

RÉSUMÉ

IMMUNOGLOBULINE Y – VALENCES BIOLOGIQUES ET UTILISATIONS THÉRAPEUTIQUES

Doctorant: CHIURCIU Constantin

Coordinateur scientifique: Prof. univ. dr. DANEȘ Doina

MOTS CLES: antigènes, immunoglobuline Y, IMUNOINSTANT, traitement personnalisé, psoriasis, parodontite, infections à SARM, mastite subclinique.

Le jaune d'œuf est considéré comme une source idéale d'immunoglobulines et, parmi celles-ci, l'IgY est l'anticorps prédominant. La littérature fournit de nombreuses informations sur les avantages de l'utilisation des immunoglobulines Y par rapport aux IgG de mammifères.

Tout d'abord, l'IgY est obtenue par des méthodes non invasives, ce qui la rend appropriée pour une fabrication à grande échelle. Ainsi, les anticorps IgY peuvent être facilement obtenus par la simple action de la collecte des œufs, de la séparation des jaunes, de l'isolement et de la purification, au lieu de la méthode stressante de saignement animal afin d'obtenir le sérum. La quantité disponible d'un anticorps particulier est considérablement augmentée en obtenant à plusieurs reprises des œufs de la même poule. La production d'anticorps d'œufs de poule est supérieure à celle d'un mammifère de taille similaire. En une année, une grande quantité d'anticorps peut être obtenue à partir d'une seule poule, environ 40 g, dont 1 à 10% peuvent être des anticorps spécifiques. IgY offre également des avantages économiques remarquables, car le coût d'élevage des poules est inférieur à celui des lapins.

Deuxièmement, en raison de la distance phylogénétique entre les poules et les mammifères, l'IgY n'interagit pas avec les facteurs rhumatoïdes, avec les récepteurs du fragment cristallisable (Fc) et n'active pas le système du complément mammalien.

De plus, les anticorps IgY peuvent reconnaître davantage d'épitopes de protéines de mammifère hautement conservés que l'IgG de mammifère, et donc induire une réponse immunitaire plus efficace. Si les poulets et les lapins sont immunisés avec le même antigène, les oiseaux répondent avec des anticorps spécifiques, ce qui peut rarement être obtenu chez les lapins. L'immunisation des poules nécessite de petites quantités d'antigène pour obtenir un titre élevé et prolongé d'IgY dans l'œuf. Les anticorps IgY sont stables dans le temps: lorsqu'ils ont été

conservés pendant 10 ans à 4 °C, aucune perte significative d'activité n'a été enregistrée; ils ont maintenu leur activité après 6 mois à la température ambiante ou un mois à 37°C. Les anticorps IgY jouent un rôle croissant dans la recherche, le diagnostic et la thérapie. En raison des grandes quantités d'IgY pouvant être obtenues, elles sont adaptées à une utilisation en immunothérapie et/ou en immunoprophylaxie de nombreuses infections virales et bactériennes, en médecine humaine et vétérinaire, et en tant qu'alternative à l'antibiothérapie classique. En outre, les immunoglobulines Y peuvent être utilisées comme complément immunitaire naturel dans les préparations pour nourrissons ou d'autres aliments nouveaux.

Sur la base des avantages de la technologie IgY et de ses applications dans différents domaines, notre programme de recherche de ROMVAC Company s'était axé sur la production des immunoglobulines Y, en phase de laboratoire et industrielle, leur purification et caractérisation immunochimique et la démonstration de leur spécificité contre des antigènes utilisés pour immuniser les poules. Les immunoglobulines Y obtenues se sont révélées spécifiques contre des souches bactériennes, la plupart résistantes aux antibiotiques, isolées des patients atteints d'infections aiguës et chroniques dans des hôpitaux roumains, ainsi que des vaches atteintes de mastites subcliniques. Ces immunoglobulines Y ont été formulées sous différentes formes posologiques de la marque IMUNOINSTANT: solution, gel, poudre, spray.

Reposant sur les résultats des expériences *in vitro* - qui ont montré que les immunoglobulines Y spécifiques inhibent la multiplication des bactéries résistantes aux antibiotiques - l'objectif général de la présente thèse était d'évaluer le spectre thérapeutique et l'efficacité de l'immunoglobuline Y. Ainsi, les produits IMUNOINSTANT, contenant des IgY monovalentes/bivalentes/polyvalentes, ont été administrés pour traiter des maladies telles que la mammites subclinique, le psoriasis, la parodontite, les infections à *Staphylococcus aureus* résistantes à la pénicilline.

LA PREMIÈRE PARTIE de la thèse "*Étude bibliographique*", composée d'une cinquantaine de pages, décrit l'état des connaissances en ce qui concerne: le système immunitaire aviaire (**Chapitre I**); les immunoglobulines: structure, fonctions; les immunoglobulines de poulet (**Chapitre II**); et l'action spécifique des immunoglobulines de volaille (**Chapitre III**).

Les organes lymphoïdes primaires du système immunitaire chez les oiseaux sont le thymus (jouant un rôle dans la production et la maturation des lymphocytes T) et la bourse de Fabricius (jouant un rôle important dans la maturation des lymphocytes B). Les organes lymphoïdes secondaires du système immunitaire chez les oiseaux sont la rate, les ganglions lymphatiques et le tissu lymphoïde non capsulé, situés au niveau de l'épithélium digestif, respiratoire, urogénital et cutané.

Les lymphocytes B, qui assurent l'immunité humorale, quittent la bourse par les vaisseaux sanguins alimentant les follicules de la bourse, atteignant les tissus lymphoïdes, avec un rôle important dans la production d'anticorps (immunoglobulines). Chez les oiseaux, les immunoglobulines G et M ont été identifiées

dans le sang comme étant les principaux anticorps sériques, alors que les IgA ont été identifiés dans les sécrétions (bile). Les données de la littérature suggèrent une analogie entre le transfert passif d'immunoglobulines chez les oiseaux et les mammifères.

En 1962, J. Williams a identifié l'immunoglobuline Y en tant que gamma globuline dans la fraction γ - livétine du jaune d'œuf et, en 1969, en raison des différences majeures entre les IgGs d'oiseaux et de mammifères, Leslie GA et Clem LW ont proposé le terme IgY pour la IgG dans le jaune d'œuf. Malgré l'homologie fonctionnelle entre l'IgY aviaire et l'IgG de mammifère, il existe des différences de poids moléculaire, de structure et de fonctions biochimiques. La véritable immunoglobuline de jaune d'œuf, IgY (γ - livétine), a fait l'objet de nombreuses recherches pour évaluer son potentiel en tant qu'agent prophylactique et thérapeutique dans les pathologies infectieuses, en particulier pour le traitement des agents pathogènes résistants aux antibiotiques. Elle peut être utilisée comme alternative à l'antibiothérapie classique, tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire. Dans le domaine vétérinaire, l'administration d'immunoglobuline Y s'est révélée efficace dans le traitement de diverses infections gastro-intestinales à rotavirus bovin, coronavirus bovin, *Yersinia ruckeri*, *Escherichia coli* entérotoxigène, *Salmonella* spp., *Edwardsiella tarda*, *Staphylococcus* et *Pseudomonas*. En termes d'utilisation prophylactique d'IgY, il s'agit d'une alternative aux anticorps de mammifère pour l'immunisation passive par voie orale contre divers agents pathogènes entériques. En médecine humaine, l'administration d'IgY à des fins thérapeutiques peut réduire l'utilisation clinique d'antibiotiques et minimiser le risque que les bactéries développent une résistance aux antibiotiques. L'immunothérapie peut être utilisée contre les agents pathogènes difficiles à traiter avec les antibiotiques traditionnels. IgY a été utilisé dans le traitement d'infections intestinales chez les enfants, de la colite et de la maladie cœliaque, de la fibrose kystique, de l'ulcère gastrique et de la carie dentaire. Il a également été utilisé pour prévenir la pandémie d'influenza aviaire/porcine, l'obésité, pour contrôler l'entérotoxine B staphylococcique - une arme biologique potentielle - et en protéomique. Les anticorps IgY sont également utilisés dans d'autres applications, notamment: diagnostic du cancer gastrique, détection des marqueurs du cancer de l'ovaire et du sein, détection du virus de la peste équine, détermination du facteur de croissance des hépatocytes (HGF) dans le sérum et l'urine, diagnostic des infections à *Campylobacter fetus* et *Bordetella bronchiseptica*, détection du facteur de croissance tumorale (TGF) dans les liquides biologiques, détermination des réactifs de l'inflammation et détection des antigènes du sérum humain par résonance de plasmons de surface (SPR). Des anticorps IgY anti-E7 HPV16 ont également été obtenus, ce qui permet de les utiliser pour le criblage d'échantillons cliniques, ainsi que des anticorps IgY anti-venin.

DEUXIÈME PARTIE "*Propre recherche*", commence par l'objet général et les objectifs de la recherche, se poursuit par la présentation des procès pour obtenir et

pour formulation galénique de l'immunoglobuline Y à partir d'œufs hyperimmuns, puis par la présentation de plusieurs études de cas décrivant les applications thérapeutiques de ces produits chez l'homme et animaux et se termine par des conclusions générales et des recommandations, ainsi que par une sélection bibliographique. Cette partie de la thèse, représentant environ 67 % du volume total, contient 32 des tableaux et 79 des figures.

Chapitre IV décrit la *production, le contrôle et la formulation* des immunoglobulines Y d'œuf réalisées dans le laboratoire de recherche et de fabrication IMUNOINSTANT, appartenant à ROMVAC Company.

La procédure pour obtenir des immunoglobulines Y spécifiques comprend: 1) les méthodes d'isolement et d'identification des souches bactériennes et / ou fongiques recueillies des patients traités avec des antibiotiques mais sans succès; 2) traitement de l'antigène pour inoculation des poules (monovalent et polyvalent); et 3) le schéma d'immunisation des poules conventionnelles ou SPF à partir desquelles les œufs hyperimmunisés ont été recueillis. Dans le sous-chapitre sur le contrôle des immunoglobulines Y spécifiques, sont présentes les tests utilisés pour évaluer leur activité/spécificité : 1) test immuno enzymatique ELISA indirect, 2) ELISA direct, 3) test d'immunodiffusion sur gel d'agar (IDGA), 4) test d'immunodiffusion radiale (IDR), et 5) Test d'agglutination rapide sur lame (RSAT).

Le sous-chapitre suivant décrit les étapes de fabrication et la technologie permettant d'obtenir les formes posologiques d'immunoglobuline Y (solution, poudre, spray, suspension, pommade et gel), ainsi qu'une brève présentation de la composition et de l'utilisation prévue de plusieurs produits finis contenant de l'IgY. Le dernier sous-chapitre présente l'utilisation d'IgY obtenues à partir d'œufs hyperimmuns pour la production de réactifs à base d'IgY conçus pour des tests in vitro tels qu'ELISA ou immunofluorescence.

Chapitre V, "*L'utilisation d'immunoglobulines spécifiques d'œufs dans le traitement des entités morbides humaines bénéficiant d'un traitement palliatif exclusif*" comprend deux sous-chapitres (5.1. Psoriasis et 5.2. Parodontite), chacun avec les sous-sous-chapitres suivants: 1) une présentation générale de l'affection (définition, causes, traitement, pronostic), 2) le traitement appliqué, 3) les résultats/discussions, et 4) les conclusions. Les études ont été menées chez des patients atteints de psoriasis et de parodontites, au sein du Cabinet de médecine complémentaire IMUNOINSTANT et d'un cabinet de dentiste.

Le psoriasis est une maladie dont l'étiologie n'est pas claire, qui réduit la qualité de vie et provoque de nombreux problèmes psychologiques et psychosociaux chez la personne touchée. Cependant, il a été établi que les prédispositions génétiques et les stimuli environnementaux contribuent aux anomalies immunologiques, biochimiques et vasculaires, conduisant à la prolifération et à la différenciation épidermique aberrante. Afin d'améliorer la qualité de vie des patients, les schémas thérapeutiques appliqués ont été perfectionnés, mais sans guérir la maladie.

Les anticorps sont un nouvel espoir pour la gestion du psoriasis, offrant des avantages tels que: absence de toxicité pour les organes internes, excellente tolérance et induction d'une rémission prolongée. Les produits IMUNOINSTANT contenant des anticorps IgY polyclonaux du jaune d'œuf peuvent constituer une chance pour les patients atteints de lésions psoriasiques infectées par des agents pathogènes spécifiques, susceptibles ou résistants aux antibiotiques. Les produits à base d'IgY n'ont entraîné aucun effet indésirable ni réponse immunitaire idiopathique chez les patients, quel que soit leur âge, le seul critère d'exclusion étant l'allergie aux protéines de l'œuf. Les patients inclus dans nos études avaient un diagnostic clinique de psoriasis vulgaris, avec différentes localisations et à différents stades. Le traitement a été commencé après une évaluation physique et clinique. L'évaluation des effets thérapeutiques a été réalisée en: vérifiant l'amélioration/rémission de la symptomologie du psoriasis, en procédant à un examen histologique et à un examen microbiologique pour la présence/absence d'agents pathogènes identifiés au début. Dans tous les cas présentés, une thérapie générale et personnalisée, orale et topique avec des produits contenant immunoglobuline Y polyvalente/bivalente ou monovalente, s'est avérée efficace à long terme, comme le montrent les résultats bons, prometteurs obtenus chez la plupart de nos sujets. Du point de vue structurel, la peau et les ongles des patients sont revenus à la normale.

La parodontopathie marginale ou la parodontose est une maladie dentaire qui définit la maladie du parodonte marginal initié et perpétué par diverses bactéries (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus mittis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutants*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides forsythus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*). Cela est dû à une altération de l'équilibre entre la capacité de défense et la résistance locale / générale de l'organisme, d'une part, et à l'action néfaste des facteurs extrinsèques et intrinsèques du parodonte, d'autre part. Une approche plus sûre du contrôle des maladies dentaires que l'immunisation active, est l'immunisation passive locale basée sur des anticorps monoclonaux murins, des anticorps transgéniques de plantes, des anticorps IgY du jaune d'œuf et des anticorps du lait de vache contre des antigènes bactériens spécifiques. L'immunothérapie orale avec IgY est une nouvelle stratégie de traitement prometteuse pour les infections de la cavité buccale. Une solution à 0,1% IgY peut réduire le poids de la plaque sur la surface des dents de 21,1% par rapport au moment initial, alors que l'administration orale d'IgY anti - *Candida albicans* a permis de réduire considérablement le nombre de levures, les lésions sur la langue, la colonisation de la levure dans d'autres organes, réduisant ainsi sa dissémination en raison du blocage de la liaison du microorganisme aux cellules hôtes.

Dans toutes nos études de cas, l'application orale et topique d'anticorps IgY personnalisés IMUNOINSTANT a donné des résultats prometteurs. Les analyses microbiologiques post-thérapie ont montré des résultats négatifs pour les agents pathogènes isolés avant le traitement: *Fusobacterium nucleatum*, *Enterococcus* spp.,

Enterobacter spp., *Streptococcus* spp. α -hémolytique, streptocoque groupe B, streptocoque groupe D et *Staphylococcus* spp. α -hémolytique. Les résultats obtenus avec nos produits (IMUNOINSTANT et IMUNODENT) soutiennent les données de la littérature concernant l'efficacité des traitements par IgY monovalent/bivalent/polyvalent dans la réduction de la colonisation bactérienne de la cavité buccale.

Chapitre VI, "L'utilisation d'immunoglobulines spécifiques d'œufs dans le traitement des entités morbides humaines/animaux bénéficiant d'un traitement curatif" comprend deux sous-chapitres [6.1 *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) et 6.2. La mastite subclinique], structurée comme suit: 1) présentation générale (définition, causes, traitement, pronostic), 2) traitement appliqué, 3) résultats /discussions et 4) conclusions.

Les infections à SARM sont généralement contractées à l'hôpital ou dans la communauté et provoquent fréquemment des maladies chez les personnes dont le système immunitaire est compromis. Le SARM est une bactérie résistante à de nombreux antibiotiques, ce qui le rend difficile à traiter. Dans nos études sur les infections cutanées présentes dans les plaies du psoriasis, 36,6% étaient des *Staphylococcus aureus* et 21,9% des SARM. L'utilisation à grande échelle d'antibiotiques dans l'industrie de l'alimentation animale pour le traitement préventif/curatif des maladies et la promotion de la croissance a conduit à la fois au développement de bactéries résistantes aux antibiotiques et à l'inefficacité des antibiotiques. L'immunothérapie par anticorps spécifique est une bonne alternative aux antibiotiques et les immunoglobulines Y spécifiques sont de bons candidats pour remplacer les antibiotiques dans les fourrages ou dans l'eau de boisson. Des expériences ont montré une inhibition de la croissance de *Staphylococcus aureus* par des IgY spécifiques à des concentrations de 1-5 $\mu\text{g/ml}$, probablement en raison de l'interaction avec les composants de surface de la bactérie.

Nos études, réalisées au sein du Cabinet médical complémentaire IMUNOINSTANT, ont porté sur des patients atteints d'infections urinaires, de fistules localisées, de plaies post-chirurgicales / diabétiques, de troubles dermatologiques (acné, épidermolyse) principalement causés par le SARM. Les patients traités avaient des âges différents (7 à 72 ans), avec des infections de différents stades, âges et endroits. Dans les cas présentés, l'administration orale et topique de produits contenant IgY (œufs hyperimmuns PC2, IMUNOINSTANT MULTIPLU (solution, spray, gel) IMUNOINSTANT G, UNGUENT PV) a donné des résultats favorables après plusieurs mois de traitements généraux et personnalisés (1-10 mois).

La mammité est un processus inflammatoire de la glande mammaire, qui provoque des modifications physico-chimiques et pathologiques du tissu glandulaire et du lait. C'est un problème grave pour l'industrie laitière, avec des pertes pouvant atteindre 10-15% de la production annuelle de lait de vache; en Roumanie, les pertes dues aux mastites sont estimées à environ 11%. Dans les mastites subcliniques, le lait

ne subit pas de modifications évidentes, il semble être normal, mais le nombre de cellules somatiques et de bactéries «acceptables» dépasse le maximum autorisé, la présence d'agents pathogènes est observée, la production de lait diminue et il coagule à ébullition. En plus de la production, les mammites affectent le bien-être des animaux et la santé humaine. Parmi les agents pathogènes impliqués dans la mammite bovine figurent *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactia*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactia*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia rubidaea*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycoplasma agalactiae*, *Nocardia nova*, *Nocardia farcinica* etc.

Le traitement de cette maladie est un problème majeur en raison des coûts et de la résistance aux antibiotiques causés par les traitements mal appliqués. Actuellement, le traitement des mastites repose sur des antibiotiques, mais ceux-ci deviennent souvent inefficaces contre les agents pathogènes; l'immunothérapie/immunoprophylaxie sont en train de devenir la solution de choix. Il existe des vaccins disponibles dans le commerce contre plusieurs agents responsables de la mammite, mais ils sont principalement utilisés pour l'immunoprophylaxie, car ils sont moins efficaces en thérapie. Une alternative attrayante est le traitement aux anticorps IgY, qui s'est avéré réduire le nombre de cellules somatiques, inhiber la croissance bactérienne et augmenter la phagocytose des agents pathogènes par les macrophages du lait. Nous avons développé un produit (IMUNOINSTANT-VOC) contenant de l'IgY dérivé du jaune d'œuf hyperimmun contre les micro-organismes isolés de vaches dans une ferme souffrant de cette maladie depuis plusieurs années (causée par des agents pathogènes ne répondant plus aux antibiotiques). Nos tests visaient à évaluer l'effet préventif et thérapeutique de certaines immunoglobulines Y sur les mastites cliniques et subcliniques, diagnostiquées sur la base de la symptomatologie, de l'analyse du lait et de l'examen bactériologique. Les tests microbiologiques des échantillons prélevés à l'achèvement du traitement ont donné des résultats négatifs pour tous les agents pathogènes identifiés initialement. Les examens de laboratoire ont montré une diminution significative du nombre de cellules somatiques. Outre la restauration de la qualité du lait requise, la consommation de lait des vaches traitées ne pose pas de problème et il n'existe pas de délai de retrait obligatoire (comme dans le cas des antibiotiques).

Chapitre VII, "Conclusions générales et recommandations" présente les conclusions qui peuvent être tirées à la suite de la mise à l'essai d'immunoglobulines Y spécifiques dans l'amélioration et le contrôle de certaines maladies chez l'homme et l'animal, en particulier dans le contexte de l'explosion du phénomène de résistance aux antibiotiques au niveau planétaire. En tant que recommandation, en raison des résultats exceptionnels obtenus avec les produits contenant l'IgY, les médecins et les patients doivent être informés de l'immense potentiel des immunoglobulines Y dans le traitement/la réduction/la prévention de diverses maladies aiguës/chroniques.