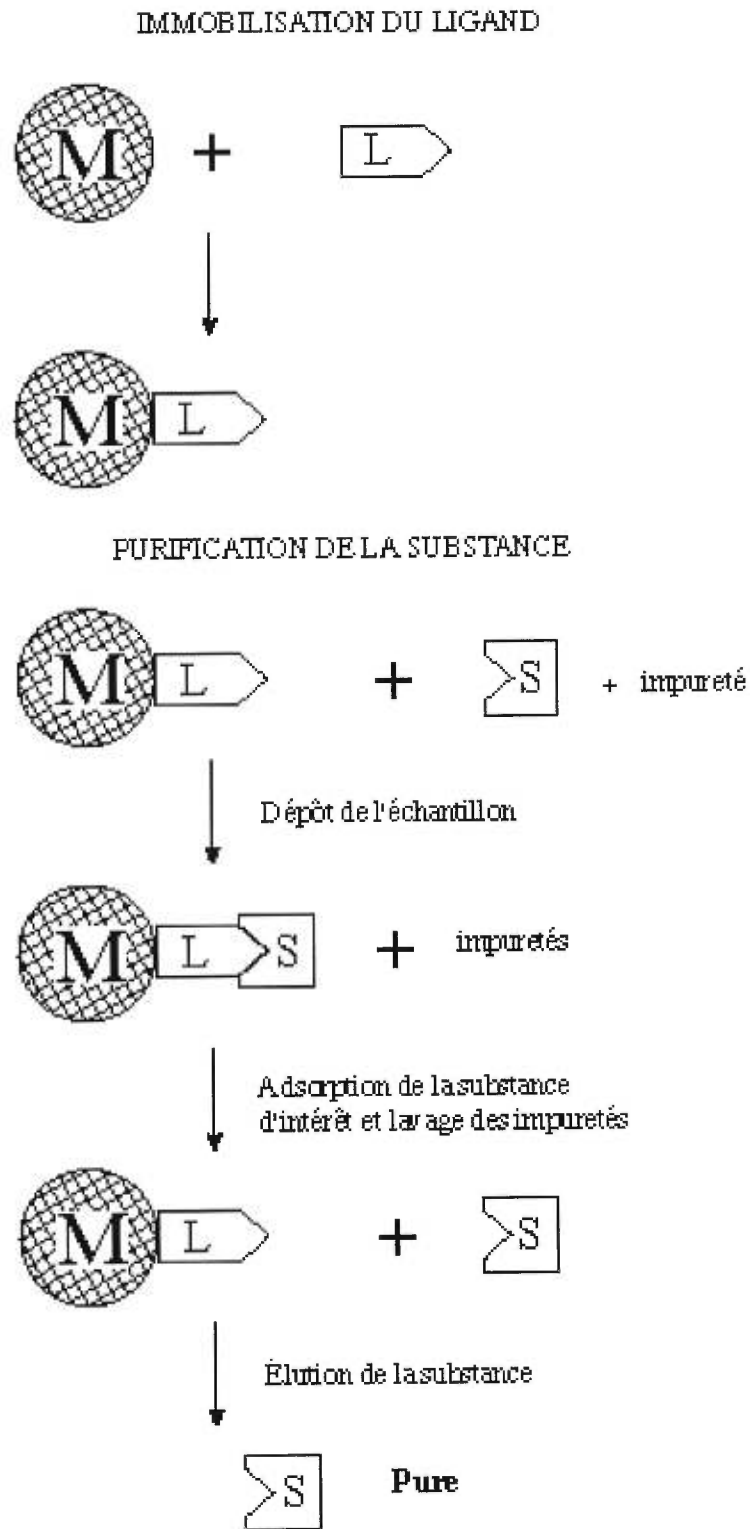


Figure 9. Principe général de la chromatographie d'affinité. Un ligand (L) est immobilisé à une matrice (M). Le dépôt de l'échantillon permet l'adsorption de la substance d'intérêt (S). L'éluion permet de récupérer la substance S pure.

dextrane, polyacrylamide, cellulose et trisacryl (Dean *et al.*, 1985). Le couplage du ligand à la matrice insoluble, peut se faire, par exemple, par activation au bromure de cyanogène, au sulfone de divinyl, au chlorure de trétyl, au trichloro-s-triazine (Ubrich et Rivat, 1996), au périodate, aux dérivés époxy (Pepper, 1994), *via* des esters N-hydroxysuccinimide ou du carbodiimide (Dean *et al.*, 1985). Le ligand peut se lier *via* son groupement amine, carboxy, thiol, hydroxyl et imidazole de façon covalente et stable.

Après le couplage, l'ajout d'excès d'amine primaire de petites tailles tel que éthanolamine, glycine ou acide glutamique permet de bloquer les groupes actifs libres. Après lavage du gel pour éliminer l'excès de ligand non couplé, la colonne de chromatographie d'affinité est prête à être utilisée.

La purification à l'aide d'une colonne d'affinité permet de charger la colonne d'un mélange de molécules. La substance d'intérêt se liera à son ligand immobilisé à la matrice. Un lavage avec le tampon adéquat selon le gel utilisé permet d'éliminer toutes les impuretés et l'excès de la substance d'intérêt. Afin d'éluer la substance liée à la matrice d'immunoaffinité, l'interaction ligand-substrat spécifique est déstabilisée par une brève exposition à un tampon à haut ou bas pH, par l'ajout d'un compétiteur ou encore par un solvant permettant la diminution des forces hydrophobes. Tout le long de la purification les pics d'élution sont mesurés à 280 nm à l'aide d'un détecteur relié à un enregistreur (Figure 10). La colonne peut être ensuite lavée et stockée pour une prochaine utilisation.

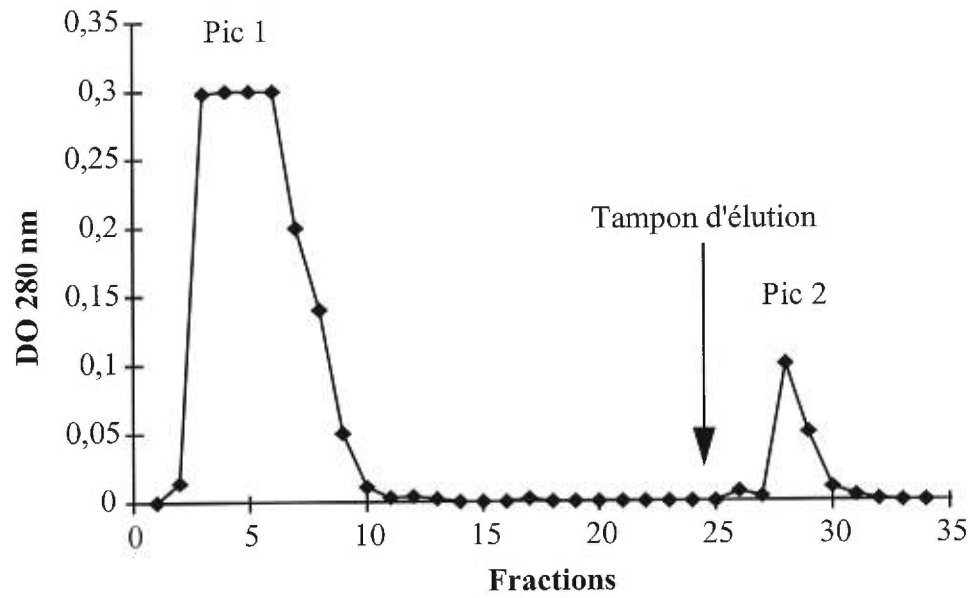


Figure 10. Profil d'une purification par chromatographie d'affinité. Le pic 1 correspond aux substances non spécifiques non retenues par le ligand. Le pic 2 correspond à l'élution de la substance d'intérêt.

III- MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS


**PURIFICATION OF IgY BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY USING
AN IMMOBILIZED *STREPTOCOCCUS SUIS* SEROTYPE 2
IMMUNOGLOBULIN-BINDING PROTEIN**

K. BOUDJEROUA, M. JACQUES, AND J. D. DUBREUIL*

Soumis pour publication au Journal of Applied Microbiology

Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc (GREMIP), Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6

Key words: Immunoglobulin-binding protein, purification, immunoaffinity chromatography, IgY, egg yolk, *Streptococcus suis*

*Corresponding author. Address: Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc (GREMIP), Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C. P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6. Phone: (450) 773-8521 ext. 8433. Fax: (450) 778-8108. E-mail: 

ABSTRACT

To date, many immunoglobulin-binding proteins (IBP) expressed by bacteria have been described. *Streptococcus suis* serotype 2 produces an IBP which possesses the unique property of reacting with chicken IgY in a non-immune manner. Eggs from immunized chickens represent a daily and abundant source of polyclonal antibodies. Thus, we have attempted to use the special binding property of the *Strep. suis* IBP to purify IgY by affinity chromatography. Different activated gels were tested for IBP coupling. *Strep. suis* IBP was successfully coupled to a Triazine Activated Agarose (TAA) gel, at a concentration of 1 mg ligand ml⁻¹ of gel. The binding capacity of the IBP-TAA column was evaluated using commercial IgY. Recovery varied from approximately 56 to 80 % depending on the quantity of IgY applied onto the column. Then, IgY in egg yolk were extracted following a chloroform treatment, in order to remove the lipids. The water soluble (WS) protein fraction of egg yolk was loaded onto the affinity column. A recovery of 19 % of IgY from the total WS protein was obtained; this represents 51 % of the IgY contained in the WS fraction. The purity of the IgY was evaluated by gel scanning to be approximately 83 %. Our results suggest that immobilized IBP of *Strep. suis* serotype 2 represents a useful tool for the purification of IgY from egg yolk. IgY purification by affinity chromatography is simple, rapid and not expensive since the column can be regenerated and used repeatedly.

INTRODUCTION

Many immunoglobulin-binding proteins (IBP) expressed by bacteria have been described and are used for the purification of the immunoglobulins (Ig) of many animal species. A classification scheme for these IBP has been established. Based on their binding activities with Ig from various host species, six types have been proposed (Myhre and Kronvall, 1981). Protein A from *Staphylococcus aureus* belonging to type I has been extensively studied, and binds preferentially human, pig and rabbit IgG (Forsgren and Sjöquist, 1966; Boyle, 1990). Protein A seems to bind the interface region between the C_H2 and C_H3 domains of IgG (Kato *et al.*, 1995). Protein G from *Streptococcus equisimilis* (type III) binds the majority of the mammalian IgG (Reis and Boyle, 1990b), the interaction with the IgG Fc appears to be as for the protein A in the C_H2-C_H3 domains region, but with a reaction more important with the C_H3 domain (Kato *et al.*, 1995). We have characterized an IBP from *Streptococcus suis* serotype 2 which differs from the others six bacterial IBP types described to date (Serhir *et al.*, 1995). This IBP possesses the property of reacting in a non-immune manner with chicken IgY in addition of reacting with many mammals Ig.

Immunoglobulins are widely used in immunoprecipitation, immunodiffusion, immunoelectrophoresis, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) and radioimmunoassays (RIA) to detect and quantitate the presence of antigens (Schwartz, 1990). Several researchers have demonstrated the effectiveness of passive immunization by oral administration of IgG for preventing some infectious diseases such as, for example, diarrhea due to *Escherichia coli* (Hilpert *et al.*, 1977) or rotavirus (Brussow *et al.*, 1987) in infants and traveller's diarrhea (Tacket *et al.*, 1988) in adults.

Leslie and Clem (1969) proposed the term IgY (i.e. Y for yolk) for the avian IgG, due to some biochemical differences with mammalian IgG and also based on its origin. IgY are the low molecular-weight serum antibodies of birds, reptiles, amphibia and lungfish (Warr *et al.*, 1995). IgY are transported through the follicular epithelium of the ovary from the serum to the egg yolk (Loeken and Roth, 1983), to protect the embryo by passive immunity (Rose *et al.*, 1974). The concentration of IgY in the egg yolk have been reported to be as

high as in chicken serum (Otani *et al.*, 1989) and greater than in rabbit serum (Larsson and Sjöquist, 1990). A hen naturally lays an average of 284 eggs a year (Canadian Egg Marketing Agency, 1997) and the levels of IgY in yolk are ranging from 9 mg ml⁻¹ (Wang *et al.*, 1995) to 25 mg ml⁻¹ (Rose *et al.*, 1974). Assuming the average yolk volume in eggs to be 15 ml, the annual production of IgY by a hen would be around 40 - 100 g. Polson *et al.* (1980) reviewed the advantages of using chicken IgY as a source of antibody instead of mammalian Ig, notably the minimum of invasive procedures such as frequent inoculation and bleeding of the animal, and the daily source of polyclonal antibodies from eggs of immunized chicken. In addition, IgY reduce interference by rheumatoid factor because of the immunological difference between mammalian IgG and chicken IgY. Use of chicken IgY, also avoid false positive results in immunological assays (Larsson and Sjöquist, 1990). Purified IgY from egg yolk of immunized chickens could be used in immunotherapy such as fortification of infant formula (Shimizu *et al.*, 1988), prevention of dental caries in human (Hatta *et al.*, 1997), treatment of fish diseases (Hatta *et al.*, 1994) and protection of neonatal piglets against fatal enteric colibacillosis (Yokohama *et al.*, 1992). IgY have been used with success to recognize specifically gastrointestinal cancers. It may thus become an important carrier for antitumorigenic drugs (Jianmin *et al.*, 1997).

Many techniques have been described to purify chicken IgY from the egg yolk notably by water dilution (Akita and Nakai, 1992), using polyethylene glycol (Polson *et al.*, 1985), dextran sulfate (Jensenius *et al.*, 1981), natural gums (Hatta *et al.*, 1990), caprylic acid (McLaren *et al.*, 1994) and by ammonium sulfate precipitation (Denzin and Henrion, 1996). Many of these methods are laborious since they involve many steps including time-consuming centrifugation, ultrafiltration, gel filtration and anion exchange chromatography. Commercial kits based on organic solvents fractionation for IgY purification are also available. Immunoaffinity chromatography for chicken IgY is not possible with immobilized protein A or G in view of the fact that those proteins do not bind chicken IgY. High recovery and simple purification technique for IgY from egg yolk is necessary if chickens are to gain general acceptance in polyclonal antibody production. Thus, we have attempted to use the unique binding property of *Strep. suis* serotype 2 IBP to develop an affinity column to purify IgY independently of their antigen specificity.

MATERIALS AND METHODS

Purification of the IBP from *Streptococcus suis* serotype 2 strain S735

The production and purification of the IBP were carried out as described by Serhir *et al.* (1995). Briefly, bacteria were grown in Todd-Hewitt broth at 37°C overnight and then the culture supernatant was subjected to ammonium sulfate precipitation (55 % saturation). The solubilized ammonium sulfate precipitate was applied on a ECH-Sepharose 4B column where pig IgG were previously immobilized. The column was washed with 0,05 mol l⁻¹ Tris-HCl buffer (pH 8.1) and eluted with citrate buffer (0,1 mol l⁻¹ citric acid, 0,1 mol l⁻¹ sodium citrate, pH 3.0) containing 0,5 mol l⁻¹ NaCl. The eluted peak was dialysed and lyophilized and stored at -20°C until needed. IBP purity was determined using the Alpha Imager™ 2000 (Canberra Packard, Canada) after SDS-PAGE.

Immobilization of the IBP

IBP were coupled to a Triazine Activated Agarose 4 XL gel (TAA) (Affinity chromatography Ltd, Cambridge, UK). Briefly, the gel (1 ml) was washed with 20 vols of distilled water, followed by 5 vols of 0,05 mol l⁻¹ sodium acetate (pH 5.0) containing 0,5 mol l⁻¹ NaCl. The IBP (2,55 mg) dissolved in 0,05 mol l⁻¹ sodium acetate containing 3 mol l⁻¹ guanidine hydrochloride (Gnd-HCl) (pH 5.0), was mixed and rotated end-over-end for 2 h at room temperature (RT) with the gel. The gel was washed with 10 vols of 0,05 mol l⁻¹ sodium acetate (pH 5.0) containing 0,5 mol l⁻¹ NaCl. The unreacted sites were blocked for 2 h at RT by addition of 2 mol l⁻¹ ethanolamine. The gel was finally washed by 5 vols of distilled water followed with 5 vols of 0,02 mol l⁻¹ phosphate buffer (pH 8.0) containing 0,2 % NaN₃, before storage at 4°C until needed.

ECH-Sepharose 4B and CNBr-activated Sepharose 4B were also tested for the coupling of *Strep. suis* IBP according to the manufacturer's instructions (Pharmacia, Baie d'Urfé, Québec, Canada).

Affinity chromatography

Chromatography was performed at 4°C using the following procedure. The gel with immobilized IBP was washed with 0,02 mol l⁻¹ phosphate buffer (pH 8.0) and samples were applied at a flow rate of 0,27 ml min⁻¹. The bound antibody fraction was desorbed at a flow rate of 0,4 ml min⁻¹ with 0,5 mol l⁻¹ acetate buffer (pH 3.0) and the peaks were monitored at 280 nm with a UV-M detector (Pharmacia, Baie d'Urfé, Québec, Canada). The pH of the eluted antibody fraction was neutralized immediately with 1 mol l⁻¹ Tris, lyophilized and stored at -20°C. Fractions collected during the chromatography procedure were analyzed by SDS-PAGE and Western blot. Protein content was determined according to Lowry *et al.* (1951) with standard curves prepared using bovine serum albumin.

Evaluation of the binding capacity of the column

Various amounts of commercial IgY (Sigma, Oakville, ON, Canada) from 0,270 to 2,7 mg in 0,02 mol l⁻¹ phosphate buffer (pH 8.0) were applied to the column and eluted as described above. The percentage of recovery of each dilution was calculated and each peak eluted was analyzed by SDS-PAGE and Western blot. Procedures were performed in duplicate. Protein content of eluted IgY solutions was calculated from the absorption of 280 nm using an extinction coefficient of 1,33 ml (cm.mg)⁻¹ (Leslie and Clem, 1969).

Egg yolk separation and IgY purification

Egg yolks were separated from the whites and rolled on paper towel to remove adhering egg white containing some rest of albumin. The membrane was punctured and the yolk allowed to pour without the membrane. Chloroform extraction was modified from the method described by Reis and Boyle (1990a). Briefly, an equal volume of distilled water (pH 5.0) is added to the egg yolk, and then centrifuged at 10000 rpm for 20 min at 4°C. The supernatant and an equal volume of chloroform are mixed by inversion and allowed to stand at RT for 30 min. This operation is repeated five times, and the mixture is stored for approximately 2 h at 4°C and centrifuged at 5000 rpm for 15 min at 4°C. The clear water soluble (WS) fraction containing the IgY is loaded onto the column and eluted as described before. IgY purification from egg yolk was done six times using the affinity column. The peak eluted was analyzed by SDS-PAGE and Western blot. IgY purity was determined

using the Alpha ImagerTM 2000 (Canberra Packard, Canada).

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Protein samples were denatured by boiling for 10 min in 0,0625 mol l⁻¹ Tris-HCl (pH 6.8) containing 2 % (wt/vol) SDS, 10 % (vol/vol) glycerol, 5 % (vol/vol) β-mercapethanol and 0,025 % (wt/vol) bromophenol blue. SDS-PAGE was conducted with the discontinuous buffer of Laemmli (1970) with a 5 % polyacrylamide stacking gel and a 10 % polyacrylamide running gel. Gels were run on Mini-Protean II vertical slab electrophoresis cells (Bio-Rad, Richmond, CA). Proteins were electrophoresed initially at 100 V (constant voltage) and later at 150 V when the tracking dye entered the separation gel. Prestained low-molecular-mass markers (Bio-Rad, Richmond, CA) were included in each SDS-polyacrylamide gel assay.

Western blot analysis

Western blot analysis was done as described by Towbin *et al.* (1979), with some modifications. The separated proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Richmond, CA), which was then blocked with 2 % (wt/vol) skim milk in Tris buffered saline (TBS; 0,02 mol l⁻¹ Tris, 0,5 mol l⁻¹ NaCl, pH 7.5) for 2 h at RT. The IBP were incubated overnight at 4°C with 500 µg of chicken IgY (Sigma, Oakville, ON, Canada) while the samples from the egg yolk were incubated in TBS only. Then the membranes were washed five times in TBS containing 0,05 % (vol/vol) Tween 20 (TBST), and reacted with horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-chicken IgY (1:2000, Jackson Immunoresearch Laboratories, Ontario, Canada) for 1 h at RT. The nitrocellulose membrane was then washed with TBST five times and the bands were revealed by adding a solution of 4-chloro-1-naphthol added with peroxyde hydrogen 30 %. For dot blot analysis, IBP were incubated with urea 5 mol l⁻¹, Gnd-HCl 3 mol l⁻¹, at pH 3 or pH 10 for 1 h at 4°C and dotted onto nitrocellulose membrane. Then, the same treatment as Western blot analysis was done.

RESULTS

The purposes of this study were: (i) to couple a *Strep. suis* IBP to a chromatographic matrix and (ii) to test the effectiveness of this affinity chromatography column to purify IgY from egg yolk.

Purification of IBP from *Streptococcus suis* serotype 2

An ECH-Sepharose 4B gel (30 ml), which expresses carboxyl group, was used to immobilize pig IgG (160 mg) through their Fab fragments according to the method of Serhir *et al.* (1995). An average of 2 mg of IBP was obtained from a two liters of Todd-Hewitt broth culture of *Strep. suis* serotype 2 after affinity chromatography on ECH-Sepharose 4B coupled with pig IgG. After staining with Coomassie blue, a protein of 59 kDa was the major protein recovered in the eluted peak. This protein appears on gel as a doublet with a Mr of 59 and 66 kDa and represents 84 % of the eluted material (Fig. 1 lane1). Chicken IgY binding activity was observed for the doublet (Fig. 1 lane 2). The eluted material was used for futur work as the *Strep. suis* serotype 2 IBP active components.

Immobilization of the IBP

As *Strep. suis* IBP was previously shown to form long filaments from polymerized units (Serhir *et al.*, 1995), selection of the gel was based on the capacity of the matrix to resist drastic conditions necessary for protein depolymerization. Different conditions were tested to evaluate if the IBP retain the binding activity after such treatments. By dot-blot analysis, IBP was shown to bind IgY after treatment with either urea 5 mol l⁻¹, Gnd-HCl 3 mol l⁻¹ and at pH 3.0 or pH 10.0 (data not shown). CNBr-activated Sepharose 4B and ECH-Sepharose 4B gels linking proteins through their amino groups were tested. In the case of ECH-Sepharose gel, the coupling was done in presence or absence of 3 mol l⁻¹ Gnd-HCl. Couplings were done according to the manufacturer's instructions (Pharmacia, Baie d'Urfé, Québec, Canada). For those gels, no detectable coupling was observed. However, the

coupling was successful using a Triazine Activated Agarose gel (TAA). One ml of TAA gel was mixed with 2,55 mg of IBP dissolved in 0,05 mol l⁻¹ sodium acetate buffer containing 3 mol l⁻¹ Gnd-HCl (pH 5.0) and incubated for 2 h. Then, the unreacted sites were blocked with 2 mol l⁻¹ ethanolamine during 2 h. The gel was transferred to an empty column (Ø 9 mm; height 6 cm; 1,5 ml bed) and after its settling the coupling efficiency was determined. The results indicated that from the 2,55 mg of IBP added to the activated matrix, 1 mg was effectively coupled to 1 ml of TAA gel.

Binding capacity of the column

The binding capacity for IgY of the experimental column was evaluated following the procedure shown in Fig. 2B. Different amounts of commercial IgY (Sigma), ranging from 0,27 to 2,70 mg, were applied to the column at a flow rate of 0,27 ml min⁻¹. The elution was carried out with 0,5 mol l⁻¹ sodium acetate buffer (pH 3.0) at a flow rate of 0,4 ml min⁻¹ and the protein content of the eluates determined. Results indicated that recovery varied, under the test conditions, from approximately 80 % for 0,270 mg to 56 % when 1,08 mg was loaded (Fig. 3). The column was able to bind approximately 45 % of 5 or 10 mg of the commercial IgY loaded (data not shown).

Purification of IgY from egg yolk

Proteins from egg yolks were extracted using the described protocol (Fig. 2A). After the second centrifugation, 3 phases were observed. These are from the bottom to the top of the tube, an orange coloured solution, a yellow semi-solid emulsion of the yolk substances in chloroform and a watery phase of chicken serum proteins (WS). The protein content of WS was about 180 mg per egg yolk of which 29 % were IgY, as determined on basis of the heavy and light chain components. Of this material, 2 mg was loaded onto the IBP-TAA column, that had previously been equilibrated. Elution was done and peaks were monitored at 280 nm and collected. Fig. 4 shows the chromatogram obtained. The first peak (peak I) occurred during sample application and washing of the column. This fraction contains majoritarily molecules that are not IgY. However, IgY were also observed in this peak (Fig. 5, lane 2). The bulk of IgY was eluted as a single peak (peak II). Fractions containing IgY were lyophilized, resuspended in distilled water and dialysed. Approximately 380 µg of

IgY were recovered from the column, corresponding to approximately 19 % of the total WS (2 mg) protein loaded. Thus, approximately 51 % of the IgY loaded were recovered in the column eluate. The affinity-purified IgY obtained were analysed by SDS-PAGE. As shown in Fig. 5A, lane 3, the affinity-purified IgY dissociated, as expected, into heavy and light chains of molecular masses of 70 and 26 kDa, respectively. The purity of IgY was evaluated to 83 % based on densitometry. For all the samples separated by SDS-PAGE, the heavy and the light chains reacted in Western blotting with a horseradish peroxidase-conjugated rabbit IgG anti-chicken IgY (Fig. 5B). The number of protein bands obtained in the eluate of the affinity column was significantly decreased compared to the WS loaded (Fig. 5). Scanning densitometry of SDS-PAGE demonstrated that IgY constitute 29 % of the WS protein, affinity chromatography permitted an enrichment of the IgY to about 83 %.

DISCUSSION

Affinity chromatography is widely used for the purification of mammalian Ig, using immobilized protein A or G. However, these proteins do not bind the Fc portion of IgY and cannot be used for the purification of IgY. IBP of *Strep. suis* serotype 2 shows a non-immune reaction with IgY and therefore the possibility of using this protein for IgY purification by affinity chromatography was investigated. CNBr activated-Sepharose 4B and ECH-Sepharose 4B bind their ligand by their amino groups, in the case of the ECH-Sepharose 4B the binding is done *via* a 9-carbon hydrophilic spacer arm. However, coupling was not observed with these two gels, even when coupling to ECH-Sepharose was done in presence of 3 mol l^{-1} Gnd-HCl. The coupling of *Strep. suis* IBP was successful with a Triazine Activated Agarose 4XL gel. That permits attachment *via* trichloro-s-triazine group. The main reason could be the high number of potential coupling bonds between the protein and the reactive trichloro-s-triazine groups. In fact, protein immobilization for this gel can also occur *via* amine and also imidazole, hydroxyl, thiol groups and lysine and histidine residues. It has been shown that *Strep. suis* serotype 2 IBP contain 6 histidine residues mol^{-1} and 24 lysine residues mol^{-1} for a total of 506 residues mol^{-1} (Serhir *et al.*, 1995).

Egg yolk contains a large amount of lipids and lipoproteins which must be removed before the material can be applied to an affinity column. By chloroform/water extraction, we obtained a water soluble (WS) fraction containing IgY and other egg yolk proteins. This WS could then be used for the purification of IgY. A diversity of techniques for separation of IgY from WS fraction has been reported, giving IgY of different levels of purity, but various steps are required to achieve this goal. For example, Akita and Nakai (1993) described a water dilution method followed by a sodium sulfate precipitation, ultrafiltration and gel filtration or anion exchange chromatography. Hatta *et al.* (1990) precipitate egg yolk using λ -carrageenan gum followed by a chromatography on a DEAE-Sephacel column and by three salting out steps using sodium sulfate. McLaren *et al.* (1994) reported caprylic

acid and ammonium sulfate precipitations. van Sommeren *et al.* (1996) purified by specific affinity chromatography egg yolk IgY from immunized chickens by coupling the specific antigen to N-hydroxysuccinimide-activated Sepharose 4 Fast Flow gel.

General affinity (i.e. the non-immune binding of an antibody to an antigen) is the only appropriate method when the antigen to which a particular antibody binds is unavailable in pure form, or is available only in small quantities or when total antibodies are to be purified. We used general affinity to purify IgY from the WS. Compared to other methods, our affinity chromatography technique requires only two steps: one step to remove lipids and lipoproteins from egg yolk and one step to separate the IgY from the other proteins by affinity chromatography. Using this new technique, we obtained a recovery of 51 % of IgY contained in WS protein with a purity of 83 %.

Stewart (1993) analysed the leakage of radio-labelled small molecular weight ligands from two different matrix. He founds that in 30 days at pH 9.0, the triazine-linked gel lost only about 0,6 % of immobilized ligand compared to 50 % for CNBr-coupled gel. Multi-point attachment of immobilized protein should significantly reduce this leakage rates allowing longer column lifetime. The prototype affinity column we set up has been used up to 30 times with no alteration of the binding efficiency or leakage of IBP (Fig 5, lane 3). However, multi-point attachment could mask the binding site for IgY on the IBP molecule. For the IBP-TAA column high recoveries were obtained, indicating that the majority of the binding site on the IBP molecule were probably appropriately expose. The binding capacity of the column varied between 56 to 80% when commercial IgY was loaded (0,270 to 2,7 mg), and decreased around 45% when 5 and 10 mg were loaded. In clear, to a 1 ml of gel where 1 mg of IBP is coupled, up to approximately 5 mg of IgY could be bound and later eluted. Stewart (1993) has shown that after optimization, protein A coupled *via* triazine activation to cross-linked agarose binds Ig molecules in excess of 75 %. He also observed that the capacity of ligand coupled to TAA is in the range of 1-5 mg ml⁻¹ (Stewart, 1993). This could explain why our column of 1 ml was able to bind 45 % when 5 and 10 mg of commercial IgY were loaded. During affinity chromatography, the loading of the sample was done at pH 8.0 and the desorption with a buffer at pH 3.0. It has been shown that pH around 3.0 to 5.0 is the most effective way to achieve complete separation of IgG from different protein A constructions immobilized on Triazine Activated

Agarose gel (Bottomley *et al.*, 1995).

Immobilized IBP of *Strep. suis* serotype 2 represents an useful tool for the purification of chicken IgY from the egg yolk by affinity chromatography. The main disadvantage of the first isolation procedure of WS was the use of chloroform, a toxic solvent. However, other techniques for the removal of lipid could be used instead of the chloroform/water extraction like for example, the water dilution method (Akita and Nakai, 1993), λ -carrageenan precipitation (Hatta *et al.*, 1990) or by freeze and thaw method (Svendsen *et al.*, 1995). The affinity-purified IgY could be easily used for immunodiagnostic applications such for detection of different antigens in ELISA. Adoption of affinity chromatography for the purification procedure dramatically reduces the number of steps required for purification, thus minimizing the processing time and cost. In fact, centrifugation is an energy intensive operation and elimination of many centrifugation steps is accomplished with the affinity chromatography rendering purification more economic. Gram quantities of IgY could probably be obtained using a larger column.

In conclusion, we have shown that our procedure is reproducible and represents an improvement in comparison to the existing methods. IgY purification by general affinity chromatography combined with the higher productivity of chickens compared to mammals of similar size and the simpler and more animal friendly task of collecting eggs instead of blood sampling, should result in an increasing interest for the use of chickens in antibody production facilities. The procedure we have developed to purify IgY is simple and rapid, produces acceptable yields of high purity IgY and could be easily scaled up for larger IgY production.

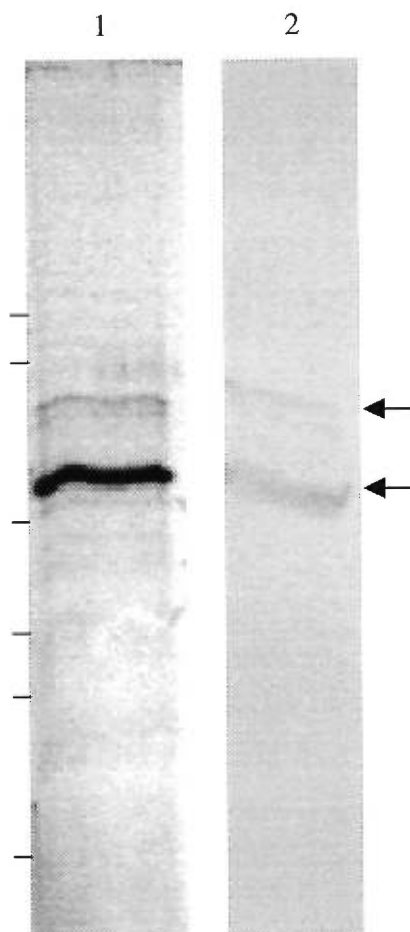
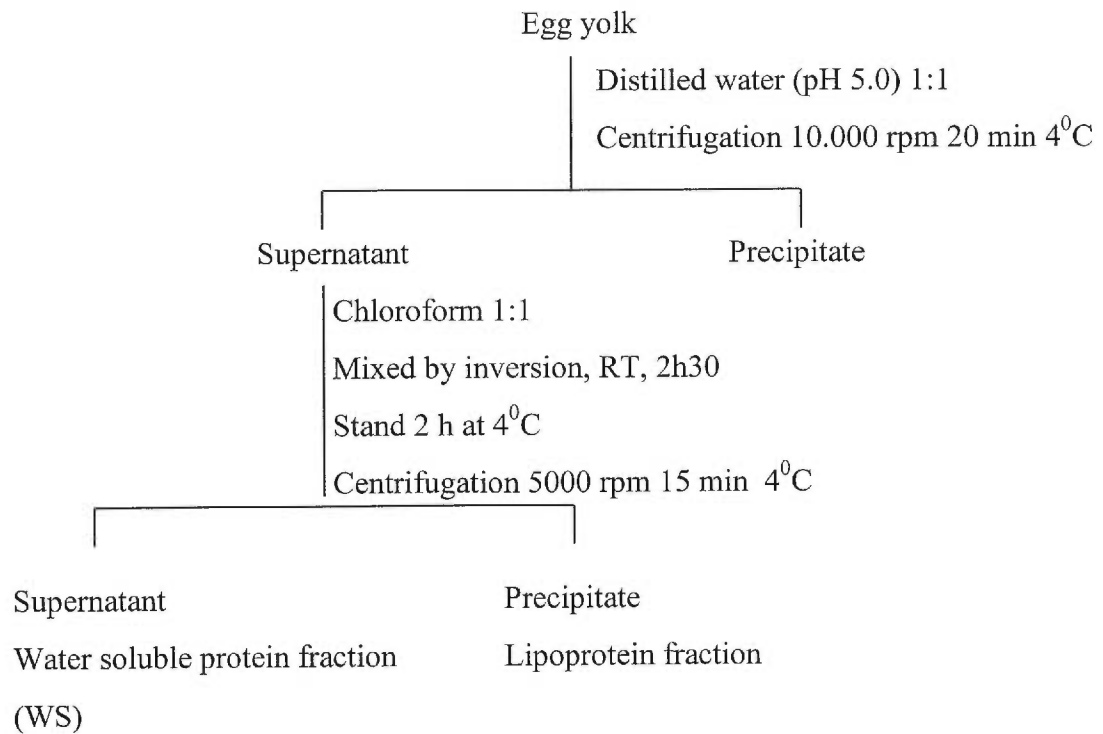


Fig. 1 SDS-PAGE and Western blot analyses of *Strep. suis* IBP. Lanes: 1, Coomassie blue stained SDS-PAGE; 2, Gel transferred to a nitrocellulose membrane, incubated with chicken IgY and probed with horseradish peroxidase-conjugated rabbit IgG anti-chicken IgY. The doublet IBP proteins is indicated by arrows. Bars indicate the molecular mass markers, from the top to the bottom: 102; 78; 49,5; 34,2 and 28,3 kDa.

(A) ISOLATION**(B) PURIFICATION**

S. suis IBP-Triazine activated agarose column

- equilibrate in 0,02 mol l⁻¹ phosphate buffer (pH 8.0)
- load water soluble protein fraction (WS) or commercial IgY (Sigma)
- wash with 0,02 mol l⁻¹ phosphate buffer (pH 8.0)
- elute the bound IgY with 0,5 mol l⁻¹ acetate buffer (pH 3.0)
- wash the column with 0,02 mol l⁻¹ phosphate buffer (pH 8.0)
- neutralize eluate with 1 mol l⁻¹ Tris

IgY solution

Fig. 2 Protocol used for isolation (A) and purification (B) of IgY from egg yolk.

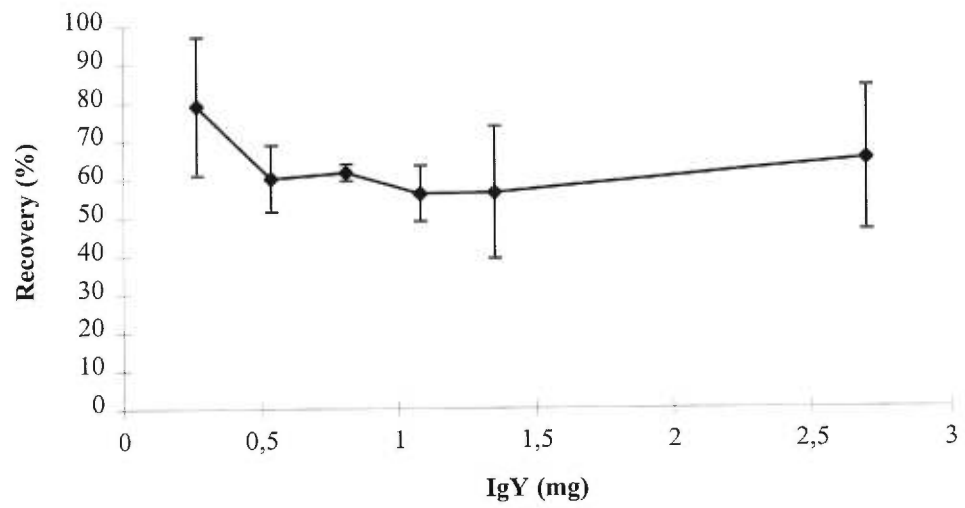


Fig. 3 Recovery of chicken IgY (%) using the IBP-Triazine Activated Agarose affinity column as a function of the quantity of commercial IgY (mg) loaded.

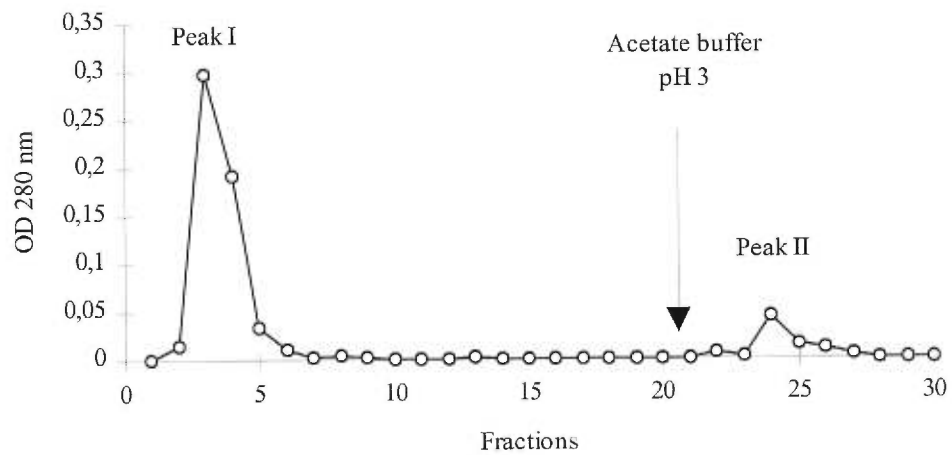


Fig. 4 Affinity chromatography purification of IgY using a Triazine Activated Agarose coupled with IBP. The column was equilibrated in 0,02 mol l⁻¹ phosphate buffer (pH 8.0) and eluted with 0,5 mol l⁻¹ acetate buffer (pH 3.0). Fractions were monitored at 280 nm, were recovered and analysed subsequently by SDS-Page and Western blot. The IgY were recovered in peak II.

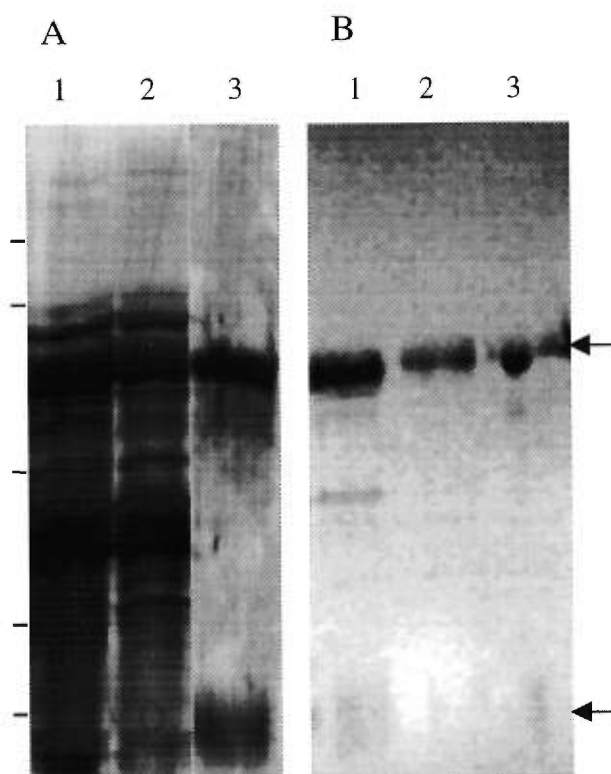


Fig. 5 SDS-PAGE and Western blot analyses of affinity-purified IgY from egg yolk using the IBP-Triazine Activated Agarose column. (A) Silver-stained SDS-Page, (B) Gel transferred to a nitrocellulose membrane and probed with horseradish peroxidase-conjugated rabbit IgG anti-chicken IgY. Lanes: 1, water soluble fraction (WS) from egg yolk containing the IgY (12 μ g); 2, affinity chromatography flow-through (14 μ g); 4, affinity chromatography purified IgY (18 μ g). Bars indicate the molecular mass markers, from the top to the bottom: 102; 78; 49,5; 34,2 and 28,3 kDa. Heavy and light chains of IgY are indicated by arrows.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grant STR 181516 from CRSNG-Stratégique to J. D. Dubreuil, M. Jacques, J. Harel and M. Gottschalk.

REFERENCES

- Akita E. M. and Nakai S. (1992) Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification. *Journal of Food Science* **135**, 2589-2592.
- Akita E. M. and Nakai S. (1993) Comparaison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *Escherichia coli* strain. *Journal of Immunological Methods* **160**, 207-214.
- Bottomley S. P., Sutton B. J. and Gore M. G. (1995) Elution of human IgG from affinity columns containing immobilised variants of protein A. *Journal of Immunological Methods* **182**, 185-192.
- Boyle M. D. P. (1990) The type I bacterial immunoglobulin-binding protein: Staphylococcal protein A. In *Bacterial immunoglobulin-binding proteins* ed. Boyle M. D. P. pp. 17-28. San Diego, Ca.: Academic Press, Inc.
- Brussow H., Hilpert H., Walther I., Sidoti J., Mietens C. and Bachmann P. (1987) Bovine milk immunoglobulins for passive immunity to infantile rotavirus gastro-enteritis. *Journal of Clinical Microbiology* **25**, 982-986.
- Canadian Egg Marketing Agency (1997). Ottawa, Ontario.
- Denzin N. and Henrion E. (1996) Raising of antibodies against *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* in chicken and isolation of the immunoglobulins (IgY) from the egg yolk. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **16**, 47-50.
- Forsgren A. and Sjöquist J. (1966) "Protein A" from *Staphylococcus aureus*: Pseudo-immune reaction with human γ -globulin. *The Journal of Immunology* **97**, 822-827.

Hatta H., Kim M. and Yamamoto T. (1990) A novel isolation method for hen egg yolk antibody, "IgY". *Agricultural and Biological Chemistry* **54**, 2531-2535.

Hatta H., Mabe K., Kim M., Yamamoto T., Gutierrez M. A. and Miyazaki T. (1994) Prevention of fish disease using egg yolk antibody. In *Egg uses and processing technologies new developments* ed. Sim J. S. and Nakai S. pp. 241-249. Oxon, U. K.: CAB International.

Hatta H., Tsuda K., Ozeki M., Kim M., Yamamoto T., Otake S., Hirasawa M., Katz J., Childers N. K. and Michalek S. M. (1997) Passive immunization against dental plaque formation in humans: effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to *Streptococcus mutans*. *Caries Research* **31**, 268-274.

Hilpert H., Gerber H., Pahud J. J., Ballabriga A., Arcalis L., Farriaux F., De Leyer E. and Nussle D. (1977) Bovine milk immunoglobulins (Ig). Their possible utilization in industrially prepared infant's milk formula. In *Food and immunology* ed. Hambraeus L., Hanson L. and McFarlane H. pp. 182. Stockholm: Almquist and Wiksell International.

Jensenius J. C., Andersen I., Hau J., Crone M. and Koch C. (1981) Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. *Journal of Immunological Methods* **46**, 63-68.

Jianmin Y., Zhigang J., Qiong Y., Taolan Y., Huipeng W. and Lianrui L. (1997) The selective recognition of antibody IgY for digestive system cancers. *Chinese Journal of Biotechnology* **13**, 85-90.

Kato K., Lian L. Y., Barsukov I. L., Derrick J. P., Kim H., Tanaka R., Yoshino A., Shiraishi M., Shimada I., Arata Y. and Roberts G. C. (1995) Model for the complex between protein G and an antibody Fc fragment in solution. *Structure* **3**, 79-85.

Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Larsson A. and Sjöquist J. (1990) Chicken IgY: utilizing the evolutionary difference. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **13**, 199-201.

Leslie G. A. and Clem L. W. (1969) Phylogeny of immunoglobulin structure and function. III- Immunoglobulins of the chicken. *Journal of Experimental Medicine* **130**, 1337-1352.

Loeken M. R. and Roth T. F. (1983) Analysis of maternal IgG subpopulations which are transported into the chicken oocyte. *Immunology* **49**, 21-28.

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-275.

McLaren R. D., Prosser C. G., Grieve R. C. and Borissenko M. (1994) The use of caprylic acid for the extraction of the immunoglobulin fraction from egg yolk of chickens immunised with ovine alpha-lactalbumin. *Journal of Immunological Methods* **177**, 175-184.

Myhre E. B. and Kronvall G. (1981) Specific binding of bovine, ovine, caprine and equine IgG subclasses to defined types of immunoglobulin receptors in Gram-positive cocci. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **4**, 317-328.

Otani S., Karasawa Y. and Hosono A. (1989) Production of antibody bovine α_{s1} -casein in the yolk of chicken eggs. *Agricultural and Biological Chemistry* **53**, 1725.

Polson A., Coetzer T., Kruger J., von Maltzahn E. and van der Merwe K. J. (1985) Improvements in the isolation of IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens. *Immunological Investigations* **14**, 323-327.

Polson A., von Wechmar M. B. and van Regenmortel M. H. V. (1980) Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunological Communications* **9**, 475-493.

Reis K. J. and Boyle M. D. P. (1990a) Production of polyclonal antibodies to immunoglobulin-binding proteins. In *Bacterial immunoglobulin-binding proteins* ed. Boyle M. D. P. pp. 105-124. San Diego, Ca: Academic Press, Inc.

Reis K. J. and Boyle M. D. P. (1990b) Type III Fc immunoglobulin-binding proteins from a group C streptococcus: isolation and characterization. In *Bacterial immunoglobulin-binding proteins* ed. Boyle M. D. P. pp. 101-111. San Diego, Ca: Academic Press, Inc.

Rose K. J., Orlans E. and Buttress N. (1974) Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. *European Journal of Immunology* **4**, 521-523.

Schwartz L. (1990) Use of immobilized protein A to purify immunoglobulins. In *Bacterial immunoglobulin-binding proteins* ed. Boyle M. D. P. pp. 309-339. San Diego, Ca: Academic Press, Inc.

Serhir B., Dubreuil D., Higgins R. and Jacques M. (1995) Purification and characterization of a 52-kilodalton immunoglobulin G-binding protein from *Streptococcus suis* capsular type 2. *Journal of Bacteriology* **177**, 3830-3836.

Shimizu M., Fitzsimmons R. C. and Nakai S. (1988) Anti-*Escherichia coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chicken as a potential food ingredient. *Journal of Food Science* **53**, 1360.

Stewart D. J. (1993) Evaluation of current methods for antibody immobilization in the preparation of immunoaffinity adsorbents. *Biotechnology of Blood Proteins* **227**, 37-42.

Svendsen L., Crowley A., Ostergaard L. H., Stodulski G. and Hau J. (1995) Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk. *Laboratory Animal Science* **45**, 89-93.

Tacket C. O., Losonksy G., Link H., Hoang Y., Guerry P., Hilpert H. and Levine M. M. (1988) Protection by milk immunoglobulin concentrate against oral challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *New England Journal of Medicine* **318**, 1240.

Towbin H., Staehelin T. and Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of National Academic Science* **76**, 4350-4354.

van Sommeren A. P. G., van den Bogaart H. W. M., Schielen W. J. G. and Gribnau T. C. J. (1996) Purification of immunoglobulins from hens egg yolk by immunochromatography on immobilized hCG. *International Journal of Biochromatography* **1**, 261-272.

Wang H., Lottenberg R. and Boyle M. D. P. (1995) Analysis of the interaction of group A streptococci with fibrinogen, streptokinase and plasminogen. *Microbial Pathogenesis* **18**, 153-166.

Warr G. W., Magor K. E. and Higgins D. A. (1995) IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunology Today* **16**, 392-398.

Yokohama H., Peralta R. C., Diaz R., Sendo S., Ikemori Y. and Kodama Y. (1992) Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Infection and Immunity* **60**, 998-1007.

IV- DISCUSSION ET CONCLUSIONS

À l'aube des années soixante, la mise en évidence de la structure-fonction des anticorps a permis une grande avancée dans la connaissance et la compréhension de la liaison antigène-anticorps, cette liaison se faisant exclusivement *via* le fragment Fab de l'anticorps. La découverte de protéines bactériennes liant les immunoglobulines de façon non-immune (PLIg) remis complètement en question ce concept. Ces protéines se lient *via* le fragment Fc de l'anticorps et sembleraient permettre à la bactérie pathogène d'échapper aux mécanismes de défense de l'hôte. Quelque soit leur rôle exact pour ces bactéries, la production de ces protéines fût grandement utile dans le domaine de la recherche fondamentale et appliquée. Les PLIg les plus étudiées, la protéine A (PA) produite par *S. aureus* et la protéine G (PG) produite par les streptocoques des groupes C et G, sont capables de lier différentes IgG de mammifères. Dès lors, des chercheurs ont suggéré la possibilité de les utiliser pour la séparation des IgG des autres composants du sérum. La commercialisation de ces PLIg ouvrit alors les portes à diverses applications en immunodiagnostic. La mise au point de colonnes de chromatographie d'affinité, à l'aide des PA ou PG, facilita la purification des IgG de mammifère à partir du sérum. Ces IgG de mammifères purifiées sont abondamment utilisées dans différents tests immunoenzymatiques.

Durant les 15 dernières années, plusieurs groupes de recherches ont souligné l'avantage de l'utilisation d'IgY de poule dans les tests immunoenzymatiques par rapport aux IgG de mammifères, de même que leur utilisation par administration orale en immunité passive. Sachant que la poule transfère et concentre naturellement ses IgY du sérum vers le jaune d'œuf et que la collecte d'œuf est plus simple qu'un prélèvement sanguin (ponction cardiaque habituellement faite) pour récupérer les IgG des mammifères, l'extraction des IgY à partir du jaune d'œuf fût envisagée. Plusieurs techniques, souvent laborieuses et coûteuses, ont été rapportées dans la littérature, mais constituent actuellement les seuls moyens de purifier des IgY à partir du jaune d'œuf. La chromatographie d'affinité à l'aide de la PA, PG ou d'autres PLIg connues alors, ne pouvait être envisagée, car aucune de ces protéines n'est capable de lier le Fc des IgY. La difficulté d'extraction des IgY contenues dans le jaune d'œuf freina l'utilisation généralisée tant attendue des IgY de poule comme source alternative aux IgG de mammifères.

En 1993, notre groupe de recherche mis en évidence une nouvelle PLIg n'appartenant à aucun des six types officiellement reconnus (Serhir *et al.*, 1993). Cette protéine est produite en grande quantité dans le surnageant de culture de *S. suis* sérotype 2, un pathogène porcine. Son rôle exact dans la pathogénie n'a pas encore été élucidé, mais il est possible qu'il permette à la bactérie d'échapper aux mécanismes de défense de l'hôte tout comme les autres PLIg bactériennes. En 1995, nous avons alors purifié, par chromatographie d'affinité, cette PLIg à l'aide d'un gel « ECH-Sepharose 4B » auquel étaient couplées des IgG de porc (Serhir *et al.*, 1995). En plus de lier différentes IgG de mammifère, cette protéine a la particularité de lier le Fc des IgY de poule. À date et à notre connaissance, la PLIg de *S. suis* sérotype 2 est la seule protéine bactérienne possédant cette propriété unique de lier de façon non-immune les IgY de poule. Serhir *et al.* (1995) ont évalué les masses moléculaires approximatives du doublet formé par la PLIg de *S. suis* sérotype 2 comme étant de 52 et 56 kDa. Nous avons réévalué à l'aide de leur mobilité électrophorétique en gel de polyacrylamide, leur masse moléculaire comme étant plus exactement de 59 et 66 kDa (Annexe 1). Ceci fût confirmé par les résultats de Benkirane *et al.* (1998) démontrant que la PLIg de 59 kDa fait partie de la famille des Hsp de 60 kDa.

Nous avons alors envisagé sa potentielle utilisation pour purifier les IgY contenues dans le jaune d'œuf par chromatographie d'affinité. Pour ce faire, il fallait avant tout coupler la protéine à un gel, puis tester la capacité de ce gel à purifier les IgY à partir du jaune d'œuf.

En microscopie électronique il a été observé que la PLIg de *S. suis* sérotype 2 forme de longs filaments (Serhir *et al.*, 1995). La sélection du gel a donc été basée sur la capacité de la matrice à résister aux conditions draconiennes nécessaires à la dépolymérisation de la protéine. En premier lieu, différentes conditions ont été testées pour évaluer si la PLIg possédait toujours son activité liante pour les IgY après de tels traitements. Par immunobuvardage en spot, nous avons démontré que la PLIg était capable de lier les IgY après un traitement à l'urée (5 M), avec de la Gnd-HCl (3 M), à pH 3.0 ou à pH 10.0.

Pour le couplage nous avons testé trois gels d'agarose exprimant des groupements

chimiques actifs différents (Figure 1). Les gels « CNBr-activated Sepharose 4B » et « ECH-

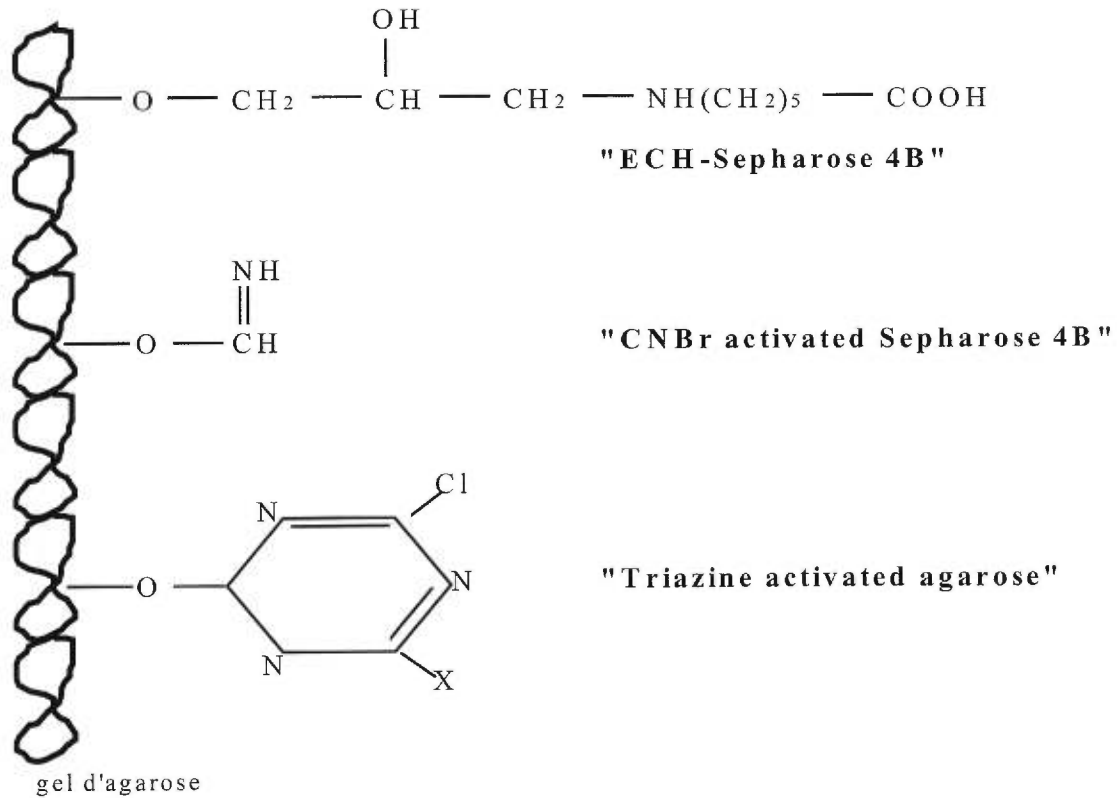


Figure 1. Groupements actifs des différents gels testés pour le couplage de la PLI_g de *S. suis* sérotype 2 à une matrice. X représente un -OH ou -Cl.

Sepharose 4B » lie le ligand par les groupements amines. Dans le cas du gel « ECH-Sepharose 4B », la liaison se fait *via* un bras de 9 carbones hydrophyles, afin d'éloigner le ligand de la surface du gel. Quoiqu'il en soit, aucun couplage n'a été observé entre ces deux gels et la protéine, même lorsque le couplage avec le gel « ECH-Sepharose 4B » était réalisé en présence de 3 M d'hydrochlorure de guanidine (Gnd-HCl) (Annexe 2 Tableau 1.). La Gnd-HCl est généralement utilisée pour favoriser la dépolymérisation d'une protéine.

Le gel « Triazine Activated Agarose 4XL » (TAA) a été testé pour sa capacité à lier la PLI_g de *S. suis* sérotype 2, parce que différentes constructions de la protéine A ont été couplées à ce même gel avec succès en présence de 3 M Gnd-HCl sans en altérer l'activité

liante pour les IgG.

Le couplage de la PLIg de *S. suis* sérotype 2 a été observé avec le gel TAA en présence de Gnd-HCl (3 M). La principale raison de la réussite de ce couplage pourrait être le nombre élevé de liaisons potentielles entre la PLIg et les groupements trichloro-s-triazine. En effet, l'immobilisation de la PLIg avec ce gel peut se faire *via* les groupements amine de la protéine mais aussi imidazole, hydroxyl, thiol et les lysines et les histidines. Il a été démontré que la PLIg de *S. suis* sérotype 2 contient 6 histidines/mol et 24 lysines/mol pour un total de 506 acides aminés/mol (Serhir *et al.*, 1995). L'immobilisation de la protéine au gel TAA nous a permis d'obtenir une colonne expérimentale de 1 ml à laquelle 1 mg de PLIg était fixée.

Le jaune d'œuf contient une grande quantité de divers lipides et lipoprotéines qui devrait être enlevée avant que l'échantillon ne soit appliqué à la colonne d'affinité. Par une extraction au chloroforme/eau, nous avons obtenu une fraction hydrosoluble (FH) contenant des IgY et d'autres protéines du jaune d'œuf. Cette FH pouvait alors être utilisée pour la purification des IgY. Plusieurs techniques pour la purification des IgY à partir de la FH ont été rapportées résultant en l'obtention d'IgY de pureté variable, mais dans tous les cas plusieurs étapes souvent laborieuses ont été nécessaires. Par exemple, Akita et Nakai (1993a) décrivent une méthode de dilution dans de l'eau suivie par une précipitation au sulfate de sodium, une ultrafiltration et d'une filtration sur gel ou chromatographie échangeuse d'anions. Hatta *et al.* (1990) précipitent le jaune d'œuf en utilisant la gomme λ -carragenane, suivi par une chromatographie sur une colonne DEAE-Sephacel et par trois précipitations au sulfate de sodium. Mc Laren *et al.* (1994) rapportent une précipitation à l'acide caprylique et au sulfate d'ammonium. van Sommeren *et al.* (1996) purifient, par chromatographie d'affinité spécifique, des IgY contenues dans le jaune d'œuf de poule immunisée contre la gonadotropine chorionique humaine en couplant l'antigène spécifique au gel « N-hydroxysuccinimide-activated Sepharose 4 Fast Flow ».

La chromatographie d'affinité générale (i.e. liaison non-immune entre un anticorps et un antigène) est la seule méthode appropriée lorsque l'antigène spécifique à un anticorps est

non disponible sous forme pure ou est disponible mais en faible quantité ou encore lorsque les anticorps totaux sont recherchés. Nous avons utilisé la chromatographie d'affinité générale pour purifier les IgY à partir de la FH. Comparée aux autres méthodes, notre technique de chromatographie d'affinité ne nécessite que deux étapes: une étape pour enlever les lipides et les lipoprotéines du jaune d'œuf et une étape pour séparer les IgY des autres protéines par chromatographie d'affinité. En utilisant cette nouvelle technique, nous avons obtenu un rendement de 51 % d'IgY contenue dans la FH avec une pureté de 83 %.

Stewart (1993) a analysé le décrochage de molécules de faible masse moléculaire immobilisée à deux matrices différentes. Il a observé qu'en 30 jours à pH 9.0, le gel de triazine ne perd que 0,6 % de son ligand immobilisé comparé à 50 % avec le gel CNBr. L'attachement de la protéine immobilisée sur un gel TAA, en de multiples endroits devrait réduire significativement le taux de décrochage permettant ainsi une durée de vie plus longue pour la colonne. Dans notre étude, le prototype de colonne d'affinité que nous avons mis au point a été utilisé jusqu'à 30 fois sans une diminution de la capacité de liaison ou décrochage de la PLIg. Toutefois le multi-attachement pourrait masquer le site de liaison de l'IgY sur la molécule de PLIg. Dans le cas de la colonne PLIg-TAA, un haut rendement a été obtenu, indiquant que la majorité des sites de liaison sur la PLIg étaient probablement bien exposée.

Plusieurs études ont démontré que la spécificité et l'avidité des IgY de poule étaient comparables à celles des IgG de lapin, souris ou cobaye (Fertel *et al.*, 1981; Bauwens *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1991). Ainsi, notre technique de purification des IgY à partir du jaune d'œuf par chromatographie d'affinité pourra permettre une reconsidération de l'utilisation de l'IgY en immunodiagnostic à la place des IgG de mammifères couramment utilisées. Elle permettra aussi une plus grande application dans le domaine immunothérapeutique, où l'administration orale des IgY en recherche a déjà fait ses preuves.

La PLIg de *S. suis* sérotype 2 immobilisée représente un outil intéressant pour la purification d'IgY de poule contenue dans le jaune d'œuf par chromatographie d'affinité. Le plus grand désavantage de l'extraction des lipides du jaune d'œuf pour l'obtention de la

FH a été l'utilisation de chloroforme, un solvant toxique. Toutefois, d'autres techniques pour l'extraction des lipides peuvent être utilisées à la place de l'extraction chloroforme/eau, comme par exemple, la méthode de dilution dans de l'eau (Akita et Nakai, 1993a), la précipitation au λ -carragenane (Hatta *et al.*, 1990) ou par la méthode de congélation-décongélation (Svendsen *et al.*, 1995). L'utilisation de la chromatographie d'affinité comme procédure de purification réduit énormément le nombre d'étapes nécessaires à la purification d'une molécule, minimisant ainsi les coûts et le temps de travail. De plus, des quantités d'IgY de l'ordre du gramme pourraient être obtenues en utilisant une colonne plus grande.

Nous avons également montré que notre procédure est reproductible et représente une amélioration en comparaison aux méthodes existantes. La technique que nous avons développée pour purifier les IgY est simple, rapide, permet d'obtenir des IgY de haute pureté et pourrait être facilement adaptée à plus large l'échelle pour une grande production d'IgY. La purification d'IgY par chromatographie d'affinité générale combinée à la fois à une grande productivité d'anticorps par la poule comparée aux mammifères de même taille, et à la simplicité de la collecte des œufs au lieu d'une ponction sanguine de l'animal, devrait favoriser l'utilisation de la poule comme producteur d'anticorps.

Ce projet de maîtrise a donc permis de coupler efficacement la PLIg de *S. suis* sérotype 2 au gel « Triazine Activated Agarose » en présence de 3 M Gnd-HCl et de purifier des IgY à partir de jaune d'œuf avec un rendement de 51 % et une pureté de 83 %. Il serait à présent intéressant d'optimiser et de valider cette technique à l'aide d'une plus grande colonne. Une étude plus approfondie du site de liaison des IgY sur la PLIg de *S. suis* sérotype 2 permettrait de coupler le fragment portant l'activité IgY liante au gel, de façon à obtenir une colonne plus performante. Cette dernière servirait à purifier des IgY contenues dans les œufs d'une poule immunisée contre un antigène X, afin de vérifier si notre technique de purification altère les fonctions de reconnaissance antigénique de l'IgY pour son antigène X.

V- BIBLIOGRAPHIE

- Akerström B. et Björck L. (1986).** A physicochemical study of protein G, a molecule with unique immunoglobulin G-binding properties. *Journal of Biological Chemistry*. **261** : 10240-10247.
- Akerström B., Lindqvist A., Maelen C. V., Grubb A., Lindahl G. et Vaerman J. P. (1994).** Interaction between streptococcal protein Arp and different molecular forms of human immunoglobulin A. *Molecular Immunology*. **31** : 393-400.
- Akesson P., Schmidt K. H., Cooney J. et Björck L. (1994).** M1 protein and protein H: IgG_{Fc}- and albumin-binding streptococcal surface proteins encoded by adjacent genes. *Biochemical Journal*. **300** : 877-886.
- Akita E. M. et Nakai S. (1992).** Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification. *Journal of Food Science*. **135** : 2589-2592.
- Akita E. M. et Nakai S. (1993a).** Comparaison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *Escherichia coli* strain. *Journal of Immunological Methods*. **160** : 207-214.
- Akita E. M. et Nakai S. (1993b).** Production and purification of Fab' fragments from chicken egg yolk immunoglobulin Y (IgY). *Journal of Immunological Methods*. **162** : 155-164.
- Akita E. M. et Nakai S. (1994).** Preparation and purification of Fab' immunoreactive fragments from chicken egg immunoglobulin using pepsin and *Aspergillus saitoi* protease. pp. 228-239. Dans Sim J. S. et Nakai S. (ed), Egg uses and processing technologies new developments, vol. CAB International, Oxon, U. K.
- Al-Mashikhi S. A., Li-Chan E. et Nakai S. (1988).** Separation of immunoglobulins and lactoferrin from cheese whey by chelating chromatography. *Journal of Dairy Science*. **71** : 1747-1755.
- Al-Mashikhi S. A. et Nakai S. (1988).** Separation of immunoglobulin and transferrin from blood serum and plasma by metal chelate interaction chromatography. *Journal of Dairy Science*. **71** : 1756-1763.
- Alouf J. et Muller-Alouf H. (1996).** Cellular constituents and extracellular proteins involved in the pathogenic capacity of *Streptococcus* group A. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. **54** : 49-59.

- Amini H. R., Ascencio F., Cruz-Villacorta A., Ruiz-Bustos E. et Wadström T. (1996).** Immunochemical properties of a 60 kDa cell surface-associated heat shock-protein (Hsp60) from *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. **16** : 163-172.
- Arends J. P. et Zanen H. C. (1988).** Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *Reviews of Infectious Diseases*. **10** : 131-137.
- Balber A. E. et Sturtevant J. E. (1986).** A surface glycoprotein of *Trypanosoma lewisi* binds immunoglobulin G from the serum of uninfected rats. *Infection and Immunity*. **53** : 420-426.
- Bartz C. R., Conklin R. H., Tunstall C. B. et Steele J. H. (1980).** Prevention of murine rotavirus infection with chicken egg yolk immunoglobulins. *Journal of Infectious Diseases*. **142** : 439-441.
- Bauwens R. M., Kint J. A., Devos M. P., Van Brussel K. A. et De Leenheer A. P. (1987).** Production, purification and characterization of antibodies to 1,25-dihydroxyvitamin D raised in chicken egg yolk. *Clinica Chimica Acta*. **170** : 37-44.
- Beaudoin M., Harel J., Higgins R., Gottschalk M., Frenette M. et MacInnes J. I. (1992).** Molecular analysis of isolates of *Streptococcus suis* capsular type 2 by restriction-endonuclease-digested DNA separated on SDS-PAGE and by hybridization with an rDNA probe. *Journal of General Microbiology*. **138** : 2639-2645.
- Benedict A. A. et Berestecky J. M. (1987).** Special features of avian immunoglobulins. pp. 113-125. Dans Toivanen A. et Toivanen P. (ed), Avian immunology: basis and practice, vol. 1. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Benkirane R., Gottschalk M. G. et Dubreuil J. D. (1997).** Identification of a *Streptococcus suis* 60-kDa heat-shock protein using Western blotting. *FEMS Microbiology Letters*. **153** : 379-385.
- Benkirane R., Gottschalk M. G., Jacques M. et Dubreuil J. D. (1998).** Immunochemical characterization of an IgG-binding protein of *Streptococcus suis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. **20** : 121-127.
- Benson H. N., Brumfield H. P. et Pomeroy B. S. (1961).** Requirement of avian C1 for fixation of guinea pig complement by avian antibody-antigen complexes. *Journal of Immunology*. **87** : 616.

- Bentley R. W., Leigh J. A. et Collins M. D. (1991).** Intrageneric structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **41** : 487-494.
- Bessen D. et Fischetti V. A. (1990).** A human IgG receptor of group A streptococci is associated with tissue site of infection and streptococcal class. *Journal of Infectious Diseases*. **161** : 747-754.
- Bessen D. et Fischetti V. A. (1992).** Nucleotide sequences of two adjacent M and M-like protein genes of group A streptococci: different RNA transcript levels and identification of a unique immunoglobulin A-binding protein. *Infection and Immunity*. **60** : 124-135.
- Björck L. (1988).** Protein L. A novel bacterial cell wall protein with affinity for Ig L chains. *Journal of Immunology*. **140** : 1194-1197.
- Björck L. et Akerström B. (1990a).** Protein L: a peptococcal cell wall protein with affinity for immunoglobulin light chains. pp. 267-278. Dans Boyle M. D. P. (ed), *Bacterial immunoglobulin-binding proteins*, vol. 1. Academic Press, Inc., San Diego, Ca.
- Björck L. et Akerström B. (1990b).** Streptococcal protein G. pp. 113-126. Dans Boyle M. D. P. (ed), *Bacterial immunoglobulin-binding proteins*, vol. 1. Academic Press, Inc., San Diego, Ca.
- Björck L. et Kronvall G. (1984).** Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *Journal of Immunology*. **133** : 969-974.
- Björk I., Petersson B. A. et Sjoquist J. (1972).** Some physicochemical properties of protein A from *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Biochemistry*. **29** : 579-584.
- Bokisch V. A., Bernstein D. et Krause R. M. (1972).** Occurrence of 19S and 7S anti-IgGs during hyperimmunization of rabbits with streptococci. *Journal of Experimental Medicine*. **136** : 799-815.
- Boyle M. D. (1995).** Variation of multifunctional surface binding proteins--a virulence strategy for group A streptococci? *Journal of Theoretical Biology*. **173** : 415-426.
- Boyle M. D., Hawlitzky J., Raeder R. et Podbielski A. (1994).** Analysis of genes encoding two unique type IIa immunoglobulin G-binding proteins expressed by a single group A streptococcal isolate. *Infection and Immunity*. **62** : 1336-1347.
- Boyle M. D. P. (1990a).** Applications in immunotechnology, *Bacterial immunoglobulin-binding proteins*, Boyle M. D. P. Academic Press, Inc., San Diego, Ca.

- Boyle M. D. P. (1990b).** The type I bacterial immunoglobulin-binding protein: Staphylococcal protein A. pp. 17-28. Dans Boyle M. D. P. (ed), Bacterial immunoglobulin-binding proteins, vol. 1. Academic Press, Inc., San Diego, Ca.
- Boyle M. D. P. et Reis K. J. (1990).** Antigenic relationships among bacterial immunoglobulin-binding proteins. pp. 175-186. Dans Boyle M. D. P. (ed), Bacterial immunoglobulin-binding proteins, vol. 1. Academic Press, Inc., San Diego, Ca.
- Brussow H., Hilpert H., Walther I., Sidoti J., Mietens C. et Bachmann P. (1987).** Bovine milk immunoglobulins for passive immunity to infantile rotavirus gastro-enteritis. *Journal of Clinical Microbiology*. **25** : 982-986.
- Canadian Egg Marketing Agency (1997).** . Dans (ed), , vol. , Ottawa, Ontario.
- Carroll S. B. et Stollar B. D. (1983).** Antibodies to calf thymus RNA polymerase II from egg yolks of immunized hens. *Journal of Biological Chemistry*. **258** : 24-26.
- Charland N., Harel J., Kobish M., Lacasse S. et Gottschalk M. (1998).** *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology*. **144** : 325-332.
- Charland N., Kobisch M., Martineau-Doize B., Jacques M. et Gottschalk M. (1996).** Role of capsular sialic acid in virulence and resistance to phagocytosis of *Streptococcus suis* capsular type 2. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. **14** : 195-203.
- Chartrand S. L., Litman G. W., Lapointe N., Good R. A. et Frommel D. (1971).** The evolution of the immune response. XII. The immunoglobulins of the turtle. Molecular requirements for biologic activity of 5. *Journal of Immunology*. **107** : 1-11.
- Chatellier S., Harel J., Zhang Y., Gottschalk M., Higgins R., Devriese L. A. et Brousseau R. (1998).** Phylogenetic diversity of *Streptococcus suis* strains of various serotypes as revealed by 16 S rRNA gene sequence comparison. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **48** : 581-589.
- Chen C. H., Pickel J. M., Lahti J. M. et Cooper M. D. (1990).** Surface markers on avian immune cells. pp. 1-15. Dans Sharma J. M. (ed), Avian cellular immunology, vol. CRC Press, Boca Raton Boston Ann Arbor.
- Chhatwal G. S. et Blobel H. (1987).** Isolation and properties of a novel IgG-binding protein from streptococci of serological group U. *Medical Microbiology and Immunology*. **176** : 1-12.

- Christensen P., Johansson B. G. et Kronvall G. (1976).** Interaction of streptococci with the Fc fragment of IgG. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica - Section C, Immunology*. **84** : 73-76.
- Christensen P. et Schalèn C. (1990).** Bacterial Fc receptors as putative virulence factors. pp. 347-361. Dans Boyle M. D. P. (ed), *Bacterial immunoglobulin-binding proteins*, vol. 1. Academic Press, Inc., San Diego, Ca.
- Chu F. S. (1990).** Immunoassays for mycotoxins: current state of the art, commercial and epidemiological applications. *Veterinary and Human Toxicology*. **32** : 42-50.
- Clarke J. R., Marquardt R. R., Frohlich A. A., Oosterveld A. et Madrid F. J. (1994).** Isolation, characterisation, and application of hen egg yolk polyclonal antibodies. pp. 207-212. Dans Sim J. S. et Nakai S. (ed), *Egg uses and processing technologies new developments*, vol. CAB International, Oxon, U.K.
- Cleary P. P., LaPenta D., Heath D., Haanes E. J. et Chen C. (1991).** A virulence regulon in *Streptococcus pyogenes*. pp. 147-151. Dans Dunny G. M., Cleary P. P. et McKay L. L. (ed), *Genetics and molecular biology of streptococci, lactococci and enterococci*, vol. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Cooper M. D., Raymond D. A., Peterson R. D., South M. A. et Good R. A. (1966).** The functions of the thymus system and the bursa system in the chicken. *Journal of Experimental Medicine*. **123** : 75-102.
- Corbeil L. B., Bastida-Corcuera F. D. et Beveridge T. J. (1997).** *Haemophilus somnus* immunoglobulin binding proteins and surface fibrils. *Infection and Immunity*. **65** : 4250-4257.
- Cuatrecasas P. (1970).** Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrylamide beads. *Journal of Biological Chemistry*. **245** : 3059-3065.
- De Miranda-Santos I. K. et Compos-Neto A. (1981).** Receptor for immunoglobulin Fc on pathogenic but not on nonpathogenic protozoa of the Trypanosomatidae. *Journal of Experimental Medicine*. **154** : 1732-1742.
- Dean P. D. G., Johnson W. S. et Middle F. A. (1985).** Affinity chromatography, Practical Approach Series, Rickwood D. et Hames B. D. IRL Press, Oxford and Washington DC.

- Deisenhofer J. (1981).** Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution. *Biochemistry*. **20** : 2361-2370.
- Deisenhofer J., Colman P. M., Huber R., Haupt H. et Schwick G. (1976).** Crystallographic structural studies of a human Fc-fragment. I. An electron-density map at 4 Å resolution and a partial model. *Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie*. **357** : 435-445.
- Denzin N. et Henrion E. (1996).** Raising of antibodies against *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* in chicken and isolation of the immunoglobulins (IgY) from the egg yolk. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. **16** : 47-50.
- Devriese L. A., Desmidt M., Roels S., Hoorens J. et Haesebrouck F. (1993).** *Streptococcus suis* infection in fallow deer. *Veterinary Record*. **132** : 283.
- Devriese L. A., Haesebrouck F., Dehert P., Dom P., ducatelle R., Desmidt M., Messier S. et Higgins R. (1994).** *Streptococcus suis* infections in birds. *Avian Pathology*. **23** : 721-724.
- Ebina T., Sato A., Umezu K., Ishida N., Ohyama S., Oizumi A., Aikawa K., Katagiri S., Katsushima N., Imai A. et et al. (1985).** Prevention of rotavirus infection by oral administration of cow colostrum containing antihumanrotavirus antibody. *Medical Microbiology and Immunology*. **174** : 177-185.
- Ebina T., Tsukada K., Umezu K., Nose M., Tsuda K., Hatta H., Kim M. et Yamamoto T. (1990).** Gastroenteritis in suckling mice caused by human rotavirus can be prevented with egg yolk immunoglobulin (IgY) and treated with a protein-bound polysaccharide preparation (PSK). *Microbiology and Immunology*. **34** : 617-629.
- Edelman G. M. (1959).** Dissociation of d-globulin. *Journal of American Chemistry Society*. **81** : 3155-3156.
- Elliott S. D. et Tai J. Y. (1978).** The type-specific polysaccharides of *Streptococcus suis*. *Journal of Experimental Medicine*. **148** : 1699-1704.
- Endresen C. (1979).** The binding of protein A of immunoglobulin G and of Fab and Fc fragments. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica - Section C, Immunology*. **87C** : 185-189.

- Erhart M., Kellner J., Kuhlmann R. et Losch U. (1991).** Influence of various adjuvants on the synthesis of specific antibodies of chicken, sheep and rabbit following immunization with an hapten. *Zentralblatt Fur Veterinarmedizin - Reihe A.* **38** : 21-27.
- Erickson E. D., Doster A. R. et Pokorny T. S. (1984).** Isolation of *Streptococcus suis* from swine in Nebraska. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* **185** : 666-668.
- Erntell M., Myhre E. B. et Kronvall G. (1983).** Alternative non-immune F(ab')₂-mediated immunoglobulin binding to group C and G streptococci. *Scandinavian Journal of Immunology.* **17** : 201-209.
- Erntell M., Myhre E. B. et Kronvall G. (1985).** Non-immune IgG F(ab')₂ binding to group C and G streptococci is mediated by structures on γ chains. *Scandinavian Journal of Immunology.* **21** : 151-157.
- Erntell M., Myhre E. B. et Kronvall G. (1986).** Two separate non-immune interactions between staphylococcal protein A and immunoglobulins are mediated by structures on gamma chains. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica - Section B, Microbiology.* **94** : 69-73.
- Erntell M., Myhre E. B., Sjöbring U. et Björck L. (1988a).** Streptococcal protein G has affinity for both Fab- and Fc-fragments of human IgG. *Molecular Immunology.* **25** : 121-126.
- Erntell M., Sjöbring U., Myhre E. B. et Kronvall G. (1988b).** Non-immune Fab- and Fc-mediated interactions of avian Ig with *Staphylococcus aureus* and group C and G streptococci. *Apmis.* **96** : 239-249.
- Fahnestock S. R., Alexander P., Nagle J. et Filpula D. (1986).** Gene for an immunoglobulin-binding protein from a group G streptococcus. *Journal of Bacteriology.* **167** : 870-880.
- Faith R. E. et Clem L. W. (1973).** Passive cutaneous anaphylaxis in the chicken. Biological fractionation of the mediating antibody population. *Immunology.* **25** : 151-164.
- Feder I., Chengappa M. M., Fenwick B., Rider M. et Staats J. (1994).** Partial characterization of *Streptococcus suis* type 2 hemolysin. *Journal of Clinical Microbiology.* **32** : 1256-1260.

- Fehrer S. L., Boyle M. D. et Halliwell R. E. (1988).** Identification of protein A from *Staphylococcus intermedius* isolated from canine skin. *American Journal of Veterinary Research*. **49** : 697-701.
- Fellah J. S., Kerfourn F., Wiles M. V., Schwager J. et Charlemagne J. (1993).** Phylogeny of immunoglobulin heavy chain isotypes: structure of the constant region of *Ambystoma mexicanum* epsilon chain deduced from cDNA sequence. *Immunogenetics*. **38** : 311-317.
- Fertel R., Yetiv J. Z., Coleman M. A., Schwarz R. D., Greenwald J. E. et Bianchine J. R. (1981).** Formation of antibodies to prostaglandins in the yolk of chicken eggs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **102** : 1028-1033.
- Fichtali J., Charter E. A., Lo K. V. et Nakai S. (1994).** A new process for IgY isolation from industrially separated egg yolk including automation and scale-up. pp. 213-227. Dans Sim J. S. et Nakai S. (ed), Egg uses and processing technologies new developments, vol. CAB International, Oxon, U. K.
- Fischetti V. A., Gotschlich E. C., Siviglia G. et Zabriskie J. B. (1976).** Streptococcal M protein extracted by nonionic detergent. I. Properties of the antiphagocytic and type-specific molecules. *Journal of Experimental Medicine*. **144** : 32-53.
- Forsgren A. et Grubb A. O. (1979).** Many bacterial species bind human IgD. *Journal of Immunology*. **122** : 1468-1472.
- Forsgren A. et Sjöquist J. (1966).** "Protein A" from *Staphylococcus aureus*: Pseudo-immune reaction with human γ -globulin. *The Journal of Immunology*. **97** : 822-827.
- Gassmann M., Thommes P., Weiser T. et Hubscher U. (1990).** Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB Journal*. **4** : 2528-2532.
- Gomi H., Hozumi T., Hattori S., Tagawa C., Kishimoto F. et Bjorck L. (1990).** The gene sequence and some properties of protein H. A novel IgG-binding protein. - *Journal of Immunology*. **144** : 4046-4052.
- Gottschalk M., Higgins R., Jacques M., Beaudoin M. et Henrichsen J. (1991).** Isolation and characterization of *Streptococcus suis* capsular types 9-22. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. **3** : 60-65.

- Gottschalk M., Higgins R., Jacques M. et Dubreuil D. (1992).** Production and characterization of two *Streptococcus suis* capsular type 2 mutants. *Veterinary Microbiology*. **30** : 59-71.
- Gottschalk M., Higgins R., Jacques M., Mittal K. R. et Henrichsen J. (1989).** Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. *Journal of Clinical Microbiology*. **27** : 2633-2636.
- Gottschalk M., Lebrun A., Jacques M. et Higgins R. (1990).** Hemagglutination properties of *Streptococcus suis*. *Journal of Clinical Microbiology*. **28** : 2156-2158.
- Gottschalk M. G., Lacouture S. et Dubreuil J. D. (1995).** Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin. *Microbiology*. **141** : 189-195.
- Gottstein B. et Hemmeler E. (1985).** Egg yolk immunoglobulin Y as an alternative antibody in the serology of echinococcosis. *Zeitschrift fur Parasitenkunde*. **71** : 273-276.
- Grenier D. et Michaud J. (1994).** Demonstration of human immunoglobulin G Fc-binding activity in oral bacteria. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. **1** : 247-249.
- Grey H. M. (1967).** Duck immunoglobulins. I. Structural studies on a 5.7S and 7.8S gamma-globulin. *Journal of Immunology*. **98** : 811-819.
- Guss B., Eliasson M., Olsson A., Uhlen M., Frej A. K., Jornvall H., Flock J. I. et Lindberg M. (1986).** Structure of the IgG-binding regions of streptococcal protein G. *EMBO Journal*. **5** : 1567-1575.
- Guss B., Lindberg M. et Uhlén M. (1990).** The gene for staphylococcal protein A. pp. 29-39. Dans Boyle M. D. P. (ed), *Bacterial immunoglobulin-binding proteins*, vol. 1. Academic Press, Inc., San Diego, Ca.
- Haanes E. J. et Cleary P. P. (1989).** Identification of a divergent M protein gene and an M protein-related gene family in *Streptococcus pyogenes* serotype 49. *Journal of Bacteriology*. **171** : 6397-6408.
- Harel J., Higgins R., Gottschalk M. et Bigras-Poulin M. (1994).** Genomic relatedness among reference strains of different *Streptococcus suis* serotypes. *Canadian Journal of Veterinary Research*. **58** : 259-262.
- Hassl A. et Aspöck H. (1988).** Purification of egg yolk immunoglobulins. A two-step procedure using hydrophobic interaction chromatography and gel filtration. *Journal of Immunological Methods*. **110** : 225-228.

- Hassl A., Aspöck H. et Flamm H. (1987).** Comparative studies on the purity and specificity of yolk immunoglobulin Y isolated from eggs laid by hens immunized with *Toxoplasma gondii* antigen. *Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology - Series A.* **267** : 247-253.
- Hatta H., Kim M. et Yamamoto T. (1990).** A novel isolation method for hen egg yolk antibody, "IgY". *Agricultural and Biological Chemistry.* **54** : 2531-2535.
- Hatta H., Mabe K., Kim M., Yamamoto T., Gutierrez M. A. et Miyazaki T. (1994).** Prevention of fish disease using egg yolk antibody. pp. 241-249. Dans Sim J. S. et Nakai S. (ed), *Egg uses and processing technologies new developments*, vol. CAB International, Oxon, U. K.
- Hatta H., Tsuda K., Akachi S., Kim M. et Yamamoto T. (1993).** Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.* **57** : 450-454.
- Hatta H., Tsuda K., Ozeki M., Kim M., Yamamoto T., Otake S., Hirasawa M., Katz J., Childers N. K. et Michalek S. M. (1997).** Passive immunization against dental plaque formation in humans: effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to *Streptococcus mutans*. *Caries Research.* **31** : 268-274.
- Haynes J. D., Rosenstein R. W. et Askenase P. W. (1978).** A newly described activity of guinea pig IgG1 antibodies: transfer of cutaneous basophil reactions. *Journal of Immunology.* **120** : 886-894.
- Heath D. G. et Cleary P. P. (1989).** Fc-receptor and M-protein genes of group A streptococci are products of gene duplication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **86** : 4741-4745.
- Helm B. A., Ling Y., Teale C., Padlan E. A. et Brüggemann M. (1991).** The nature and importance of the inter-epsilon chain disulfide bonds in human IgE. *European Journal of Immunology.* **21** : 1543-1548.
- Higgins R. et Gottschalk M. (1990).** An update on *Streptococcus suis* identification. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* **2** : 249-252.
- Higgins R., Gottschalk M., Boudreau M., Lebrun A. et Henrichsen J. (1995).** Description of six new capsular types (29-34) of *Streptococcus suis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* **7** : 405-406.

- Hilpert H., Gerber H., Pahud J. J., Ballabriga A., Arcalis L., Farriaux F., De Leyer E. et Nussle D. (1977).** Bovine milk immunoglobulins (Ig). Their possible utilization in industrially prepared infant's milk formula. pp. 182. Dans Hambræus L., Hanson L. et McFarlane H. (ed), Food and immunology, vol. Almquist and Wiksell International, Stockholm.
- Hjelm H., Hjelm K. et Sjöquist J. (1972).** Protein A from *Staphylococcus aureus*. Its isolation by affinity chromatography and its use as an immunosorbent for isolation of immunoglobulins. *FEBS Letters*. **28** : 73-76.
- Huber R., Deisenhofer J., Colman P. M., Matsushima M. et Palm W. (1976).** Crystallographic structure studies of an IgG molecule and an Fc fragment. *Nature*. **264** : 415-420.
- Husmann L. K., Scott J. R., Lindahl G. et Stenberg L. (1995).** Expression of the Arp protein, a member of the M protein family, is not sufficient to inhibit phagocytosis of *Streptococcus pyogenes*. *Infection and Immunity*. **63** : 345-348.
- Ingnas M. (1981).** Comparison of mechanisms of interaction between protein A from *Staphylococcus aureus* and human monoclonal IgG, IgA and IgM in relation to the classical FC gamma and the alternative F(ab')₂ epsilon protein A interactions. *Scandinavian Journal of Immunology*. **13** : 343-352.
- Jacobs A. A., Loeffen P. L., van den Berg A. J. et Störm P. K. (1994).** Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*. *Infection and Immunity*. **62** : 1742-1748.
- Jacques M., Gottschalk M., Foiry B. et Higgins R. (1990).** Ultrastructural study of surface components of *Streptococcus suis*. *Journal of Bacteriology*. **172** : 2833-2838.
- Janson H., Heden L. O. et Försgren A. (1992).** Protein D, the immunoglobulin D-binding protein of *Haemophilus influenzae*, is a lipoprotein. *Infection and Immunity*. **60** : 1336-1342.
- Jensenius J. C., Andersen I., Hau J., Crone M. et Koch C. (1981).** Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. *Journal of Immunological Methods*. **46** : 63-68.

- Jianmin Y., Zhigang J., Qiong Y., Taolan Y., Huipeng W. et Lianrui L. (1997).** The selective recognition of antibody IgY for digestive system cancers. *Chinese Journal of Biotechnology*. **13** : 85-90.
- Jonsson H. et Müller H. P. (1994).** The type-III Fc receptor from *Streptococcus dysgalactiae* is also an α_2 -macroglobulin receptor. *European Journal of Biochemistry*. **220** : 819-826.
- Jonsson P., Lindberg M., Haraldsson I. et Wadström T. (1985).** Virulence of *Staphylococcus aureus* in a mouse mastitis model: studies of alpha hemolysin, coagulase, and protein A as possible virulence determinants with protoplast fusion and gene cloning. *Infection and Immunity*. **49** : 765-769.
- Kaspers B., Bondl H. et Gobel T. W. (1996).** Transfer of IgA from albumen into the yolk sac during embryonic development in the chicken. *Zentralblatt Fuer Veterinaermedizin - Reihe A*. **43** : 225-231.
- Kastern W., Holst E., Nielsen E., Sjöbring U. et Björck L. (1990).** Protein L, a bacterial immunoglobulin-binding protein and possible virulence determinant. *Infection and Immunity*. **58** : 1217-1222.
- Kato K., Lian L. Y., Barsukov I. L., Derrick J. P., Kim H., Tanaka R., Yoshino A., Shiraishi M., Shimada I., Arata Y. et Roberts G. C. (1995).** Model for the complex between protein G and an antibody Fc fragment in solution. *Structure*. **3** : 79-85.
- Kehoe M. A. (1994).** Cell-wall-associated proteins in Gram-positive bacteria, The bacterial cell wall, Guysen J. M. et Hachenbuck R. Elsevier, Amsterdam.
- Kilpper-Bälz R. et Schleifer K. (1987).** *Streptococcus suis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **37** : 160-162.
- Klein M., Haeffner-Cavaillon N., Isenman D. E., Rivat C., Navia M. A., Davies D. R. et Dorrington K. J. (1981).** Expression of biological effector functions by immunoglobulin G molecules lacking the hinge region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **78** : 524-528.
- Krebs B., Kaufhold A., Boyle M. D. P. et Podbielski A. (1996).** Different alleles of the fcrA/mrp gene of *Streptococcus pyogenes* encode M-related proteins exhibiting an identical immunoglobulin-binding pattern. *Medical Microbiology and Immunology*. **185** : 39-47.

- Kronvall G. (1973).** A surface component in group A, C, and G streptococci with non-immune reactivity for immunoglobulin G. *Journal of Immunology*. **111** : 1401-1406.
- Kronvall G. (1990).** Historical perspective. pp. 1-16. Dans Boyle M. D. P. (ed), Bacterial immunoglobulin-binding proteins, vol. 1. Academic Press, Inc., San Diego, Ca.
- Kurl D. N., Haataja S. et Finne J. (1989).** Hemagglutination activities of group B, C, D, and G streptococci: demonstration of novel sugar-specific cell-binding activities in *Streptococcus suis*. *Infection and Immunity*. **57** : 384-389.
- Labbé S. et Grenier D. (1995).** Characterization of the human immunoglobulin G Fc-binding activity in *Prevotella intermedia*. *Infection and Immunity*. **63** : 2785-2789.
- Lämmle C. et Blobel H. (1990).** Type III Fc receptors from streptococci of serological group L. pp. 127-131. Dans Boyle M. D. P. (ed), Bacterial immunoglobulin-binding proteins, vol. 1. Academic Press, Inc., San Diego, Ca.
- Langone J. J. (1982).** Protein A of *Staphylococcus aureus* and related immunoglobulin receptors produced by streptococci and pneumococci. *Advances in Immunology*. **32** : 157-252.
- Larsson A., Karlsson-Parra A. et Sjöquist J. (1991).** Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors. *Clinical Chemistry*. **37** : 411-414.
- Larsson A. et Sjöquist J. (1988).** Chicken antibodies: a tool to avoid false positive results by rheumatoid factor in latex fixation tests. *Journal of Immunological Methods*. **108** : 205-208.
- Larsson A. et Sjöquist J. (1989).** Novel latex agglutination method with chicken anti-protein A for detection of *Staphylococcus aureus* infections. *Journal of Clinical Microbiology*. **27** : 2856-2857.
- Larsson A. et Sjöquist J. (1990).** Chicken IgY: utilizing the evolutionary difference. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. **13** : 199-201.
- Larsson A., Wejaker P. E. et Sjöquist J. (1992).** Chicken anti-protein A for the detection and capturing of protein A from *Staphylococcus aureus* in the presence or absence of mammalian IgG. *Hybridoma*. **11** : 239-243.

- Lee K., Ametani A., Shimizu M., Hatta H., Yamamoto T. et Kaminogawa S. (1991).** Production and characterization of anti-human insulin antibodies in the hen's egg. *Agricultural and Biological Chemistry*. **55** : 2141-2143.
- Leslie G. A. et Clem L. W. (1969).** Phylogeny of immunoglobulin structure and function. III- Immunoglobulins of the chicken. *Journal of Experimental Medecine*. **130** : 1337-1352.
- Leslie G. A. et Clem L. W. (1972).** Phylogeny of immunoglobulin structure and function. VI. 17S, 7.5S and 5.7S anti-DNP of the turtle, *Pseudamys scripta*. *Journal of Immunology*. **108** : 1656-1664.
- Lindahl G. (1989).** Cell surface proteins of a group A streptococcus type M4: the IgA receptor and a receptor related to M proteins are coded for by closely linked genes. *Molecular and General Genetics*. **216** : 372-329.
- Lindahl G. (1990).** Receptor for immunoglobulins in *Clostridium perfringens*: binding in the F(ab')₂ region. pp. 257-265. Dans Boyle M. D. P. (ed), Bacterial immunoglobulin-binding proteins, vol. 1. Academic Press, Inc., San Diego, Ca.
- Lindahl G. et Akerström B. (1989).** Receptor for IgA in group A streptococci: cloning of the gene and characterization of the protein expressed in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. **3** : 239-247.
- Lindahl G. et Kronvall G. (1988).** Nonimmune binding of Ig to *Clostridium perfringens*. Preferential binding of IgM and aggregated IgG. *Journal of Immunology*. **140** : 1223-1227.
- Lindmark R., Movitz J. et Sjöquist J. (1977).** Extracellular protein A from a methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Biochemistry*. **74** : 623-628.
- Liu S. S. et Higgins D. A. (1990).** Yolk-sac transmission and post-hatching ontogeny of serum immunoglobulins in the duck (*Anas platyrhynchos*). *Comparative Biochemistry and Physiology - B: Comparative Biochemistry*. **97** : 637-644.
- Loeken M. R. et Roth T. F. (1983).** Analysis of maternal IgG subpopulations which are transported into the chicken oocyte. *Immunology*. **49** : 21-28.
- Magor K. E., Higgins D. A., Middleton D. L. et Warr G. W. (1994).** One gene encodes the heavy chains for three different forms of IgY in the duck. *Journal of Immunology*. **153** : 5549-5555.

- Martens C. L., Currier S. J. et Knight K. L. (1984).** Molecular genetic analysis of genes encoding the heavy chains of rabbit IgG. *Journal of Immunology*. **133** : 1022-1027.
- Martin W. G. et Cook W. H. (1958).** Preparation and molecular weight of γ -livetin from egg yolk. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. **36** : 153-160.
- Masteller E. L. et Thompson C. B. (1994).** B cell development in the chicken. *Poultry Science*. **73** : 998-1011.
- McCannel A. A. et Nakai S. (1989).** Isolation of egg yolk immunoglobulin-rich fractions using copper-loaded metal chelate interaction chromatography. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*. **22** : 487-490.
- McCannel A. A. et Nakai S. (1990).** Separation of egg yolk immunoglobulins into subpopulations using DEAE-ion exchange chromatography. *Canadian Institut of Food Science and Technology Journal*. **23** : 42-46.
- McLandsborough L. A. et Cleary P. P. (1995).** Insertional inactivation of virR in *Streptococcus pyogenes* M49 demonstrates that VirR functions as a positive regulator of ScpA, FcRA, OF, and M protein. *FEMS Microbiology Letters*. **128** : 45-51.
- McLaren R. D., Prosser C. G., Grieve R. C. et Borissenko M. (1994).** The use of caprylic acid for the extraction of the immunoglobulin fraction from egg yolk of chickens immunised with ovine alpha-lactalbumin. *Journal of Immunological Methods*. **177** : 175-184.
- Mintz K. P. et Fives-Taylor P. M. (1994).** Identification of an immunoglobulin Fc receptor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infection and Immunity*. **62** : 4500-4505.
- Mogollon J. D., Pijoan C., Murtaugh M. P., Cleary P. P. et Collins J. E. (1992).** Testing meningeal strains of *Streptococcus suis* to detect M protein genes. *Research in Veterinary Science*. **53** : 244-246.
- Moks T., Abrahmsen L., Nilsson B., Hellman U., Sjöquist J. et Uhlèn M. (1986).** Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains. *European Journal of Biochemistry*. **156** : 637-643.
- Myhre E. B. (1990).** Interaction of bacterial immunoglobulin receptors with sites in the Fab region. pp. 243-256. Dans Boyle M. D. P. (ed), Bacterial immunoglobulin-binding proteins, vol. 1. Academic Press, Inc., San Diego, Ca.

- Myhre E. B. et Erntell M. (1985).** A non-immune interaction between the light chain of human immunoglobulin and a surface component of a *Peptococcus magnus* strain. *Molecular Immunology*. **22** : 879-885.
- Myhre E. B. et Kronvall G. (1977).** Heterogeneity of nonimmune immunoglobulin Fc reactivity among gram-positive cocci: description of three major types of receptors for human immunoglobulin G. *Infection and Immunity*. **17** : 475-482.
- Myhre E. B. et Kronvall G. (1980).** Demonstration of a new type of immunoglobulin G receptor in *Streptococcus zooepidemicus* strains. *Infection and Immunity*. **27** : 808-816.
- Myhre E. B. et Kronvall G. (1981).** Immunoglobulin specifications of defined types of streptococcal Ig receptors. . Dans Holm S. E. et Christensen P. (ed), Basic concepts of streptococci and streptococcal diseases, vol. Reedbooks, Ltd., Chertsey, Surrey, U. K.
- Nakai S., Li-Chan E. et Lo K. V. (1994).** Separation of immunoglobulin from egg yolk. pp. 94-105. Dans Sim J. S. et Nakai S. (ed), Egg uses and processing technologies new developments, vol. CAB International, Oxon, U. K.
- Natvig J. B. et Kunkel H. G. (1979).** Human immunoglobulins: classes, subclasses, genetic variants, and idiotypes. *Advances in Immunology*. **16** : 1-59.
- Nielsen K., Stilwell K., Stemshorn B. et Duncan R. (1981).** Ethylenediaminetetraacetic acid (disodium salt)-labile bovine immunoglobulin M Fc binding to *Brucella abortus*: a cause of nonspecific agglutination. *Journal of Clinical Microbiology*. **14** : 32-38.
- Nilson B. H., Solomon A., Björck L. et Akerström B. (1992).** Protein L from *Peptostreptococcus magnus* binds to the kappa light chain variable domain. *Journal of Biological Chemistry*. **267** : 2234-2239.
- Ntakarutimana V., Demedts P., van Sande M. et Scharpe S. (1992).** A simple and economical strategy for downstream processing of specific antibodies to human transferrin from egg yolk. *Journal of Immunological Methods*. **153** : 133-140.
- Olsson A., Eliasson M., Guss B., Nilsson B., Hellman U., Lindberg M. et Uhlén M. (1987).** Structure and evolution of the repetitive gene encoding streptococcal protein G. *European Journal of Biochemistry*. **168** : 319-324.
- Onica D., Mihalcu F., Lenkei R., Gherman M. et Tudor M. (1977).** Autoantibodies detected in rabbits hyperimmunized with group A, C, and G streptococcal vaccines. *Infection and Immunity*. **18** : 624-628.

- Otake S., Nishihara Y., Makimura M., Hatta H., Kim M., Yamamoto T. et Hirasawa M. (1991).** Protection of rats against dental caries by passive immunization with hen-egg-yolk antibody (IgY). *Journal of Dental Research*. **70** : 162-166.
- Otani S., Karasawa Y. et Hosono A. (1989).** Production of antibody bovine α_{s1} -casein in the yolk of chicken eggs. *Agricultural and Biological Chemistry*. **53** : 1725.
- Parvari R., Avivi A., Lentner F., Ziv E., Tel-Or S., Burstein Y. et Schechter I. (1988).** Chicken immunoglobulin gamma-heavy chains: limited VH gene repertoire, combinatorial diversification by D gene segments and evolution of the heavy chain locus. *EMBO Journal*. **7** : 739-744.
- Patel A. H., Nowlan P., Weavers E. D. et Foster T. (1987).** Virulence of protein A-deficient and alpha-toxin-deficient mutants of *Staphylococcus aureus* isolated by allele replacement. *Infection and Immunity*. **55** : 3103-3110.
- Patella V., Casolaro V., Björck L. et Marone G. (1990).** Protein L. A bacterial Ig-binding protein that activates human basophils and mast cells. *Journal of Immunology*. **145** : 3054-3061.
- Patterson R., Youngner J. S., Weigle W. O. et Dixon F. J. (1962).** The metabolism of serum proteins in the hen and chick and secretion of serum proteins by the ovary of the hen. *Journal of General Physiology*. **45** : 501.
- Pepper D. S. (1994).** Some alternative coupling chemistries for affinity chromatography. *Molecular Biotechnology*. **2** : 157-178.
- Perch B., Pedersen K. B. et Henrichsen J. (1983).** Serology of capsulated streptococci pathogenic for pigs: six new serotypes of *Streptococcus suis*. *Journal of Clinical Microbiology*. **17** : 993-996.
- Pilz I., Schwarz E. et Palm W. (1977).** Small-angle X-ray studies of the human immunoglobulin molecule Kol. *European Journal of Biochemistry*. **75** : 195-199.
- Polson A. (1990).** Isolation of IgY from the yolks of eggs by a chloroform polyethylene glycol procedure. *Immunological Investigations*. **19** : 253-258.
- Polson A. (1993).** Chicken IgY-Fc antibody elicited in a rabbit as first coat on frosted glass beads in immunoassays. *Immunological Investigations*. **22** : 353-363.

- Polson A., Coetzer T., Kruger J., von Maltzahn E. et van der Merwe K. J. (1985).** Improvements in the isolation of IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens. *Immunological Investigations*. **14** : 323-327.
- Polson A., von Wechmar M. B. et Fazakerley G. (1980a).** Antibodies to proteins from yolk of immunized hens. *Immunological Communications*. **9** : 495-514.
- Polson A., von Wechmar M. B. et van Regenmortel M. H. V. (1980b).** Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunological Communications*. **9** : 475-493.
- Porath J., Carlsson J., Olsson I. et Belfrage G. (1975).** Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*. **258** : 598-599.
- Porter R. R. (1959).** The hydrolysis of rabbit d-globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochemistry Journal*. **73** : 119-126.
- Porter R. R. (1963).** Base structurale de l'antigénicité. pp. 21. Dans (ed), L'antigénicité, vol. Flammarion, Paris.
- Quessy S., Busque P., Higgins R., Jacques M. et Dubreuil J. D. (1997).** Description of an albumin binding activity for *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Microbiology Letters*. **147** : 245-250.
- Raeder R. et Boyle M. D. P. (1993).** Association of type II immunoglobulin G-binding protein expression and survival of group A streptococci in human blood. *Infection and Immunity*. **61** : 3696-3702.
- Raeder R., Faulmann E. L. et Boyle M. D. P. (1991a).** Evidence for functional heterogeneity in IgG Fc-binding proteins associated with group A streptococci. *The Journal of Immunology*. **146** : 1247-1253.
- Raeder R., Otten R. A. et Boyle M. D. P. (1991b).** Isolation and partial characterization of a type IV bacterial immunoglobulin binding protein. *Molecular Immunology*. **28** : 661-671.
- Raeder R., Otten R. A., Chamberlin L. et Boyle M. D. P. (1992).** Functional and serological analysis of type II immunoglobulin G-binding proteins expressed by pathogenic group A streptococci. *Journal of Clinical Microbiology*. **30** : 3074-3081.
- Reis K. J., Ayoub E. M. et Boyle M. D. P. (1983).** Detection of receptors for the Fc region of IgG on streptococci. *Journal of Immunological Methods*. **59** : 83-94.

- Reis K. J., Ayoub E. M. et Boyle M. D. P. (1984a).** Streptococcal Fc receptors. I. Isolation and partial characterization of the receptor from group C streptococcus. *Journal of Immunology*. **132** : 3091-3097.
- Reis K. J., Ayoub E. M. et Boyle M. D. P. (1984b).** Streptococcal Fc receptors. II. Comparison of the reactivity of a receptor from a group C streptococcus with staphylococcal protein A. *Journal of Immunology*. **132** : 3098-3102.
- Reis K. J. et Boyle M. D. P. (1990a).** Isolation and characterization of a type VI bacterial immunoglobulin-binding protein. pp. 165-173. Dans Boyle M. D. P. (ed), Bacterial immunoglobulin-binding proteins, vol. 1. Academic Press, Inc., San Diego, Ca.
- Reis K. J. et Boyle M. D. P. (1990b).** Type III Fc immunoglobulin-binding proteins from a group C streptococcus: isolation and characterization. pp. 101-111. Dans Boyle M. D. P. (ed), Bacterial immunoglobulin-binding proteins, vol. 1. Academic Press, Inc., San Diego, Ca.
- Reis K. J., Hansen H. F. et Björck L. (1986).** Extraction and characterization of IgG Fc receptors from group C and group G streptococci. *Molecular Immunology*. **23** : 425-431.
- Reis K. J., Salpeter J. et Boyle M. D. P. (1990).** Type IV bacterial immunoglobulin-binding proteins. pp. 149-154. Dans Boyle M. D. P. (ed), Bacterial immunoglobulin-binding proteins, vol. 1. Academic Press, Inc., San Diego, Ca.
- Reis K. J., Siden E. J. et Boyle M. D. P. (1988).** Selective colony blotting to expand bacterial surface receptors: applications to receptors for rat immunoglobulins. *Biotechniques*. **6** : 130-136.
- Rose K. J., Orlans E. et Buttress N. (1974).** Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. *European Journal of Immunology*. **4** : 521-523.
- Sada E., Katoh S., Sukai K., Tohma M. et Kondo A. (1986).** Adsorption equilibrium in immuno-affinity chromatography with polyclonal and monoclonal antibodies. *Biotechnology and Bioengineering*. **28** : 1497-1502.
- Salasia S. I. et Lammler C. (1996).** Binding properties of *Streptococcus suis* for immunoglobulin G and other plasma proteins. *Zentralblatt Fur Veterinarmedizin - Reihe B*. **43** : 497-503.

- Sandt C. H., Wang Y. D., Wilson R. A. et Hill C. W. (1997).** *Escherichia coli* strains with nonimmune immunoglobulin-binding activity. *Infection and Immunity*. **65** : 4572-4579.
- Sawa Y., Watanabe T. et Shibata K. (1992).** Immunoglobulin G Fc fragment-binding proteins in *Mycoplasma salivarium* cells. *Microbiology and Immunology*. **36** : 655-659.
- Schalèn C. et Christensen P. (1990).** Immunoglobulin G Fc receptors of group A streptococci. pp. 57-67. Dans Boyle M. D. P. (ed), Bacterial immunoglobulin-binding proteins, vol. 1. Academic Press, Inc., San Diego, Ca.
- Schroder A. K., Nardella F. A., Mannik M., Svensson M. L. et Christensen P. (1986).** Interaction between streptococcal IgG Fc receptors and human and rabbit IgG domains. *Immunology*. **57** : 305-309.
- Serhir B. (1995).** Étude des protéines de *Streptococcus suis* sérotype 2 possédant une affinité non-immune pour les immunoglobulines G. *Département de microbiologie et immunologie*. Montréal, Faculté de médecine, Université de Montréal, 131 pages.
- Serhir B., Dubreuil D., Higgins R. et Jacques M. (1995).** Purification and characterization of a 52-kilodalton immunoglobulin G-binding protein from *Streptococcus suis* capsular type 2. *Journal of Bacteriology*. **177** : 3830-3836.
- Serhir B., Higgins R., Foiry B. et Jacques M. (1993).** Detection of immunoglobulin-G-binding proteins in *Streptococcus suis*. *Journal of General Microbiology*. **139** : 2953-2958.
- Shimizu M., Fitzsimmons R. C. et Nakai S. (1988).** Anti-*Escherichia coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chicken as a potential food ingredient. *Journal of Food Science*. **53** : 1360.
- Shimizu M., Nagashima H., Sano K., Hashimoto K., Ozeki M., Tsuda K. et Hatta H. (1992).** Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. **56** : 270-274.
- Sihvonen L., Kurl D. N. et Henrichsen J. (1988).** *Streptococcus suis* isolated from pigs in Finland. *Acta Veterinaria Scandinavica*. **29** : 9-13.
- Silim A. et Rekik R. M. (1992).** Immunologie des oiseaux. pp. 87-96. Dans Brugère-Picoux J. et Silim A. (ed), Manuel de pathologie aviaire, vol. Chaire de pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour, Alfort, Fr.

- Sjöbring U. (1992).** Isolation and molecular characterization of a novel albumin-binding protein from group G streptococci. *Infection and Immunity*. **60** : 3601-3608.
- Sjödahl J. (1977).** Repetitive sequences in protein A from *Staphylococcus aureus*. arrangement of five regions within the protein, four being highly homologous and Fc-binding. *European Journal of Biochemistry*. **73** : 343-351.
- Sjöquist J., Meloun B. et Hjelm H. (1972).** Protein A isolated from *Staphylococcus aureus* after digestion with lysostaphin. *European Journal of Biochemistry*. **29** : 572-578.
- Smirnov O. Y., Denesyuk A. I., Zakharov M. V., Abramov V. M. et Zav'yalov V. P. (1993).** Protein V, a novel type-II IgG receptor from *Streptococcus* sp.: sequence, homologies and putative Fc-binding site. *Gene*. **120** : 27-32.
- Stadelman W. J. et Cotterill O. J. (1977).** Egg science and technology. pp. 65-91. Dans (ed), , vol. AVI Pub. Co., Westport, CT.
- Stanworth D. R., Burt D. S. et Hastings G. Z. (1986).** The use of synthetic peptides in the delineation of immunoglobulin antigenic epitopes and Fc effector functions. *Ciba Foundation Symposium*. **119** : 226-244.
- Steinberg S. V., Munro J. A., Fleming W. A., French V. I., Stark J. M. et White R. G. (1970).** The influence of adjuvants on the immunological response of the chicken. I. Effects on primary and secondary responses of various adjuvants in the primary stimulus. *Immunology*. **18** : 635-644.
- Stenberg L., P O. T. et Lindahl G. (1992).** Many group A streptococcal strains express two different immunoglobulin-binding proteins, encoded by closely linked genes: characterization of the proteins expressed by four strains of different M-type. *Molecular Microbiology*. **6** : 1185-1194.
- Stenberg L., PW O. T., Mestecky J. et Lindahl G. (1994).** Molecular characterization of protein Sir, a streptococcal cell surface protein that binds both immunoglobulin A and immunoglobulin G. *Journal of Biological Chemistry*. **269** : 13458-13464.
- Stewart D. J. (1993).** Evaluation of current methods for antibody immobilization in the preparation of immunoaffinity adsorbents. *Biotechnology of Blood Proteins*. **227** : 37-42.
- Sugita-Konishi Y., Shibata K., Yun S. S., Hara-Kudo Y., Yamaguchi K. et Kumagai S. (1996).** Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. **60** : 886-888.

- Svendsen Bollen L., Crowley A., Stodulski G. et Hau J. (1996).** Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG. A comparison of titre and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants. *Journal of Immunological Methods*. **191** : 113-120.
- Svendsen L., Crowley A., Ostergaard L. H., Stodulski G. et Hau J. (1995).** Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk. *Laboratory Animal Science*. **45** : 89-93.
- Tacket C. O., Losonksy G., Link H., Hoang Y., Guerry P., Hilpert H. et Levine M. M. (1988).** Protection by milk immunoglobulin concentrate against oral challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *New England Journal of Medicine*. **318** : 1240.
- Tedder T. F. (1990).** Immunoglobulin D-binding bacteria. pp. 235-242. Dans Boyle M. D. P. (ed), Bacterial immunoglobulin-binding proteins, vol. 1. Academic Press, Inc., San Diego, Ca.
- Torpier G., Capron A. et Ouaisi M. A. (1979).** Receptor for IgG(Fc) and human beta2-microglobulin on *Schistosoma mansoni schistosomula*. *Nature*. **278** : 447-449.
- Touil F., Higgins R. et Nadeau M. (1988).** Isolation of *Streptococcus suis* from diseased pigs in Canada. *Veterinary Microbiology*. **17** : 171-177.
- Ubrich N. et Rivat C. (1996).** Antibodies released from immuadsorbents: effect of support, activation and elution conditions. *Artificial Cells, Bloods Substitutes and Immobilization Biotechnology*. **24** : 65-75.
- Uhlén M., Guss B., Nilsson B., Gatanberck S., Philipson et Lindberg M. (1984).** Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. *Journal of Biological Chemistry*. **259** : 1695-1702.
- van Sommeren A. P. G., van den Bogaart H. W. M., Schielen W. J. G. et Gribnau T. C. J. (1996).** Purification of immunoglobulins from hens egg yolk by immunochromatography on immobilized hCG. *International Journal of Biochromatography*. **1** : 261-272.
- Vecht U., Arends J. P., van der Molen E. J. et van Leengoed L. A. (1989).** Differences in virulence between two strains of *Streptococcus suis* type II after experimentally induced infection of newborn germ-free pigs. *American Journal of Veterinary Research*. **50** : 1037-1043.

- Vecht U., Wisselink H. J., Jellema M. L. et Smith H. E. (1991).** Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. *Infection and Immunity*. **59** : 3156-3162.
- Vecht U., Wisselink H. J., van Dijk J. E. et Smith H. E. (1992).** Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in newborn germfree pigs depends on phenotype. *Infection and Immunity*. **60** : 550-556.
- Voss E. W. J. et Watt R. M. (1977).** Comparison of the microenvironment of chicken and rabbit antibody active sites. pp. 391-401. Dans Benedict A. A. (ed), *Avian immunology*, vol. Plenum Press, New York and London.
- Wallmann J., Staak C. et Luge E. (1990).** A simple method for the isolation of immunoglobulin (Y) from the eggs of immunized hens. *Zentralblatt Fuer Veterinaermedizin - Reihe B*. **37** : 317-320.
- Wang H., Lottenberg R. et Boyle M. D. P. (1995).** Analysis of the interaction of group A streptococci with fibrinogen, streptokinase and plasminogen. *Microbial Pathogenesis*. **18** : 153-166.
- Warr G. W., Magor K. E. et Higgins D. A. (1995).** IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunology Today*. **16** : 392-398.
- Watson D. L. (1992).** Biological half-life of ovine antibody in neonatal lambs and adult sheep following passive immunization. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **30** : 221-232.
- Widders P. R., Stokes C. R., Newby T. J. et Bourne F. J. (1985).** Nonimmune binding of equine immunoglobulin by the causative organism of contagious equine metritis, *Taylorella equigenitalis*. *Infection and Immunity*. **48** : 417-421.
- Williams J. (1962).** Serum proteins and the livetins of hen's-egg yolk. *Biochemistry Journal*. **83** : 346-355.
- Windsor R. S. et Elliott S. D. (1975).** Streptococcal infection in young pigs. IV. An outbreak of streptococcal meningitis in weaned pigs. *Journal of Hygiene*. **75** : 69-78.
- Woof J. M. et Burton D. R. (1990).** The nature of the interaction of bacterial Fc receptors and IgG. pp. 305-315. Dans Boyle M. D. P. (ed), *Bacterial immunoglobulin-binding proteins*, vol. 1. Academic Press, Inc., San Diego, Ca.

- Woolley J. A. et Landon J. (1995).** Comparison of antibody production to human interleukin-6 (IL-6) by sheep and chickens. *Journal of Immunological Methods*. **178** : 253-265.
- Yarnall M. et Boyle M. D. P. (1986).** Isolation and partial characterization of a type II Fc receptor from a group A streptococcus. *Molecular and Cellular Biochemistry*. **70** : 57-66.
- Yarnall M. et Widders P. R. (1990).** Type V Fc receptors from *Streptococcus zooepidemicus*. pp. 155-173. Dans Boyle M. D. P. (ed), Bacterial immunoglobulin-binding proteins, vol. 1. Academic Press, Inc., San Diego, Ca.
- Yarnall M., Widders P. R. et Corbeil L. B. (1988).** Isolation and characterization of Fc receptors from *Haemophilus somnus*. *Scandinavian Journal of Immunology*. **28** : 129-137.
- Yee C., Costa J., Hamilton V., Klein G. et Rabson A. S. (1982).** Changes in the expression of Fc receptor produced by induction of Epstein-Barr virus in lymphoma cell lines. *Virology*. **120** : 376-382.
- Yokohama H., Peralta R. C., Diaz R., Sendo S., Ikemori Y. et Kodama Y. (1992).** Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Infection and Immunity*. **60** : 998-1007.
- Yolken R. H., Leister F., Wee S. B., Miskuff R. et Vonderfecht S. (1988).** Antibodies to rotaviruses in chickens' eggs: a potential source of antiviral immunoglobulins suitable for human consumption. *Pediatrics*. **81** : 291-295.
- Zav'yalov V. P., Abramov V. M., Cherepanov P. G., Spirina G. V., Chernovskaya T. V., Vasiliev A. M. et Zav'yalova G. A. (1996).** pH6 antigen (PsaA protein) of *Yersinia pestis*, a novel bacterial Fc-receptor. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. **14** : 53-57.
- Zimmerman B., Shalatin N. et Grey H. M. (1971).** Structural studies on the duck 5.7S and 7.8S immunoglobulins. *Biochemistry*. **10** : 482-488.
- Zrein M., Obert G. et van Regenmortel M. H. (1986).** Use of egg-yolk antibody for detection of respiratory syncytial virus in nasal secretions by ELISA. *Archives of Virology*. **90** : 197-206.

VI- ANNEXES

ANNEXE 1

Détermination par électrophorèse de la masse moléculaire de la protéine de *Streptococcus suis* sérotype 2 liant les IgY.

Introduction

Serhir *et al.* (1995) ont évalué la masse moléculaire (M_r) approximative des PLIg de *S. suis* sérotype 2 comme étant 52 et 56 kDa. Benkirane *et al.* (1998) démontrent que la PLIg de 52 kDa fait partie de la famille des Hsp de 60 kDa.

Ce travail a été entrepris afin de déterminer de manière plus précise la masse moléculaire de ces 2 PLIg.

Matériel et méthodes

Le principe de la méthode utilisée consiste à comparer la mobilité électrophorétique d'une protéine de masse moléculaire inconnue avec celle de standard protéiques de masse connues afin d'en déterminer la masse.

SDS-PAGE: L'électrophorèse est effectuée selon le tampon discontinu de Laemmli (1970), avec un gel de polyacrylamide de 5 % pour la zone de concentration et de 10 % pour la zone de séparation. Les gels sont coulés dans le système d'électrophorèse vertical Mini-Protean II (Bio-Rad, Richmond, Ca). Les échantillons de protéines sont dénaturés par ébullition pendant 10 min dans un tampon 62,5 mM Tris-HCl (pH 6.8) contenant 2 % (wt/vol) SDS, 10 % (vol/vol) de glycérol, 5 % (vol/vol) de β -mercapéthanol et 0,025 % (wt/vol) de bleu de bromophénol. La trousse de calibration de faible masse moléculaire provenant de la compagnie Pharmacia (Baie d'Urfé, Québec, Canada) contenant des protéines de M_r : 94, 67, 43, 30, 20,1 et 14,4 kDa, a été repris selon les directives de la compagnie. Cinq μ l de standard moléculaire ont été déposés et 3 μ g de protéine pour chaque inconnu. Un voltage de 100 a été appliqué jusqu'à ce que le front de migration atteigne le gel de séparation, puis 200 V jusqu'à ce que ce dernier arrive à un centimètre du bord du bas du gel. La masse moléculaire des inconnus a été calculée selon les instructions du manufacturier en traçant une courbe de calibration à l'aide des standards. L'expérience a été effectuée six fois, et a permis de calculer la moyenne et l'écart type pour chaque masse moléculaire des inconnus.

Résultats:

D'après la courbe de calibration (Figure 1.), les résultats obtenus sont les suivants:

“ Protéine de 52 kDa ”: 59117 ± 714 Da

“ Protéine de 56 kDa ”: 65973 ± 361 Da

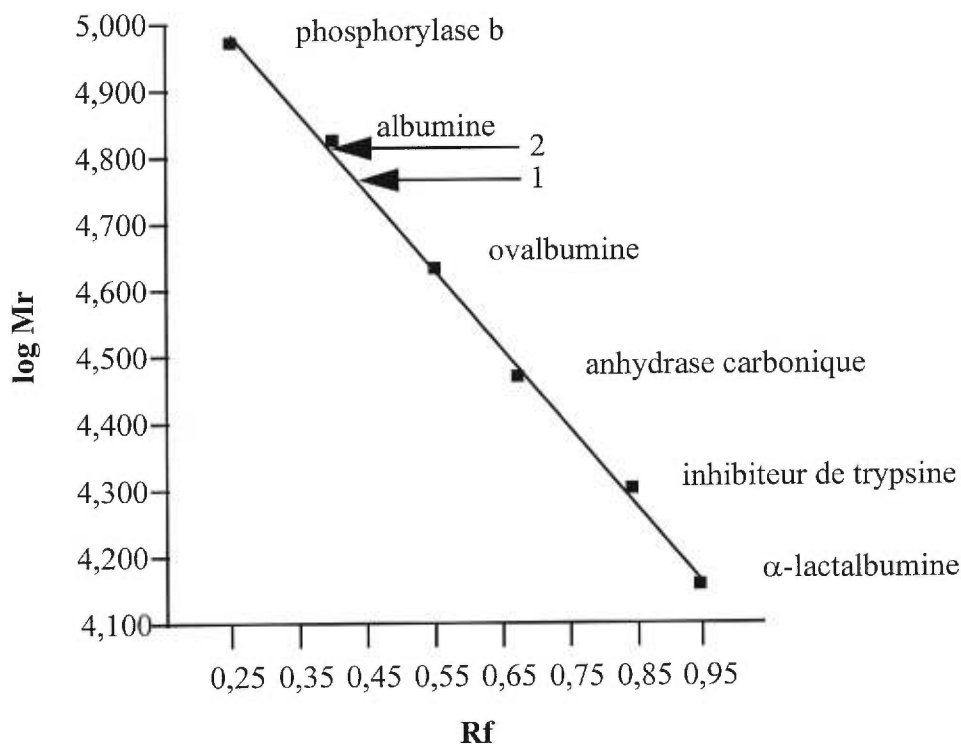


Figure 1. Courbe de calibration établie en utilisant des standards de faible masse moléculaire. Rf représente la mobilité relative. L'équation de la droite est $y = 5,28080 - 1,18501x$. 1 représente la PLIg de 59 kDa; 2 celle de 66 kDa.

Nos résultats démontrent que la protéine initialement reconnue comme étant de 52 kDa a une masse d'environ 59 kDa, ce qui confirme les travaux de Benkirane *et al.* (1998) et que celle présumée 56 kDa a une masse d'environ 66 kDa. La différence obtenue entre nos résultats et ceux de Serhir *et al.* (1995) peut s'expliquer par le fait que Serhir *et al.* (1995) ont utilisé des standards précolorés pour évaluer la masse moléculaire des protéines. Ces derniers ne sont pas recommandés pour une telle détermination. Nous avons utilisé des standards non colorés comme recommandé par la compagnie.

ANNEXE 2

Tableau et figure complémentaires

Tableau 1. Couplage de la PLIg de *S. suis* sérotype 2 à différents gels. Le couplage pour les gels ECH-Sepharose 4B et CNBr-activated Sepharose 4B, s'est fait selon les recommandations de la compagnie (Pharmacia, Baie d'Urfé, Québec, Canada), tandis que pour le gel TAA cf Section Matériel, Méthodes et Résultats.

	ECH-Sepharose 4B (2 ml)	ECH-Sepharose 4B + 3 M Gnd-HCl (2,5 ml)	CNBr-activated Sepharose 4B (0,5 g)	Triazine activated agarose + 3 M Gnd-HCl (1 ml)
Quantité de PLIg mélangée	2,9 mg	0,863 mg	1 mg	2,55 mg
Quantité de PLIg couplée	0 mg	0 mg	0 mg	1 mg

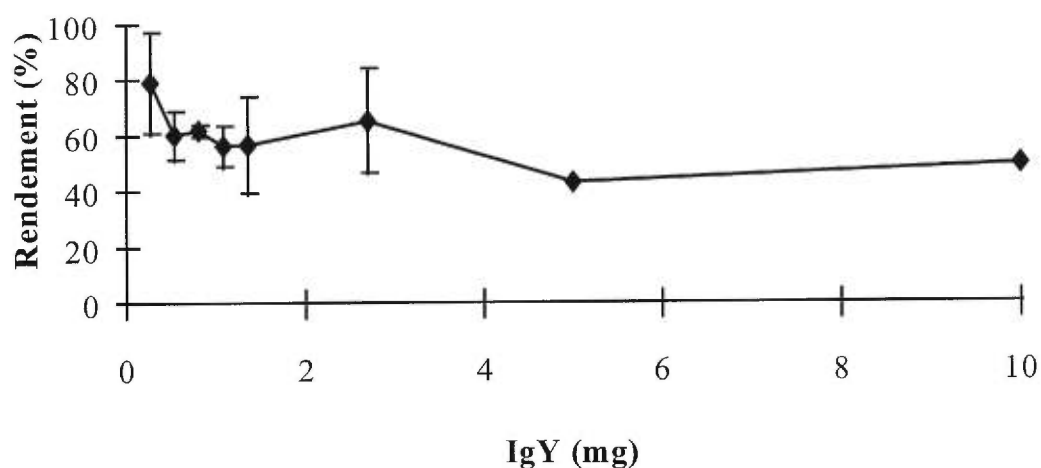


Figure 1. Rendement d'IgY de poule (%) en utilisant la colonne PLIg couplée au gel "Triazine activated agarose", en fonction de la quantité d'IgY commerciale déposée.

ANNEXE 3

Acte de colloque (Proceeding) au 15^{ème} Congrès de l' "International Pig Veterinary Society " (IPVS), Birmingham, Grande-Bretagne, 5-9
Juillet 1998

A Streptococcus suis SEROTYPE 2 IMMUNOGLOBULIN-BINDING PROTEIN: OVERALL CHARACTERISTICS AND USES AS A TOOL FOR THE PURIFICATION OF CHICKEN IgY BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY

K. Boudjeroua, R. Benkirane, S-É. Paradis, M. G. Gottschalk, M. Jacques, J. Harel, **J. D. Dubreuil**

GREMIP, Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada

Introduction

Numerous immunoglobulin-binding proteins (IBP) with affinity for the constant region (Fc) of immunoglobulin (Ig) are expressed by certain bacterial pathogens. *Streptococcus suis* serotype 2, an important swine pathogen, produces an IBP which possesses the property of reacting, in a non-immune manner, with many mammalian IgG including, pig, human, bovine, equine and in addition reacts with chicken IgG also known as IgY (Y for yolk). To our knowledge, this characteristic is unique for the already described IBP. Furthermore, as it also represents a common antigen of various *S. suis* serotypes, we have attempted to learn more about the characteristics of this IBP. Finally, as the property of binding chicken IgY could represent a new way to purify IgY from egg yolk which contains a concentration 10 fold greater than rabbit serum, coupling of the IBP to chromatographic gels was performed. This study was done to determine the characteristics of the described *S. suis* IBP and evaluate its potential uses for IgY purification.

Materials and Methods

***S. suis* IBP immunological reactivity:** *S. suis* serotype 2 (S735) was cultivated overnight at 37°C and a heat stress was performed by shifting the temperature to 42°C for 2 h. Whole cells were solubilized, subjected to SDS-PAGE using a 10 % gel and electroblotted onto a nitrocellulose membrane. Western blot analysis was done as described (1).

Immobilization of IBP. The production and purification of the IBP were carried out as described by Serhir *et al.* (2). Then, IBP was coupled to triazine activated agarose 4 XL gel (Affinity chromatography Ltd, Cambridge, UK). Briefly, the gel was washed with 20 vol of distilled water, followed by 5 vol of 50 mM sodium acetate (pH 5.0) containing 0,5 M NaCl. The gel and the protein dissolved in 50 mM sodium acetate, 3 M guanidine hydrochloride (pH 5.0), were mixed and rotated end-over-end for 2 h at room temperature. The gel was washed with 10 vol of 50 mM sodium acetate (pH 5.0) containing 0,5 M NaCl. The unreacted sites were blocked for 2 h at room temperature by addition of 2 M ethanolamine. The gel was finally washed with 5 vol of distilled water followed by 5 vol of 20 mM phosphate buffer (pH 8.0) containing 0,2 % NaN₃ and stored at 4°C.

Affinity chromatography: Chromatography was performed at 4°C using the following procedure. The gel with immobilized IBP was washed with 20 mM phosphate buffer (pH 8.0) and egg yolk extracts (3) were applied at a flow rate of 0,27 ml/min. The bound antibody fraction was desorbed at a flow rate of 0,4 ml/min with 0,5 M acetate buffer (pH 3.0) and the peak was monitored at 280 nm. The pH of the eluted antibody fraction was neutralized with 1 M Tris, lyophilized and stored at -20°C.

IBP digestion: The IBP of *S. suis* (S735) was excised from a preparative 10 % SDS-PAGE and digested with protease V8 as described by Cleveland *et al.* (4).

Results and Discussion

Previous studies showed, using Western blot, that the IBP had an apparent molecular mass of 52 kDa. Using a calibration kit (Pharmacia Biotech), we more precisely

evaluated its molecular mass to 60 kDa (data not shown). As shown in Table 1, a polyclonal anti-Hsp 65 of *Pseudomonas aeruginosa* (5343, N. Hoiby, Statens Seruminstitut, Copenhagen, Denmark) and the monoclonal ML-30 raised against the 65 kDa of *Mycobacterium leprae* (J. Ivaniyi, Hammersmith Hospital, London, UK) reacted with the 60 kDa IBP protein. A rabbit antiserum raised against this 60 kDa IBP protein was produced. This antiserum reacted with the Hsp from all the Gram-positive and Gram-negative bacteria tested, demonstrating that this IBP is a Hsp protein (1). Amini *et al.* (5) also described an immunoglobulin-binding activity for the 60 kDa Hsp of *Helicobacter pylori*.

Table 1. Immunological reactivity of *S. suis* IBP

Bacterial species	Molecular mass	Reaction with antibodies		
		ML-30	5343	anti-60 kDa
<i>S. suis</i> S735	60 kDa	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	65 kDa	NT	NT	+

The binding activity of the *S. suis* IBP was not altered by treatments such as acidic pH (pH 3.0), basic pH (pH 12.0), 5 M urea or 3 M guanidine hydrochloride (data not shown). As shown in Figure 1A using the affinity column we set up with IBP as the ligand, we purify 222 µg of IgY (peak II) when 1 mg of egg yolk was loaded.

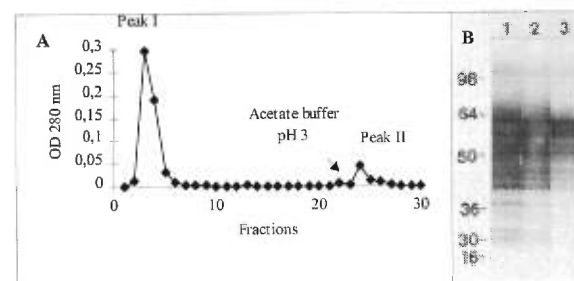


Figure 1. **A)** Affinity chromatography of IgY using a triazine activated agarose coupled with IBP. The IgY were recovered in peak II. **B)** Denatured IBP was digested using protease V8. Digestion fragments were electrophoresed, transferred to nitrocellulose membrane, and probed with IgG from pig (lane 1), bovine (lane 2), and chicken (lane 3). Prestained low molecular mass markers are indicated on the left.

Thus the IBP-triazine activated agarose gel can be used to purify IgY from egg yolk extract unlike protein A and G, two well known IBP which do not bind IgY. Using this IBP-triazine activated agarose gel, it is possible to purify IgY from egg yolk in a 2 steps procedure. This is an advantage compared to standard techniques which are more tedious (6). To study the domains of the 60 kDa protein involved in immunoglobulin-binding, peptide

mapping experiments were carried out. Digestions with protease V8, were done in order to generate the smallest active fragments of the IBP. Chicken IgY did not react with proteolytic fragments smaller than 36 kDa whereas many fragments with Mr <40 kDa still possess binding activity for pig and bovine IgG (Fig. 1B), suggesting that the smallest domain recognizing the chicken IgY is different from the ones recognizing other IgG (7).

Work is now in progress to purify chicken IgY from immunized hens eggs using the affinity column described above. Once the IgY binding site of the IBP will be well characterized, it might represent a more specific and efficient ligand to use for the purification of chicken IgY.

References

- (1) Benkirane R., Gottschalk M. G. and Dubreuil J. D. (1997). Identification of a *Streptococcus suis* 60-kDa heat-shock protein using Western blotting. *FEMS Microbiology Letters* **153**, 379-385.
- (2) Serhir B., Dubreuil D., Higgins R. and Jacques M. (1995). Purification and characterization of a 52-kilodalton immunoglobulin G-binding protein from *Streptococcus suis* capsular type 2. *Journal of Bacteriology* **177**, 3830-3836.
- (3) Reis K. J. and Boyle M. D. P. (1990). Production of polyclonal antibodies to immunoglobulin-binding proteins. In *Bacterial immunoglobulin-binding proteins*, pp. 105-124. Edited by Boyle M. D. P. Academic Press, Inc., San Diego, Ca.
- (4) Cleveland D. W., Fisher S. G., Kirschner M. W. and Laemmli U. K. (1977). Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry* **252**, 1102-1106.
- (5) Amini H. R., Ascencio F., Cruz-Villacorta A., Ruiz-Bustos E. and Wadström T. (1996). Immunochemical properties of a 60 kDa cell surface-associated heat shock protein (Hsp60) from *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **16**, 163-172.
- (6) Akita E. M. and Nakai S. (1993). Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *Escherichia coli* strain. *Journal of Immunological Methods* **160**, 207-214.
- (7) Benkirane R., Gottschalk M. G., Jacques M. and Dubreuil J. D. (1998). Immunochemical characterization of an IgG-binding protein of *Streptococcus suis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **20**, 121-127.

ANNEXE 4

Communication orale aux Journées de recherche en productions animales, Conseil des Productions Animales du Québec (CPAQ), Québec, Canada, 21-22 Mai 1998

Purification d'immunoglobuline Y contenue dans le jaune d'œuf de poule par chromatographie d'affinité

Boudjeroua K., M. Jacques et J. D. Dubreuil

GREMIP, Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6

L'intérêt en immunodiagnostic et immunothérapie pour l'utilisation des immunoglobulines Y (IgY) contenues dans le jaune d'œuf de poule a augmenté de façon très marquée ces quinze dernières années. Le jaune d'œuf a été reconnu comme une source quotidienne d'anticorps peu coûteuse. La concentration d'Ig dans le jaune d'œuf de poule est en effet 10 fois supérieure à celle retrouvée dans le sérum de lapin (1-2 mg/ml), utilisé en routine pour l'obtention d'IgG polyclonaux. Dûe à sa différence structurale avec les IgG de mammifères, l'utilisation des IgY de poule dans des tests immunoenzymatiques prévient les réactions croisées souvent retrouvées lors de l'utilisation des IgG de mammifères. Malgré ces avantages, les IgY de poule ne sont pas encore largement utilisées comme source alternative aux IgG de mammifères. Une raison majeure est la difficulté à purifier les IgY contenues dans le jaune d'œuf. Plusieurs protéines liant les immunoglobulines (PLIg) de façon non-immune sont synthétisées par différentes bactéries. *Streptococcus suis* sérotype 2, une bactérie pathogène du porc, produit une PLIg qui possède la propriété unique de réagir de manière non-immune avec les IgY de poule. L'objectif de notre recherche était donc d'utiliser cette propriété de la PLIg de *S.suis* afin de purifier, de façon simple et avec un rendement élevé des IgY issus d'œufs de poule. Pour cela, la technique de purification par chromatographie d'affinité que nous avons mise au point était la méthode de choix. Des travaux antérieurs ont montré que la PLIg de *S.suis* forme de longs filaments à partir de monomères. La sélection du gel de chromatographie était basée sur sa capacité à résister aux conditions draconiennes nécessaires pour la dépolymérisation des filaments. Un gel "Triazine Activated Agarose" nous a permis de coupler efficacement la PLIg de *S. suis* en présence de 3 M d'hydrochlorure de guanidine à température ambiante, en utilisant une concentration de ligand de 1 mg/ml de gel. La chromatographie d'affinité a été réalisée à 4°C. Du jaune d'œuf délipidé en une seule étape, dilué dans du tampon phosphate (20 mM, pH 8.0) a été appliqué à la colonne. L'élution a été effectuée avec un tampon acétate (0,5 M, pH 3.0) et l'échantillon a été analysé par SDS-PAGE. La colonne de chromatographie d'affinité permet de purifier approximativement 44 mg d'IgY à partir de 200 mg de protéines du jaune d'œuf. La pureté obtenue est d'environ 97 %. La méthode que nous avons développée pour purifier les IgY de poule est rapide, contrairement à d'autres techniques mise au point, et non coûteuse car la colonne d'affinité peut être régénérée plusieurs fois sans perdre son activité liante spécifique aux IgY de poule.

ANNEXE 5

Affiche à la 78^{ème} “ Conference of Research Workers in Animal Diseases ” (CRWAD), Chicago, USA, 10-11 Novembre 1997

Purification of chicken IgY by affinity chromatography using an immobilized *Streptococcus suis* serotype 2 immunoglobulin-binding protein

Boudjeroua K., M. Jacques, J. D. Dubreuil.

GREMIP, Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6

Many immunoglobulin-binding proteins (IBP) expressed by bacteria have been described, including the protein A from *Staphylococcus aureus*. *Streptococcus suis* serotype 2 produces an IBP which possesses the unique property of reacting with chicken IgY in a non immune manner. The eggs from immunized chickens are a daily source of polyclonal antibody with a concentration 10 fold greater than the rabbit serum IgG which is within the range of 1-2 mg/ml. Thus, we have attempted to use the special binding property of *S.suis* IBP to purify IgY by affinity chromatography. As *S.suis* IBP was previously shown to form long filaments from polymerized units, selection of the gel was based on the capacity of the matrix to resist drastics conditions necessary for protein depolymerization. Coupling was successful with Triazine Activated Agarose, in presence of 3 M of guanidine hydrochloride at ambient temperature, using a ligand concentration of 1 mg/ml of gel. The binding capacity evaluation of the column for pure chicken IgY was done at 4⁰C. IgY (200 µg) in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 8) were applied to the column. The elution was carried out with 0,5 M acetate buffer (pH 3) and the sample was analyzed using SDS-PAGE and Western blot. Preliminary results indicate that 70 % of the IgY loaded were bound and eluted. The method we have developped to purify chicken IgY is rapid and cheap since our affinity column can be regenerated and use repeatedly.

ANNEXE 6

Affiche au Congrès de l'Association des Microbiologistes du Québec
(AMQ), Montréal, Canada, 31 Octobre-1^{er} Novembre 1997

Purification d'immunoglobuline Y de poule par chromatographie d'affinité à l'aide d'une protéine de *Streptococcus suis* sérotype 2 liant les immunoglobulines.

Boudjeroua K., M. Jacques, J. D. Dubreuil

GREMIP, Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6

Plusieurs protéines liant les immunoglobulines (PLIg) exprimées par différentes bactéries ont été décrites, incluant la protéine A de *Staphylococcus aureus*. *Streptococcus suis* sérotype 2 produit une PLIg possédant la propriété unique de réagir de manière non-immune avec les IgY de poule. Les oeufs de poule immunisée sont une source journalière d'anticorps polyclonaux en concentration 10 fois supérieure aux 1 à 2 mg/ml contenus dans le sérum de lapin. L'objectif de notre recherche était d'utiliser la propriété liante de la PLIg de *S.suis* afin de purifier par chromatographie d'affinité des IgY issus d'oeufs de poule. Des travaux antérieurs ont montré que la PLIg de *S.suis* forme de longs filaments à partir d'unités polymérisées. La sélection du gel était basée sur sa capacité à résister aux conditions draconiennes nécessaires pour la dépolymérisation des filaments. Un gel "Triazine Activated Agarose" nous a permis de coupler efficacement la protéine en présence de 3 M d'hydrochlorure de guanidine à température ambiante, en utilisant une concentration de ligand de 1 mg/ml de gel. L'évaluation de la capacité de liaison de la colonne pour les IgY a été réalisée à 4°C. Des IgY (200 µg) diluées dans du tampon phosphate (20 mM, pH 8) ont été appliquées à la colonne. L'élution a été effectuée avec un tampon acétate (0,5 M, pH 3) et l'échantillon a été analysé par SDS-PAGE. Les résultats préliminaires indiquent que 70 % des IgY chargées ont été liées et éluées. La méthode que nous avons développée pour purifier les IgY de poule est rapide et non coûteuse car la colonne d'affinité peut être régénérée plusieurs fois.