



Rapport de Recherche & Développement

2000 / 2005

Réseau canadien de recherche sur
les bactéries pathogènes du porc



NSERC
CRSNG

Université 
de Montréal

Table des matières

● Mot de la direction	p.3
● Comités	p.4
● Membres et institutions / Partenaires	p.5
● Bactériophages dirigés contre <i>Escherichia coli</i> O149 causant la diarrhée en période de post-sevrage chez le porc	p.6
● Développement de stratégies de prévention et de thérapie contre la diarrhée en période de post-sevrage causée par <i>Escherichia coli</i>	p.8
● Caractérisation de la protéine Paa et de son rôle potentiel dans la diarrhée causée par <i>Escherichia coli</i> entérotoxigène	p.10
● Caractérisation de l'effet du super enroulement et de la topoisomérase sur l'expression du gène fimbriaire.	p.12
● Utilisation de deux protéines de surface d' <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> pour le développement d'un vaccin sous-unitaire contre la pleuropneumonie porcine	p.14
● Déficience des gènes codants pour des lectines antibactériennes faites de collagène chez le porc	p.16
● Présence d' <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> , d' <i>Actinobacillus suis</i> , d' <i>Haemophilus parasuis</i> , <i>Pasteurella multocida</i> et <i>Streptococcus suis</i> dans les troupeaux de porcs en Ontario	p.18
● Acquisition du fer par <i>Actinobacillus suis</i> : identification et caractérisation des récepteurs protéiques de la transferrine et de l'hémoglobine et de leurs gènes respectifs	p.20
● Identification de nouveaux facteurs de virulence chez <i>Streptococcus suis</i>	p.22
● Les activités protéolytiques endogènes et acquises de <i>Streptococcus suis</i> : nouveaux facteurs de virulence	p.24
● Étude de l'induction des cytokines pro-inflammatoires par des facteurs de virulence connus chez <i>Streptococcus suis</i>	p.26
● Développement d'un nouvel outil diagnostique pour caractériser rapidement les isolats d' <i>Escherichia coli</i>	p.28
● Identification des gènes d' <i>Haemophilus parasuis</i> exprimés de façon différentielle en réponse aux conditions imitant un environnement <i>in vivo</i>	p.30
● Développement d'un nouveau test sérologique pour le sérotypage des isolats de <i>Haemophilus parasuis</i> et la détermination de leur prévalence en Amérique du Nord	p.32
● Développement d'anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes communs d' <i>Haemophilus parasuis</i> pour leur usage en sérodiagnostic	p.34
● Évaluation de l'immunité chez le porc en utilisant des vaccins à base d'ADN codant pour les sous unités fimbriaires F4 de <i>Escherichia coli</i>	p.36
● Conférences & Présentations	p.39
● Conférenciers invités	p.43

C'est avec plaisir que nous vous présentons **le Bulletin de recherche et développement 2000-2005 du Réseau canadien de recherche sur les bactéries pathogènes du porc**. Le Réseau a été le premier effort de recherche collectif regroupant des spécialistes sur les maladies bactériennes porcines à travers le Canada. Le principal objectif du Réseau a été d'établir une collaboration nationale qui a permis de partager les connaissances et expertises dans le but de développer de nouveaux produits destinés à améliorer la santé des troupeaux de porcs canadiens. À ses débuts, le Réseau comptait plus d'une trentaine de chercheurs provenant de 11 institutions de recherche incluant l'Atlantic Veterinary College, la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, l'Ontario Veterinary College et le Vaccine and Infectious Diseases Organization (VIDO). Le financement a été supporté pour une période de 5 ans (2000-2005) par le Conseil de recherches en sciences naturelles et génie du Canada (CRSNG), par les associations provinciales de producteurs de porc, par Elanco santé animale, Pfizer santé animale et l'Institut de biotechnologie vétérinaire et alimentaire de l'Université de Montréal (IBVA). Depuis sa création, neuf nouveaux chercheurs et un nouveau partenaire industriel se sont joints au Réseau. L'addition de nouveaux membres et d'un nouveau partenaire démontre clairement le dynamisme que le Réseau avait et qu'il possède toujours.

Les membres, les différents comités, de même que le centre administratif du Réseau ont été très actifs à différents niveaux. Nos efforts se sont concentrés sur le contrôle des principales maladies bactériennes du porc en augmentant nos connaissances sur les bactéries pathogènes, en développant de nouveaux outils diagnostiques et en améliorant et développant de nouveaux vaccins. En utilisant différentes approches moléculaires, plusieurs nouveaux facteurs de virulence tels que des adhésines, protéases, nucléases et récepteurs pour le fer ont été identifiés. Voici quelques faits saillants du Réseau :

- Les membres du Réseau ont formé plus d'une centaine de Personnel Hautement Qualifié (PHQ) dans des domaines tels que la pathogénèse bactérienne, biologie moléculaire, vaccinologie et techniques de diagnostic moléculaire.
- Plus de 20 étudiants aux cycles supérieurs ont obtenus soit un diplôme de maîtrise ou un diplôme de doctorat
- 5 brevets ont été déposés
- Plus de 20 tests de diagnostic moléculaire ont été développés, validés et transférés à des laboratoires de diagnostic les mettant ainsi à la disposition des usagers

- Plus de 70 articles ont été publiés à ce jour dans des journaux de références dont plus de moitié résulte de la collaboration de 2 membres ou plus du Réseau
- De nouvelles formulations pour des vaccins ont été développées
- Pretec Microbia, une compagnie « spin-off », a été créée

De toute évidence, le Réseau a accompli des réalisations remarquables. Non seulement nous avons réussi à accomplir des travaux de recherche de très haut niveau, mais aussi à amener une collaboration nationale d'un océan à l'autre entre chercheurs ayant un même intérêt, soit les maladies bactériennes du porc. À notre connaissance, ce genre de collaboration n'existe nulle part ailleurs dans le monde. Alors que nous nous concentrons sur l'identification et la caractérisation des facteurs de virulences de plusieurs bactéries pathogènes porcine et leur utilité pour le diagnostic et la prévention, de nouveaux défis sont apparus. Plusieurs questions et problèmes portant sur des maladies complexes affectant l'industrie canadienne porcine demeurent sans réponse. Afin de poursuivre l'excellent travail fait par le Réseau et aborder ces nouvelles problématiques, nous avons décidé d'élargir notre programme de recherche à l'intérieur d'un nouveau réseau appelé **Réseau canadien de recherche sur les maladies infectieuses du porc (SIDNet)**. La mission de SIDNet est d'appliquer des approches transdisciplinaires de recherche pour mieux comprendre et contrôler les maladies infectieuses du porc afin d'augmenter la compétitivité de l'industrie Canadienne porcine.

Nous voudrions réitérer notre appréciation et reconnaissance au CRSNG de même qu'à tous nos partenaires pour cette aventure qui aura duré 5 ans. Notre appréciation va aussi aux membres du Conseil d'administration, du Comité scientifique, du Comité international d'évaluation et à notre personnel. Finalement, j'aimerais remercier tous les chercheurs. Après tout, ils constituent le cœur et l'âme du Réseau et sans eux, il n'y aurait pas eu de Réseau!

Mario Jacques, Ph.D
Université de Montréal
Professeur et directeur du Réseau

Christian Toupin, Ph.D
Centre de recherche et de développement sur les aliments,
Agriculture et Agroalimentaire Canada
Président du conseil d'administration

Conseil d'administration

- *Christian Toupin, Président du Conseil d'administration
Directeur par intérim, Centre de recherche et de développement sur les aliments, Agriculture et Agroalimentaire Canada.
- *Leon Lueke, Président de Sask Pork et représentant pour le Conseil canadien du porc.
- Paul Dick, Chef de service, recherche et développement et services techniques,
Elanco santé animale.
- Bruce Groves, Directeur technique, Pfizer Canada, groupe santé animale.
- Marielle Gascon-Barré, Vice-rectrice à la recherche, Université de Montréal.
- *Mario Jacques, Professeur titulaire, Université de Montréal,
Responsable du programme et président du comité scientifique.
- Carlton L. Gyles, Professeur, Université de Guelph, Responsable adjoint du programme et membre représentant les chercheurs du Réseau.
- Chris Whitfield, Professeur, Université de Guelph et membre du "Canadian Bacterial Diseases Network".
- *Martin Lessard, Chercheur scientifique, Centre de recherche et de développement du bovin laitier et du porc, Agriculture et Agroalimentaire Canada.
- Martin Young, Officier de recherche senior et chef de groupe, Institut des sciences biologiques, Conseil national de recherche.
- Jean-Guy Bisailon, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec.
- *Gilbert Drouin, Président et directeur général, Valorisation-Recherche Québec.
- Raymond S. Roy, Doyen, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal. (membre non-votant)
- Patrick Wolput, Gestionnaire du Réseau. (membre non-votant)
- Représentante du CRSNG. (membre non-votant)

*Aussi membre du Comité exécutif

Conseil international d'évaluation

- Dr Christian Toupin, Président du comité
Directeur des sciences par intérim
Centre de recherche et de développement sur les aliments, Agriculture et Agroalimentaire Canada.
Saint-Hyacinthe (Québec)
Canada
- Dr Roy Curtiss III
Department of Biology
Washington University
St. Louis (Missouri)
États-Unis
- Dr Willie Donachie
Moredun Research Institute
Midlothian (Écosse)
Royaume-Uni
- Prof. Dr Freddy Haesebrouck
Laboratoire de bactériologie et mycologie vétérinaire
Faculté de médecine vétérinaire
Université de Gand
Belgique
- Prof. Dr Jens Peter Nielsen
The Royal Veterinary and Agricultural University
Department of Clinical Studies
Large Animal Medicine
Copenhagen
Danemark



Comité scientifique

- Mario Jacques, Université de Montréal,
Responsable du programme et président du comité scientifique.
- Carlton L. Gyles, Université de Guelph,
Chef de groupe: Infections causées par Escherichia coli.
- Janet I. MacInnes, Université de Guelph,
Chef de groupe: Infections causées par Actinobacillus spp.
- Marcelo Gottschalk, Université de Montréal,
Chef de groupe: Infections causées par Streptococcus suis.
- Josée Harel, Université de Montréal,
Chef de groupe: Laboratoire de biotechnologie et diagnostic moléculaire.
- Philip J. Willson, « Vaccine and Infectious Disease Organization (VIDO) », Université de la Saskatchewan, Chef de groupe: Développement et amélioration de vaccins.
- Sylvain Quessy, Université de Montréal,
Chef de groupe: Santé publique.
- Roger C. Lévesque, Université Laval, Chercheur externe et membre de « Canadian Bacterial Diseases Network ».
- André Broes, Centre de développement du porc du Québec inc., (avril 2000 à septembre 2003) et Génétiporc (depuis novembre 2003) Vétérinaire
- Patrick Wolput, Université de Montréal,
Gestionnaire du Réseau

Membres et institutions

• Université de Montréal

Faculté de médecine vétérinaire

- D'ALLAIRE, Sylvie
- DUBREUIL, J. Daniel
- FAIRBROTHER, John M.
- GOTTSCHALK, Marcelo
- HAREL, Josée
- HIGGINS, Robert (retraité en 2004)
- JACQUES, Mario
- LALLIER, Réal
- LARIVIÈRE, Serge (retraité en 2002)
- MESSIER, Serge
- MITTAL, Khyali R.
- MOUREZ, Michael
- QUESSY, Sylvain

Faculté de médecine

- DROLET, Marc

• Université McGill

- COULTON, James W.
- NIVEN, Donald F.
- OLIVIER, Martin

• Université Laval

- GRENIER, Daniel

• Université du Québec à Trois-Rivières

- SIROIS, Marc

• Université de Guelph

- BOERLIN, Patrick
- DEWEY, Cate E.
- FRIENDSHIP, Robert M.
- GYLES, Carlton L.
- HAYES, Tony
- MACINNES, Janet I.
- McEWEN, Scott

• Université du Manitoba

- MARQUARDT, Ronald R.

• Université de la Saskatchewan

Vaccine and Infectious Diseases Organization (VIDO)

- BACA-ESTRADA, Maria
- GERDTS, Volker
- VEGA-LOPEZ, Marco
- WILLSON, Philip J.

Prairie Diagnostic Services

- NGELEKA, Musangu

• Université de l'Île-du-Prince-Edouard

Atlantic Veterinary College

- LEWIS, Jeffrey P.

• Conseil National de Recherche Canada

Institut de Recherche en Biotechnologie

- BROUSSEAU, Roland

Institut des Sciences Biologiques

- NASH, John

• Santé Canada

Laboratoire National de microbiologie

- POPPE, Cornelius (retraité en 2005)

Partenaires

- Conseil de recherches en sciences naturelles et génie du Canada
- Pork Nova Scotia
- PEI Hog Commodity Marketing Board
- Porc NB Pork

- Fédération des producteurs de porcs du Québec
- Ontario Pork
- Manitoba Pork Council
- Sask Pork
- Alberta Pork
- Elanco Animal Health

- Pfizer Animal Health
- Gallant Custom Laboratories Inc
- Institut de biotechnologie vétérinaire et alimentaire de l'Université de Montréal



Bactériophages dirigés contre *Escherichia coli* O149 causant la diarrhée en période de post-sevrage chez le porc

Coordonnateurs du projet : Dr Carlton Gyles, Université de Guelph • Dr Robert M. Friendship, Université de Guelph • Dr Josée Harel, Université de Montréal

• Faits saillants •

- 9 bactériophages lysant des *Escherichia coli* O149 entérotoxigènes (ETEC) ont été isolés
- Les bactériophages ont été caractérisés selon leur morphologie, leur profil de digestion suite à une digestion enzymatique avec une endonucléase
- Les phages et combinaisons de phages choisis ont diminué de façon significative la diarrhée induite expérimentalement chez des porcs sevrés, par une inoculation avec ETEC
- Notre étude est la première à isoler et caractériser des phages dirigés contre *E. coli* O149 ETEC et à démontrer l'efficacité de ces phages contre la diarrhée en période de post-sevrage chez les porcs

• Introduction •

L'augmentation de la résistance aux agents antimicrobiens de plusieurs bactéries entraîne un choix limité dans l'usage de ceux-ci pour traiter certaines maladies chez les animaux comme chez l'humain. Le problème de la multirésistance aux agents antimicrobiens a été largement documenté dans le cas de la souche *E. coli* entérotoxigène (ETEC) causant la diarrhée chez le porc. Nous avons ciblés les ETEC porcins du sérotype O149 pour la sélection et l'évaluation des bactériophages qui pourraient être utiles comme traitement prophylactique et comme thérapie contre la diarrhée post-sevrage (DPS) chez le porc. ETEC O149 est responsable de plus de 90% des DPS chez le porc et est également associé à de sévères manifestations de la maladie en Ontario et ailleurs dans le monde. Le but de cette étude était de sélectionner des

phages actifs contre ETEC O149, de les caractériser et de les tester contre des infections expérimentales de DPS dues à ETEC O149.

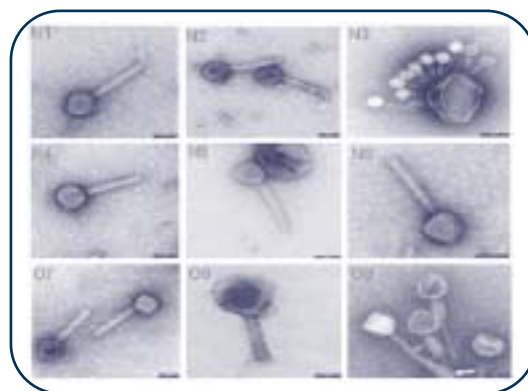


Figure 1: Bactériophages

Matériel et méthodes

Neuf phages capables de lyser ETEC O149 ont été isolés à partir de lisier et de fèces de porcs. Six (N1-N6) ont été choisis pour être testés contre ETEC O149:H10 et trois (O7-O9) ont été choisis pour être testés contre ETEC O149:H43. Ces phages ont tous une tête icososaédrique, un cou, une queue contractile et des fibres de queue ce qui les classe dans la famille des *Myoviridae* (Fig.1). Le phage O8 possède une tête plus grosse et une queue plus petite que les autres phages. Le profil obtenu suite à une digestion enzymatique avec une endonucléase a démontré que les phages N1-N6 étaient similaires et distincts des phages O7-O9. La taille du génome des phages N est estimée entre 42 et 50 kb. Le

génom du phage N1 est en cours de séquençage.

Les phages N1 à N4 ont lysé 84 des 85 souches d'ETEC O149:H10 (provenant de cas sévères de DPS en Ontario) alors que les phages N5 et N6 ont lysé les 85 souches. De façon générale, les phages N n'ont pas été très efficaces contre la souche ETEC O140:H43 qui a été isolée au cours des années 70-80 (Tableau 1). Les trois phages O se sont avérés efficaces contre 41 des 42 souches d'ETEC O149:H43 mais généralement non efficaces contre les souches ETEC O149:H10. Des tests effectués sur des souches non-ETEC O149 et la collection ECOR ont démontré que les

phages N1, N3, N5 et N6 possédaient un spectre d'hôte plus large que celui des phages N2 et N4. Tous les phages ont survécu à une exposition à un pH variant de 5 à 9 mais seulement les phages N1, N2, N4 et O7 ont survécu à une exposition à un pH variant de 3 à 4. Les mutants ETEC O149 résistants aux phages ont été testés pour leur résistance à d'autres phages. Nous avons trouvé que les ETEC O149:H10 qui étaient résistants aux phages N3-N6 demeuraient sensibles aux autres phages mais qu'une résistance contre le phage N1 s'accompagnait d'une résistance au phage N4 alors que la résistance au phage N2 s'accompagnait d'une résistance à tous les autres phages N.

Tableau 1. Activité des neufs bactériophages dirigés contre la souche ETEC O149 et d'autres souches d'*E.coli*.

Souches <i>E. coli</i>	Activité des phages (% de souches lysées)								
	N1	N2	N3	N4	N5	N6	O7	O8	O9
ETEC O149:H10 (85)	99	99	99	99	100	100	55	19	1
ETEC O149:H43 (42)	12	0	0	0	7	12	98	95	86
ETEC non-O149 (37)	35	3	24	15	27	30	35	41	24
collection ECOR (72)	68	5	38	5	51	57	ND	ND	ND

Des phages uniques et une combinaison de phages ont été testés pour leur efficacité contre des infections expérimentales par des ETEC O149:H10 chez des porc sevrés. Les phages testés ont été choisis selon leur résistance à l'acidité et leur résistance croisée. Du bicarbonate de sodium a été administré oralement aux porcs avant l'administration d'ETEC. Nous avons comparé, chez 69 porcs, les réponses au traitement sans phage et au traitement effectué 15

minutes après l'administration des ETEC. Les résultats démontrent que l'utilisation d'un phage unique ou la combinaison de différents phages permet de réduire de façon significative la durée et la sévérité de la diarrhée. Ceci se traduit par une réduction de la perte de poids observée suite à une infection par ETEC O149:H10. Les phages ont été retrouvés dans les fèces pendant 4 à 6 jours suivant l'infection.

Résultats et discussion

Les efforts se sont concentrés sur l'ETEC O149:H10 étant donné qu'elle est la principale ETEC pathogène associée à la DPS chez le porc. De plus, elle est reliée aux récentes maladies sévères observées en Ontario et au Québec. Les résultats démontrent, que les bactériophages que nous avons isolés, sont susceptibles d'être efficaces pour le traitement et la prévention de la DPS associée à O149 et autres ETEC chez le porc. De plus, l'excrétion de phages dans les fèces peut contribuer à la réduction de la contamination de l'environnement par ETEC O149 provenant du porc.

Pour plus d'information :

Dr Carlton L. Gyles

Tél.: (519) 824-4120 poste: 54715

Courriel: cgyles@ovc.uoguelph.ca

• Mémoires et Thèses •

- Jamalludeen, N. 2005. Isolation, characterization and evaluation of bacteriophages for use against O149 enterotoxigenic *Escherichia coli* post-weaning diarrhea in pigs. Thèse de doctorat. University of Guelph. En préparation.
- Noamani, B. 2002. M.Sc. Maîtrise. Virulence Genes in Porcine O149 Enterotoxigenic *Escherichia coli*. University of Guelph. Guelph, Ontario

• Publications •

- Amezcu, R., R. M. Friendship, C. E. Dewey, C. L. Gyles, and J. M. Fairbrother. 2002. Presentation of post-weaning *E. coli* diarrhea in southern Ontario, prevalence of hemolytic *E. coli* serogroups involved and their antimicrobial resistance patterns. Can. J. Vet. Res. **66**:73-78.
- Amezcu, R., C. E. Dewey, R.M. Friendship, C.L. Gyles. 2002. A case-control study investigating risk factors associated with postweaning *Escherichia coli* diarrhea in southern Ontario. J. Swine Health and Prod. **10**: 245-249.
- Maynard C, J.M. Fairbrother, S. Bekal, F. Sanschagrín, R.C. Levesque, R. Brousseau, L. Masson, S. Larivière, and J. Harel. 2003. Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. Antimicrob Agents Chemother. **47**:3214-3221.
- Noamani, B.N, J. M. Fairbrother, C. L. Gyles. 2003. Virulence genes of O149 enterotoxigenic *Escherichia coli* from outbreaks of postweaning diarrhea in pigs. Vet Microbiol. **97**: 87-101.

Développement de stratégies de prévention et de thérapie contre la diarrhée en période de post-sevrage causée par *Escherichia coli*

Coordonnateur du projet : Dr John M. Fairbrother, Université de Montréal

• Collaborateur : Dr Carlton L. Gyles, Université de Guelph

• Faits saillants •

- Démonstration de l'émergence d'un nouveau groupe d'*Escherichia coli* plus virulent et plus résistant aux antibiotiques, qui cause la diarrhée en période de post-sevrage chez le porc.

- Développement du Coliprotec, un vaccin vivant oral constitué d'une souche d'*E. coli* F4-positive et non toxigène, pour la prévention de la diarrhée post-sevrage (DPS) chez le porc
- Développement d'un modèle expérimental de DPS

• Introduction •

Escherichia coli est l'une des plus importantes causes de diarrhée en post-sevrage (DPS) chez le porc. Cette maladie cause de lourdes pertes économiques attribuables à la mortalité, la morbidité, la perte de poids des animaux et aux coûts des médicaments. Les *E. coli* causant la diarrhée en post-sevrage appartiennent généralement au sérotype O149 et sont porteurs de l'adhésine F4 (K88), qui permet l'adhésion de la bactérie à l'intestin. Ces dernières années, une augmentation de l'incidence de cas sévères de diarrhée associée à *E. coli* a été observée à l'échelle mondiale. Cependant, les facteurs responsables de cette recrudescence ne sont pas

totalement connus. On peut compter parmi ces facteurs l'émergence de clones d'*E. coli* O149 plus virulents et résistants et de récents changements dans la régie de la production porcine. La résistance accrue de nombreuses bactéries à une gamme élargie d'antibiotiques couramment utilisés en production et la récente hausse de la prévalence et de la sévérité des syndromes en post-sevrage nécessiteront l'utilisation de méthodes alternatives pour le contrôle de la DPS. On compte parmi les nouvelles stratégies de vaccination, l'immunisation orale des porcelets avec des souches vivantes non virulentes d'*E. coli* porteur de l'adhésine fimbriaire (F4)

ou avec des fimbriae F4 purifiés. À ce jour, aucune stratégie n'a totalement prouvé son efficacité. Il est fort probable que l'approche qui aura le plus de succès sur la ferme sera celle qui saura combiner des modifications dans la diète des animaux à d'autres mesures préventives.

Dans le but d'identifier la cause de nouvelles épidémies, notre groupe a comparé des souches d'*E. coli* O149 causant la diarrhée chez le porc et isolées de 1978 à 2000. De plus, les objectifs du projet étaient de développer un vaccin vivant et un vaccin sous-unitaire oral, tous deux basés sur la présence du fimbriae F4.

Matériel et méthodes

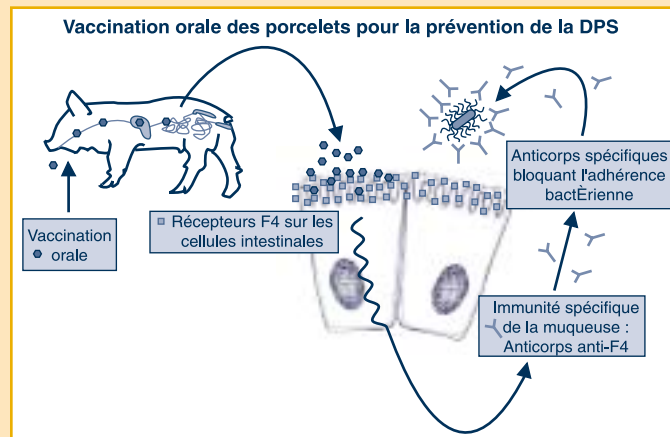
Caractérisation des souches d'*E. coli* O149

Plus de 150 souches d'*E. coli* O149 associées à la diarrhée chez le porc, isolées inclusivement de 1978 à 2000, ont été caractérisées par sérotypage, virotypage (identification des facteurs de virulence). Les relations génétiques entre ces différentes souches ont été évaluées par clonotypage à l'aide d'électrophorèse à champs pulsé (PFGE). Nos résultats semblent indiquer que la forme sévère et émergente des infections entériques associées aux *E. coli* observée au Québec, est associée à un nouveau groupe d'*E. coli* plus virulents et plus résistants aux antibiotiques. Ce nouveau groupe est détecté depuis 1995. Comparativement aux « anciens » *E. coli* associés à la diarrhée, qui étaient principalement O149:K91:H43 ou O149:K91:H α et qui exprimaient le fimbriae F4 et les 3 entérotoxines habituelles (STb, LT et EAST-1), le nouveau groupe d'*E. coli* est associé au sérotype O149:K91:H10 et exprime le fimbriae F4, les 3 entérotoxines habituelles, mais en plus, une adhésine putative, Paa et pour presque la moitié de ces souches, une autre entérotoxine, STa. De plus, les nouveaux *E. coli* sont plus résistants à 3 antibiotiques (Apramycine, Néomycine et Triméthoprim/Sulfa) couramment utilisés pour traiter la DPS.



Vaccin vivant oral

Afin de développer et de tester de nouvelles technologies pour la prévention de la DPS, nous avons reproduit la maladie dans un environnement contrôlé. Ce modèle est maintenant couramment utilisé pour évaluer des technologies alternatives et préventives pour la prévention de la diarrhée associée à *E. coli* chez le porc. En utilisant ce modèle, nous avons confirmé que l'administration orale d'une souche d'*E. coli* F4-positive non-toxinogène est inoffensive pour les porcs nouvellement sevrés et les protège contre une infection avec une souche d'*E. coli* pathogène F4-positif causant la DPS. Nous avons démontré que ce vaccin stimule rapidement la production d'IgM sécréteur, dans le contenu intestinal et dans la circulation sanguine, contre le fimbriae F4. Ces anticorps préviennent ainsi l'adhésion du fimbriae F4 de la bactérie pathogène au récepteur intestinal, ce qui prévient la colonisation par la souche pathogène. Une entreprise d'essaimage (spin-off), Prevtect microbia, fondée par les Drs Fairbrother et Nadeau, a démarré ses activités avec ce vaccin appelé Coliprotec. Le vaccin est en processus pour l'homologation canadienne afin d'être commercialisé au Canada.



Vaccin sous-unitaire

Pour commencer, nous avons mis au point une technique facile, économique et pratique pour purifier les fimbriae F4 en grande quantité. Ensuite, Ces fimbriae purifiés ont été intégrés dans un système de livraison développé à partir de carboxyméthyl amidon par le Dr Mateescu de l'UQAM. Nous avons démontré que cette formulation protégeait les

fimbriae F4 dans les fluides gastriques simulés et les libérait dans les fluides intestinaux simulés. Nous en sommes maintenant à la phase de perfectionnement de ce vaccin sous-unitaire afin de provoquer une réponse marquée des IgM au niveau intestinal contre les fimbriae F4 et d'engendrer ainsi une protection.

Résultats et discussion

Nous avons développé un modèle expérimental d'infection à ETEC chez les porcs sevrés. Plusieurs groupes de chercheurs avaient tenté de développer un tel modèle, mais sans succès. Ce modèle est d'une très grande utilité pour étudier la pathogénicité, les facteurs de virulence et l'efficacité des vaccins. Il a été utilisé pour démontrer l'efficacité d'un vaccin à base d'*E. coli* K88+ vivants, mais non toxique, contre des infections à ETEC.

Nous avons démontré que ce même vaccin est efficace dans les fermes où la DPS due au ETEC K88+ se déclare 10 à 14 jours après le sevrage mais pas dans celles où la maladie

apparaît quelques jours seulement après le sevrage. Nos résultats démontrent que l'administration par voie orale d'un tel vaccin est efficace mais pas en tant que complexe compétitif.

Nous avons développé un bon nombre de procédures pour la purification à grande échelle des pili K88+ qui doivent être testés en tant que vaccin contre la DPS due à ETEC. Nous avons établi une procédure nous donnant un rendement élevé. Ceci devrait faciliter les prochaines études sur ce vaccin sous-unitaire. Nous avons développé un bon nombre d'outils facilitant l'étude de l'infection à l'ETEC K88+ chez le porc.

Finalement, une nouvelle méthode de protection pour le vaccin à base d'antigène K88+ a été développée afin de permettre la libération du vaccin au niveau du petit intestin. Ce procédé permettra d'accroître le potentiel de ce vaccin à induire une forte réponse d'anticorps au niveau des muqueuses.

Pour plus d'information :

Dr John M. Fairbrother
Tél. : (450) 773-8521, poste 18234
john.morris.fairbrother@umontreal.ca
Site internet : www.ecl-lab.com

• Publications •

- Fairbrother JM, Nadeau É and Gyles CL (2005). *Escherichia coli* in post-weaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Animal Health Research Reviews* **6**: 17-39.
- Calinescu C, Mulhbachter J, Nadeau É, Fairbrother JM and Mateescu MA (2005). Carboxymethyl high amylase starch (CM-HAS) as excipient for *Escherichia coli* oral formulations. *Eur J Pharm Biopharm.* **60**(1): 53-60.
- Noamani B, Fairbrother JM and Gyles CL (2003). Virulence genes of O149 enterotoxigenic *Escherichia coli* of post-weaning diarrhea in pigs. *Vet. Microbiol.* **97**: 87-101.

Brevet

Fairbrother JM and Nadeau É (2004). International PCT. Use of live bacteria for growth promotion in animals. United States Patent Pending, International Publication WO 2005/074706

Commercialisation

Fairbrother JM et Nadeau É (2003). Cofondateurs de **Prevtec microbia inc.**, une entreprise d'essaimage (spin-off) dérivée de l'Université de Montréal, dont la première commercialisation se fera avec le Coliprotec, un vaccin vivant d'*E. coli* contre la diarrhée post-sevrage chez le porc.

Caractérisation de la protéine Paa et de son rôle potentiel dans la diarrhée causée par *Escherichia coli* entérotoxigène

Coordonnateur du projet : Dre Josée Harel - Université de Montréal

Collaborateurs : Dr Patrick Boerlin – University of Guelph • Dr Carlton L. Gyles - University of Guelph • Dr J.D. Dubreuil - Université de Montréal

• Faits saillants •

- L'analyse de l'évolution des virotypes et de la résistance antimicrobienne dans une collection d'*Escherichia coli* (ETEC) O149 a démontré une augmentation du nombre de souches multi-résistantes (en particulier pour la tétracycline) et l'émergence de nouveaux facteurs de virulence tels que Paa.
- L'ensemble des ETEC O149 Paa-positifs possède les gènes *estB*, *elt*, *astA* et *faeG* et plus de la moitié possède aussi le gène *estA*.
- La majorité des ETEC O149 possède *tetA* et/ou *tetB*
- Paa, une protéine de 30 kDa est hautement conservée et exprimée dans les souches ETEC
- Toutes ces observations suggèrent que *paa* joue un rôle dans la virulence

• Introduction •

La souche entérotoxigène d'*E. coli* (ETEC) possède deux facteurs de virulence bien connus, les fimbriae et les entérotoxines. Les ETEC qui sont généralement impliqués dans les diarrhées en période post-sevrage chez le porc possèdent les fimbriae F4 ou F18 et produisent une combinaison de 4 entérotoxines nommées a) entérotoxine thermolabile (LT), b) entérotoxines thermostables STa et STb, et c) entérotoxine entéroaggrégative thermostable (EAST1). Le fimbriae permet l'adhérence aux entérocytes et la colonisation, tandis que les entérotoxines causent la diarrhée sécrétrice. Des indices laissent penser qu'il existe d'autres facteurs de virulence méconnus.

Un facteur de virulence putatif, codé par le gène *paa*, a été identifié dans une souche EPEC porcine (PEPEC). Ce facteur aurait un rôle dans l'adhérence. La protéine Paa de PEPEC est composée de 252 acides aminés. Elle est identique à Paa retrouvée chez des souches *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) O157:H7 et présente une homologie avec les protéines PEB3 de *Campylobacter jejuni* et AcfC de *Vibrio cholerae*. Le gène *paa* a également été détecté dans des souches ETEC d'origine animale. L'analyse de l'évolution des virotypes et de la résistance antimicrobienne dans une collection d'*Escherichia coli* ETEC O149 a montré une augmentation du nombre de souches multi-résistantes (en particulier pour la

tétracycline) et l'émergence de nouveaux facteurs de virulence tels que Paa (F. Fontaine, E. Nadeau, S. D'Allaire, S. Péres et J.M. Fairbrother, en préparation). Récemment, la caractérisation d'un plasmide STa-positif, TetA-positif (pTENT2), provenant d'un isolat ETEC O149 isolé en Ontario, a révélé que celui-ci possédait également le gène *paa*.

Ce projet avait pour objectif de caractériser la localisation de *paa* à l'intérieur d'une collection de ETEC O149:F4 porcins, de déterminer le degré de conservation de ce gène et de son association avec d'autres gènes de virulence d'ETEC et de procéder à la production de Paa à partir de souches portant le gène.



Matériel et méthodes

Les 37 souches ETEC *paa* positives utilisées pour notre étude ont été sélectionnées à partir d'une collection d'isolats d'*E. coli* O149 provenant de porcelets nouveau-nés et de porcs sevrés affectés de diarrhée. Ces échantillons ont été recueillis de 1980 à 2000 par le laboratoire d'*E. coli* situé à la faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal à Saint-Hyacinthe.

Les gènes de virulence associés à l'ETEC porcine i.e. *estA*, *estB*, *elt*, *astA*, *faeG* et *orfX* (que l'on retrouve en aval de *paa* et des gènes de résistance aux agents antimicrobiens *tetA*, *tetB* et *tetC* sur le plasmide pTENT2) ont été amplifiés. Nous avons fait migrer les plasmides ETEC sur des gels d'agarose puis réalisé des transferts de ces gels sur des membranes. Ensuite, ces dernières ont été hybridées avec des sondes, amplicons de gènes de virulence et de gènes de résistance à la tétracycline, marquées.

Le séquençage des amplicons *paa* a été fait par le Dr David W. Silverside de la faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal à Saint-Hyacinthe. Les alignements multiples des séquences de *paa* ont été réalisés avec le programme CLUSTALW (ClustalW, Service at the European Bioinformatics Institute; <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

L'expression de la protéine Paa a été testée dans les différentes souches d'ETEC. Les extraits protéiques obtenus par choc osmotique ont été analysés par électrophorèse SDS-PAGE. Paa a été détectée par transfert sur une membrane de nitrocellulose incubée avec les anticorps anti-Paa. La membrane a été nettoyée trois fois et révélée avec la solution TMB.

Table 1. Gènes de virulence et de résistance antimicrobienne dans les souches ETEC O149 *paa*⁺

gènes de virulence	gènes de résistance	Nombre de souche positive
<i>paa, estB, elt, astA, faeG</i>	---	2
<i>paa, estB, elt, astA, faeG</i>	<i>tetB</i>	14
<i>paa, estB, elt, astA, faeG</i>	<i>tetA, tetB</i>	1
<i>paa, estB, elt, astA, faeG, estA</i>	---	3
<i>paa, estB, elt, astA, faeG, estA</i>	<i>tetA</i>	13
<i>paa, estB, elt, astA, faeG, estA</i>	<i>tetB</i>	2
<i>paa, estB, elt, astA, faeG, estA</i>	<i>tetA, tetB</i>	2

Résultats et discussion

Un total de 37 souches d'*E. coli paa* positives ont été sélectionnées à partir d'une collection d'ETEC O149 provenant de porcs diarrhéiques. Le gène *paa* est associé aux gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques chez les ETEC O149. Toutes les souches possèdent les gènes *estB*, *elt*, *astA* et *faeG* (tableau 1). 21 des 37 souches possèdent également le gène *estA* qui se relie à deux virotypes: *astA* + et *astA*-. À l'exception de 5 souches, toutes possèdent les gènes *tetA* et/ou *tetB*.

Le gène *paa* est localisé sur un plasmide de 38 à 204 kb chez les ETEC O149 porcins. Dans les souches EDL933 et Sakai (EHEC O157:H7), *paa* se trouve au niveau de l'îlot de pathogénicité relié au phage situé entre *yciD* et *yciE*. Les gènes *estA*, *sepA* et *orfX* que l'on retrouve sur pTENT2 sont aussi associés aux plasmides *paa* que l'on retrouve dans la collection de ETEC. Le gène *sepA* code pour une protéine autotransporteur dont la fonction est encore inconnue et qui est impliquée dans la virulence chez *Shigella flexneri*.

Paa est hautement conservée parmi les souches ETEC et possède une homologie avec les *Paa* des souches PEPEC et EHEC. La région qui encadre le gène *paa* est cependant moins bien conservée parmi les souches ETEC et est différente chez les souches PEPEC et EHEC. Les régions « répétitions inversées (IR) » en amont et en aval de *paa* ETEC ainsi que des répétitions TTG dans ces IR sont des caractéristiques des séquences d'insertion (IS). Dans les souches ETEC, les gènes de virulence codant pour LT, STa, STb et EAST1 sont associés aux séquences d'insertion. L'association des éléments IS avec *paa*ETEC et le contenu G+C de 44% de la séquence sont caractéristiques d'un gène de virulence. *Paa* est exprimée chez toutes les souches ETEC et est plutôt associée à la bactérie que sécrétée dans le surnageant de culture.

Pour plus d'information :

Dr Josée Harel

Tél.: (450) 773-8521 poste: 18233

Courriel: josee.harel@umontreal.ca

• Publications •

- Batisson I, Guimond MP, Girard F, An H, Zhu C, Oswald E, Fairbrother JM, Jacques M, Harel J. 2003. Characterization of the novel factor *paa* involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. Infect. Immun. **71**:4516-4525
- S. Leclerc, P. Boerlin, C. Gyles, J.D. Dubreuil, M. Mourez, J.M. Fairbrother, J. Harel. *Paa*, originally identified in attaching and effacing *E. coli*, is also associated with porcine O149 enterotoxigenic *E. coli*. Soumis à J. Clin. Microbiol.
- S. Leclerc, M. Mourez, J.D. Dubreuil, J. Harel. *Paa* localization in diarrheagenic *Escherichia coli*. En préparation.

• Mémoires et Thèses •

- Leclerc, Sébastien. 2005. Caractérisation de *Paa*, un nouveau facteur de virulence chez *E. coli*. M. Sc. Maîtrise Université de Montréal.

Caractérisation de l'effet du super enroulement et de la topoisomérase sur l'expression du gène fimbriaire.

Coordonnateurs du projet : Dr Marc Drolet, Université de Montréal • Dr Josée Harel, Université de Montréal
Collaborateur : Dr Christine Martin, INRS - FRANCE

• Faits saillants •

- Le super enroulement de l'ADN joue un rôle sur la transduction des signaux environnementaux au noyau de la bactérie. En particulier, il a été démontré que des variations de la température, de l'osmolarité et de l'accessibilité de l'oxygène ont des effets sur le super enroulement de l'ADN.
- La topologie de l'ADN est déterminante pour l'expression du gène fimbriaire F165₁.
- Les supers enroulements global et local peuvent affecter d'une façon significative l'expression du gène fimbriaire.
- Nos résultats démontrent que des changements induits au niveau du super enroulement de l'ADN sont importants pour le contrôle de l'expression du gène de virulence fimbriaire chez les souches *Escherichia coli* pathogènes et sont impliqués de façon générale dans le contrôle de la virulence bactérienne.

• Introduction •

Lors de l'invasion, les bactéries pathogènes subissent d'importantes modifications physiologiques ce qui nécessite une coordination de l'expression des gènes de virulence en réponse au stress rencontré au cours de l'infection. Il a été démontré que de nombreux stress environnementaux tels que le choc osmotique et l'anaérobiose induisaient des changements au niveau du super enroulement de l'ADN. Ceci peut directement affecter la transcription d'un groupe spécifique de gènes notamment ceux qui jouent un rôle au niveau de la virulence bactérienne (porines extramembranaires et les fimbriae de type 1).

Chez *E. coli*, le niveau du super enroulement global est géré par une ADN gyrase composée de deux sous unités codées par les gènes *gyrA* et *gyrB*, lesquels sont influencés par le ratio

ATP/ADP. L'ADN topoisomérase I joue un rôle mineur au niveau du super enroulement global mais elle est aussi responsable de la régulation de la transcription induite du super enroulement négatif. L'ADN gyrase et la topoisomérase peuvent donc être impliquées au niveau du contrôle environnemental de l'expression des facteurs de virulence.

La souche pathogène *E. coli* 4787 (O115:F165) cause la septicémie chez le porc. La souche exprime le fimbriaire F165 qui est codé par l'opéron *foo*. F165₁ est connu pour son rôle au niveau du processus de l'infection en permettant la survie et la colonisation de la bactérie au niveau du tractus extra-intestinal. Plusieurs conditions environnementales, telles que l'osmolarité, le pH et la température, sont connues pour moduler l'expression des gènes

fimbriaux tel que *foo* (Berthiaume *et al.* 2004; Daigle *et al.* 2000; Crost *et al.* 2003). Il a déjà été démontré que le super enroulement de l'ADN fluctue selon les conditions environnementales, il est donc possible que celui-ci ait un impact sur la synthèse du fimbriaire F165₁ durant le processus d'infection.

Le but de notre étude a été d'étudier si à la fois les supers enroulements global et local sont impliqués dans la régulation de l'expression de l'opéron *foo*. Nos résultats démontrent que des changements, induits au niveau du super enroulement de l'ADN, ont un effet important au niveau du contrôle de l'expression des gènes de virulence fimbriaux chez *E. coli* et qu'ils sont généralement impliqués dans le contrôle de la virulence bactérienne.

Matériel et méthodes

Afin de pouvoir étudier l'effet du super enroulement de l'ADN sur l'expression de l'opéron *foo*, nous avons construit des fusions chromosomiques LacZ avec le gène *fooB*. Afin de moduler à la fois les supers enroulements global et local, nous avons utilisé des souches isogéniques mutées ou non dans les gènes codant pour la gyrase et/ou l'ADN topoisomérase I (souche sauvage, *gyrB225-*, *gyrB225-topA-*) (Broccoli *et al.* 2004)

Des études précédentes ont démontré que la méthylation de GATC est impliquée dans la régulation de la variation de phase de l'expression de *foo*. Afin de déterminer si le super enroulement pouvait modifier les séquences de méthylation de la région régulatrice de *foo* en corrélation avec la phase de transcription ON/OFF, des analyses par Southern blot ont été réalisées sur de l'ADN chromosomique des souches lysogéniques MT008 et des mutants *gyrB* et *gyrB topA*.

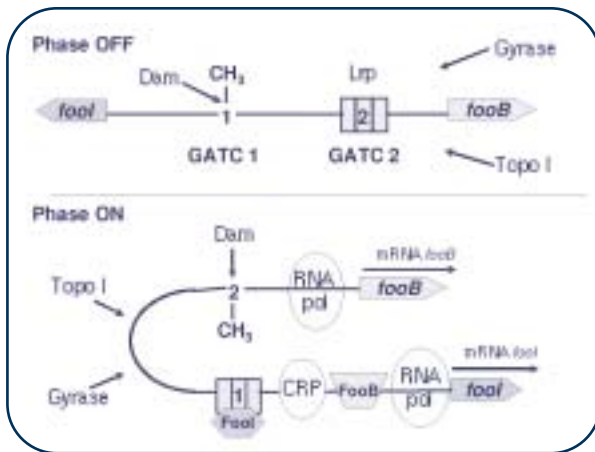


Figure 1: Ce modèle, inspiré de celui proposé pour la variation de phase de pap (va der Woude et al. (1996)), propose que pour l'expression de *foo*, le super enroulement local et global interfère au niveau de la protection des sites de méthylation de GATC et/ou en affectant la fixation de Lrp à la région de régulation de *foo*.

Dans le but d'étudier l'influence du super enroulement de l'ADN sur l'expression de l'opéron *foo*, nous avons construit des fusions chromosomiques LacZ avec le gène *foo*. L'utilisation de souches isogéniques, nous a permis de moduler le super enroulement global et local. Nous avons démontré que l'expression de *fooB* est grandement diminuée lorsque le super enroulement global négatif est réduit par une mutation (*gyrB225*), ce qui diminue ainsi l'activité de l'ADN gyrase. La délétion du gène codant pour la topoisomérase, *topA*, a davantage réduit l'expression de *fooB*. Ces résultats suggèrent qu'autant le super enroulement local que global peut affecter de façon significative l'expression de *fooB*. Ces résultats s'appuient sur le fait que la méthylation des séquences d'ADN, au niveau des sites d'interaction de Lrp, est réduite en l'absence de l'ADN topoisomérase I. De plus, la transcription divergente d'un puissant promoteur augmente l'expression de *fooB* chez le mutant *topA* null.

Nos résultats suggèrent que la régulation de *foo* par Dam et Lrp est altérée par le super enroulement. Nous proposons un modèle dans lequel les supers enroulements local et global pourraient intervenir au niveau de la protection de la méthylation des sites GATC et/ou en affectant les sites de fixation des séquences régulatrices de *foo* (Figure 1).

Pour plus d'information :

Dr Marc Drolet

Tél.: (514) 343-5796

Courriel: marc.drolet@umontreal.ca

• Mémoires et Thèses •

- Julie-Annick Desabrais. 2004. Rôle des ADN topoisomérases dans l'expression des gènes fimbriaires d'une souche septicémique de *Escherichia coli*. M.Sc. Thèse. Université de Montréal, Montréal, Québec.
- Marie Catherine Tessier. 2002. Study of the effect of topoisomerase and DNA topology in fimbrial gene expression and phase variation. M. Sc Thèse. Université de Montréal, Montréal, Québec.

• Publications •

- Marie-Catherine Tessier, Julie Annick Desabrais, Cécile Crost, Christine Martin, Josée Harel and Marc Drolet. DNA supercoiling and topoisomerases in F165₁ fimbrial gene expression in the pathogenic *Escherichia coli* 4787 strain. (Manuscrit en préparation).
- Daigle F, Forget C, Martin C, Drolet M, Tessier MC, Dezfoulian H, Harel J. 2000. Effects of global regulatory proteins and environmental conditions on fimbrial gene expression of F165(1) and F165(2) produced by *Escherichia coli* causing septicemia in pigs. Res. Microbiol. **151**:563-574.
- Drolet, M., S. Broccoli, F. Rallu, C. Hraiky, C. Fortin, É. Massé, I. Baaklini (2003). The problem of hypernegative supercoiling and R-loop formation in transcription. Front. Biosci. **8**:d210-21.

Utilisation de deux protéines de surface d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* pour le développement d'un vaccin sous-unitaire contre la pleuropneumonie porcine

Coordonnateurs du projet : Dr Mario Jacques, Université de Montréal • Dr James W. Coulton, McGill University
Dr Philip J. Willson, Vaccine and Infectious Diseases Organization (VIDO)

• Faits saillants •

- Identification de 2 nouvelles protéines de surface d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* (FhuA et HgbA) impliquées dans l'acquisition du fer. Ces deux protéines sont présentes dans tous les sérotypes (1 à 15) et biotypes (I et II) d'*A. pleuropneumoniae* étant ainsi de bons candidats pour la vaccination.
- Une protection a été observée chez les porcs ayant été immunisés avec des formulations contenant une ou les deux protéines.
- Les résultats obtenus confirment le potentiel de ces deux nouveaux antigènes de surface d'*A. pleuropneumoniae* pour le développement d'un vaccin sous-unitaire.

• Introduction •

La pleuropneumonie porcine cause d'énormes pertes économiques à l'industrie porcine mondiale. La majorité des vaccins commerciaux disponibles contre *A. pleuropneumoniae* consiste en des cellules entières inactivées par des traitements thermiques ou chimiques. Ces vaccins sont habituellement administrés par voie musculaire ou sous-cutanée et sont reconnus pour causer des lésions au site d'infection. Par conséquent, un vaccin efficace, sans risque et offrant une protection contre l'ensemble des sérotypes et biotypes d'*A. pleuropneumoniae* est

nécessaire. Notre groupe a identifié deux protéines de surface impliquées dans la régulation du fer, FhuA et HgbA. Le but visé par ce projet était de développer un vaccin sous-unitaire basé sur ces deux protéines et qui serait en mesure d'offrir une protection aux animaux contre tous les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*.



A. pleuropneumoniae

Matériel et méthodes

Les gènes codants pour les protéines FhuA et HgbA ont été clonés à partir d'une souche d'*A. pleuropneumoniae* de sérotype 1. La distribution des 2 gènes parmi les 15 souches de référence d'*A. pleuropneumoniae* a été déterminée par analyse PCR. De plus, les gènes ont été clonés dans un vecteur d'expression et les protéines recombinantes ont été exprimées avec *Escherichia coli*. Les deux protéines recombinantes (FhuAr et HgbAr) ont été formulées avec un adjuvant mucosal (Proteosome TM, gracieusement fourni par ID Biomedical corp. de Québec, ville St-Laurent, QC) pour une immunisation par voie intra-nasale chez le porc. Les protéines recombinantes ont aussi été formulées avec Emulsigen (MVP Laboratories Inc. Ralston, NE) et ce, avec ou sans immunomodulateur pour l'immunisation intramusculaire ou intradermale des porcs. Les expériences d'immunisation ont été faites à VIDO (Université de Saskatchewan). Seize groupes de 6 porcelets ont été immunisés trois fois avec différentes formulations contenant FhuA et/ou HgbA puis infectés par la souche d'*A. pleuropneumoniae* de sérotype 1 à l'aide d'aérosols.

Nous avons démontré par analyse PCR que les gènes *fhuA* et *hgbA*, codant pour les protéines FhuA et HgbA, sont conservés et présents dans tous les sérotypes (1 à 15) et biotypes (I et II) d'*A. pleuropneumoniae*. L'effet protecteur (diminution des signes cliniques, des lésions pulmonaires et de la mortalité) a été observé suite à une immunisation des porcs avec certaines formulations telles

que FhuA formulé avec Proteosome (intranasal), FhuA et HgbA formulées avec Emulsigen et un immunomodulateur (intramusculaire). Ces résultats démontrent le potentiel de ces deux nouveaux antigènes de surface d'*A. pleuropneumoniae* pour le développement d'un vaccin sous-unitaire. Une demande de brevet a d'ailleurs été déposée. D'autres études

doivent être réalisées afin d'optimiser l'efficacité des formulations choisies et de vérifier leur effet protecteur contre des sérotypes hétérologues.

Pour plus d'information :

Dr Mario Jacques

Tél.: (450) 469-2739 poste: 18348

Courriel: mario.jacques@umontreal.ca

• Mémoires et Thèses •

- Mikael, L.G. 2002. Identification and characterization of the ferric hydroxamate uptake receptor in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Thèse de doctorat. Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec.
- Shakarji, L. 2005. FhuA and HgbA, two iron receptors of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, used as antigens for a subunit vaccine against porcine pleuropneumonia. M.Sc. Maîtrise. Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec.

• Publications •

- Mikael, L.G., P.D. Pawelek, J. Labrie, M. Sirois, J.W. Coulton and M. Jacques. 2002. Molecular cloning and characterization of the ferric hydroxamate uptake (*fhu*) operon in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology* **148**: 2869-2882.
- Mikael, L.G., Srikumar, R., Coulton, J.W., Jacques, M. 2003. *fhuA* of *Actinobacillus pleuropneumoniae* encodes a ferrichrome receptor but is not regulated by iron. *Infect. Immun.* **71**:2911-2915
- Pawelek, P.D. and J.W. Coulton. 2004. Hemoglobin-binding protein HgbA in the outer membrane of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: homology modelling reveals regions of potential interactions with hemoglobin and heme. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **23**: 211-221
- Shakarji, L., L.G. Mikael, R. Srikumar, M. Kobisch, J.W. Coulton, and M. Jacques. 2006. FhuA and HgbA, outer membrane proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: role as virulence determinants. *Can. J. Microbiol.* **52**:391-396
- Shakarji, L., C. Ng Thow Hing, J. Gauthier, C.R. Rioux, P.J. Willson, J.W. Coulton, and M. Jacques. FhuA and HgbA, two iron receptors of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, used as antigens for a subunit vaccine against porcine pleuropneumonia. (soumis)
- Srikumar, R., L.G. Mikael, P.D. Pawelek, A. Khamessan, B.F. Gibbs, M. Jacques and J.W. Coulton. 2004. Molecular cloning of haemoglobin-binding protein HgbA in the outer membrane of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology* **150**: 1723-1734

Brevet

- Antigens for *Actinobacillus pleuropneumoniae* and methods thereof. 2002. M. Jacques, L.G. Mikael, J.W. Coulton, A. Khamessan and M. Sirois. Filing for a PCT. File 10662-113USPR

Déficiences des gènes codants pour des lectines antibactériennes faites de collagène chez le porc

Coordonnateurs du projet : Dr Tony Hayes, Université de Guelph • Dr Janet I. MacInnes, Université de Guelph • Dr Mario Jacques, Université de Montréal

• Faits saillants •

- La lectine liant le mannose (MBL-A) et la ficoline alpha sont les principales lectines antibactériennes retrouvées dans le sang chez le porc.
- Plusieurs séquences génétiques mutées chez les MBL et ficolines du porc ont été identifiées.
- Une mutation génétique qui déstabilise la structure des MBL-A a été retrouvée chez différentes espèces porcines.
- Des mutations génétiques, associées à une diminution de la production des MBL-C, ont été trouvées chez certaines races de porc.
- Des tests PCR pour détecter les gènes MBL défectueux ont été développés et sont utilisés pour mesurer leur impact sur la susceptibilité des porcs aux différentes maladies infectieuses

• Introduction •

Les lectines à base de collagène telles que les lectines liant le mannose (MBL) et les ficolines jouent un rôle prépondérant au niveau de l'immunité innée, particulièrement chez les jeunes qui n'ont pas encore développé un système immunitaire spécifique. Les MBL et les ficolines induisent divers mécanismes de défense chez l'hôte en reconnaissant et liant des structures polysaccharidiques qui sont communes à diverses bactéries et autres micro-organismes. Certaines lectines ayant des mutations génétiques sont responsables de certaines prédispositions génétiques à diverses infections, particulièrement chez les enfants. Nous avons employé des tests d'adhésion bactériens afin d'identifier les principales lectines antibactériennes chez le porc. Ensuite, nous avons concentré nos efforts dans le but d'identifier les mutations génétiques qui affaibliraient le système de défense inné aux infections bactériennes primaires et secondaires.



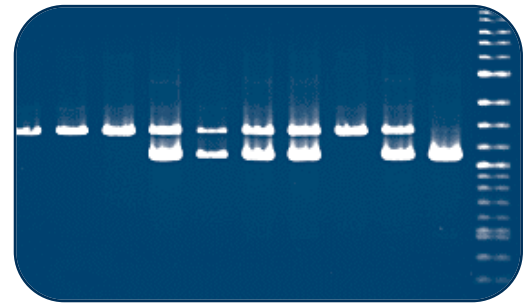
Matériel et méthodes

Différents isolats d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*, d'*Actinobacillus suis* et d'*Haemophilus parasuis* ont été mis en culture afin d'isoler et d'identifier les principales lectines antibactériennes dans le plasma sanguin de porc. Les protéines ont été identifiées par séquençage d'acide aminé et spectrométrie de masse. L'ARN isolé de foie de porc a été utilisé pour produire de l'ADNc par RT-PCR et les

mutations ont été détectées par analyse SSCP et par séquençage de l'ADN. Des tests PCR pour ces mutations, qui affectent la fonction ou l'expression des gènes codant pour les lectines, ont été développés. Ces tests ont été utilisés pour surveiller la fréquence des altérations dans des échantillons d'ADN de porc provenant de différentes races

Certaines souches d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* se lient à la ficoline alpha porcine, alors que tous les isolats d'*A. suis* et *H. parasuis* se lient à une protéine plasmique, la MBL-A porcine. La MBL-A porcine est principalement exprimée au niveau du foie. Cette protéine est codée par le gène de la MBL 1, un homologue d'un pseudogène humain connu. Les analyses SSCP des ADNc de MBL et ficoline du foie de porc ont révélé plusieurs polymorphismes de simples nucléotides (SNP). Un test PCR a révélé que de 3 à 29% des porcs cliniquement sains de la principale race commerciale portaient une mutation au niveau de MBL1 qui perturberait l'assemblage de la MBL-A porcine. D'autres variantes de SNP au niveau du gène de la MBL 1 représentent des marqueurs génétiques potentiels pour

les locus haplotypes des collectines car plusieurs lectines du système de défense inné sont regroupées avec la MBL 1 sur le chromosome 14 du porc. Chez certains porcs, la MBL-C porcine n'est pas exprimée au niveau du foie. Ce problème est lié à la présence de SNPs au niveau de la région promotrice du gène codant pour la MBL 2. Un test RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) effectué pour ce défaut au niveau du promoteur de MBL 2 a révélé qu'approximativement 30% des porcs de différentes races portaient cette défectuosité pour l'expression de la MBL-C au niveau du foie. Ces différents tests génotypiques sont maintenant utilisés sur différents porcs sains et malades afin de déterminer s'ils sont des marqueurs pour la prédisposition aux infections bactériennes.



Génotypage par PCR de MBL-A

Pour plus d'information :

Dr Tony Hayes

Tél.: (519) 824-4120 poste: 54637

Courriel: ahayes@uoguelph.ca

• Mémoires et Thèses •

- Brooks, A.S. Forms and bacterial binding functions of porcine ficolins. Thèse de doctorat. University of Guelph, 2003
- Lillie BN. Functions and genetics of porcine mannan binding lectins. Thèse de doctorat. University of Guelph, en préparation.

• Publications •

- Lillie BN, Brooks AS, Keirstead ND, Hayes MA. 2005. Comparative genetics and innate immune functions of collagenous lectins in animals. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2005. **108(1-2)**:97-110.
- Lillie BN, Brooks AS, Hammermueller J, MacInnes JI, Jacques M, Hayes MA. Porcine mannan-binding lectin A binds to *Actinobacillus suis* and *Haemophilus parasuis*. *Dev. Comp. Immunol* (sous presse).
- Lillie BN, Keirstead ND, Squires JD, Hayes MA. Porcine MBL2 gene polymorphisms and altered hepatic expression of porcine mannan binding lectin-C. Manuscript en préparation.
- Lillie BN, Squires EJ, Keirstead, ND, Hammermueller J, Hayes MA. Single-nucleotide polymorphisms in the porcine mannan-binding lectin genes. *Experimental Biology*. **246;17**, 2005 (résumé). Manuscript en préparation.
- Keirstead, ND, Brooks AS, Lillie BN, Caswell J, Hayes MA. Comparison of ficolins expressed by porcine and bovine neutrophils. *Experimental Biology* **246.18** (résumé).
- Brooks AS, DeLay J, Hayes MA. Purification and functional characterization of porcine plasma ficolins that binds *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Dev Comp Immunol*. **27**: 835-844, 2003.
- Brooks AS, DeLay J, Hayes MA. Characterization of porcine plasma ficolins that bind *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 5b. *Immunobiology* **207**:1-11, 2003.
- Brooks AS, DeLay J, Hammermueller J, Hayes MA. Identification and Characterization of Ficolin b in Porcine Neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 2003 **1624**:34-45, 2003.

Présence d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*, d'*Actinobacillus suis*, d'*Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida* et *Streptococcus suis* dans les troupeaux de porcs en Ontario

Coordonnateurs du projet : Dr Janet MacInnes, Université de Guelph • Dr Robert M. Friendship, Université de Guelph
Dr Marcelo Gottschalk, Université de Montréal

• Faits saillants •

- Pratiquement aucun troupeau ontarien n'est infecté par *P. multocida*.
- Presque tous les troupeaux sont *H. parasuis* et *S. suis* positifs mais seulement 48% sont positifs pour *S. suis* serovar 2.
- Les trois quarts des troupeaux ontariens semblent être infectés par *A. pleuropneumoniae* mais avec des sérovars moins virulents, tels que 3, 7 et 12, que dans les années passées.
- Au moins 18% des troupeaux ontariens sont négatifs à *A. suis* mais à cause de la nature du test utilisé, il n'a pas été possible de déterminer combien de troupeaux sont positifs à *A. suis*.

• Introduction •

Des échantillons ont été prélevés dans 50 troupeaux faisant partie d'une étude étalée sur plusieurs années. Dans cette étude, les troupeaux ont été sélectionnés de façon aléatoire chez 4 000 producteurs de porcs en Ontario. Le tout a été fait par stratification de façon à avoir une représentation adéquate des gros producteurs (20%) qui produisent plus de 80% des porcs. De plus, certaines fermes ont été sélectionnées dans le but de fournir une bonne représentation géographique de l'est de l'Ontario et de la région de Niagara

où l'on retrouve moins de fermes. Le but était d'établir un échantillon de population qui pourrait représenter l'industrie porcine ontarienne tant géographiquement que pour le type d'installation. En se basant sur le type d'installation, 57% étaient des maternités - finisseurs et 43% étaient des multi-sites. Concernant la taille des troupeaux, 14% étaient des troupeaux de 100 truies et moins, 57% comptaient entre 100 et 500 truies, 19% comptaient entre 500 et 1000 truies et 10% avaient 1000 truies et plus.

Matériel et méthodes

Pour chaque ferme, 10 porcelets âgés de 6 semaines ont été sélectionnés de façon aléatoire et pour chaque porcelet, 2 écouvillonnages nasaux et 2 écouvillonnages des amygdales ont été prélevés. Un des deux écouvillonnages provenant des amygdales a été mis en culture sur un milieu sélectif pour *Actinobacillus* spp. L'un des écouvillonnages nasaux a été utilisé pour la détection de la

toxine de *Pasteurella multocida* à l'aide d'un test ELISA Dako PMT, alors que l'autre écouvillon a été mis en culture sur un milieu sélectif pour *H. parasuis*. Sur ces mêmes fermes, des sérums ont été prélevés chez 10 porcs « finisseurs » afin d'être testés pour *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Nous avons évalué la présence des différentes espèces bactériennes en effectuant

des tests PCR et des cultures bactériennes. La recherche d'*App* de sérotypes 1 (9, 11), 2, 3 (6, 8), 5a/b, 7 (4), 10 et 12 a été réalisée par des tests sérologiques par BioVet sur les 10 sérums de porcs finisseurs récoltés provenant du même troupeau que les porcs engraisseurs testés.

Bien que les différents milieux sélectifs ont permis de réduire les contaminants de la microflore récoltée à partir des écouvillonnages nasaux et des amygdales, nous avons recueilli des mélanges complexes qui ont nécessité, dans la majorité des cas, une analyse par PCR pour la détection des agents pathogènes. L'analyse PCR a révélé que tous les troupeaux (98%), à l'exception d'un seul, se sont avérés positifs pour *S. suis*, mais seulement 48% des troupeaux l'étaient pour *S. suis* sérovar 2. Tous les troupeaux sauf 2 ont démontré des signes d'infection à *H. parasuis*. À l'inverse, seulement un seul troupeau s'est avéré positif à *P. multocida*. Étonnamment, 76% des troupeaux sont positifs pour *App* et 64% des troupeaux testés possédaient des antigènes pour les sérovars 1 (0,3%), 2 (0,3%), 3 (15%), 5 (6%), 7 (25,5%)



et 12 (17%). Ces résultats démontrent un réel changement comparativement aux années précédentes où les sérovars 1, 5 et 7 prédominaient. Ceci peut en partie s'expliquer par le fait que les sérovars 1 et 5 figurent parmi les plus virulents et par conséquent, les efforts d'éradication ont principalement été dirigés envers ces sérotypes alors que les sérovars 2, 3, 7 et 12, considérés comme moins virulents, n'ont pas été l'objet de cette éradication. Suite au test PCR pour *apxII*, 18% des troupeaux se sont avérés négatifs pour *A. suis*. Cependant, étant donné que *App* possède la même toxine, il n'est pas possible de dire combien de troupeaux sont positifs à *A. suis*. À la lumière de nos résultats, nous remarquons qu'il y a eu un revirement au cours des 10 dernières années en ce qui concerne les agents pathogènes retrouvés dans les troupeaux de porcs en Ontario. Presque la totalité des troupeaux sont maintenant exempts de *P. multocida* et des sérovars d'*App* de nature moins virulente font leur apparition.

Pour plus d'information :

Dr Janet MacInnes

Tél.: (519) 824-4120 poste: 54731

Courriel: macinnes@uoguelph.ca

• Mémoires et Thèses •

- Abdul Long. En cours. Differentially expressed genes expressed in *A. pleuropneumoniae* in the presence of BALF and surfactant components. Thèse de doctorat, University of Guelph, Guelph Ontario

• Publications •

- MacInnes, J. I. and E. T. Lally. 2004 .The genus *Actinobacillus*. In: The Prokaryotes: An evolving electronic resource for the microbiological community, 3rd edition. Dworkin, W. et al., eds Springer-Verlag, New York. (sous presse on paper and at <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>)
- MacInnes, J. I., and J.T. Bosse. 2004. Chapter 18 *Actinobacillus* . In C. L. Gyles and C. O. Thoen eds. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 3rd . Iowa State University Press, Ames, Iowa.

Acquisition du fer par *Actinobacillus suis*: identification et caractérisation des récepteurs protéiques de la transferrine et de l'hémoglobine et de leurs gènes respectifs

Coordonnateurs du projet : Dr Donald F. Niven, Université McGill • Dr Janet MacInnes, Université de Guelph

• Faits saillants •

- Identification et caractérisation des protéines impliquées dans l'acquisition du fer au niveau de la transferrine (TbpA/TbpB) et de l'hémoglobine (HgbA) par *Actinobacillus suis* (7 souches).
- Les gènes codant pour les récepteurs de la transferrine et de l'hémoglobine (*tbpA/tbpB* et *hgbA*) et les gènes associés ont été identifiés et séquencés.
- *tbpB* de *A. suis* a été clonée et exprimée chez *E. coli* et TbpB recombinant (rTbpB) s'est avéré être reconnu par le sérum porcin dirigé contre TbpBr d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*.

• Introduction •

Actinobacillus suis est un important pathogène porcin qui connaît une émergence particulièrement au niveau des troupeaux à statut sanitaire élevé. Au début de ce projet, nous connaissions très peu de chose sur le pouvoir virulent de *A. suis*. Toutefois, nous considérons que la capacité d'acquérir du fer à l'intérieur de l'hôte était cruciale pour la pathogénicité. À quelques exceptions près, les bactéries pathogènes doivent être capables

d'acquérir le fer à partir des tissus de l'hôte pour survivre. Comme le fer est difficilement accessible chez les animaux hôtes, les agents pathogènes ont donc dû développer un système à haute affinité pour acquérir le fer. Les objectifs de ce projet étaient de confirmer la présence d'un tel système chez *A. suis* et s'il était présent, de caractériser les composantes impliquées dans ce processus.

Matériel et méthodes

La capacité de sept souches d'*A. suis* (ATCC 15557, B49, C84, H89-1173, H91-0380, SO4 et VSB 3714) d'acquérir le fer à partir d'hémoglobine et de transferrine animale a été étudiée par des études de croissance. Des expériences d'attachement sur phase solide et d'isolement par affinité des composantes des récepteurs ont été faites en utilisant des fractions membranaires préparées à partir de cultures de microorganismes mis en croissance dans des milieux riches ou carencés en fer. À partir de méthodes traditionnelles basées sur l'utilisation d'ADN génomique de *A. suis* C84 et SO4 et d'amorces spécifiques des séquences de gènes de *A. pleuropneumoniae* ont été utilisées pour amplifier et séquencer les gènes d'*A. suis* codant pour les récepteurs. Les résultats obtenus ont permis de construire de nouvelles amorces et les données sur les séquences supplémentaires ont été acquises par PCR, ainsi que par des techniques de séquençage directes du génome. L'organisation génétique et les détails de la transcription des gènes de récepteurs ont été étudiés par la technique du RT-PCR. À l'aide de méthodes traditionnelles, nous avons construit et cloné un polynucléotide codant pour la TbpB de *A. suis*. Le plasmide recombinant a été incorporé à *E. coli* et la protéine recombinante TbpBr, marquée par une queue poly-histidine, a été purifiée par chromatographie d'affinité à partir de lysat de cellules transformées.



Les expériences de croissance avec de l'hémoglobine et de la transferrine d'origine porcine, bovine et humaine ont révélé que les sept souches utilisées sont capables d'utiliser seulement la transferrine porcine comme source de fer alors que les trois types d'hémoglobine peuvent être utilisés comme source de fer. Les expériences d'attachement sur phase solide ont démontré que les membranes dérivées des sept souches possédaient une forte affinité pour la transferrine porcine de même que pour les trois hémoglobines. Les expériences de fixation par compétition ont démontré que les trois hémoglobines se liaient au(x) même(s) récepteur(s). Ces gènes séquencés constituent deux groupes: *tonB1-exbB1-exbD1-tbpB-tbpA* et *hugZ-hgbA*. Par la présence d'éléments putatifs du promoteur et de boîtes Fur en amont de *tonB1* et *hugZ*, nous avons démontré que les gènes des deux groupes pouvaient être co-transcrits et contrôlés par le fer.

De plus, les polypeptides liant la transferrine et l'hémoglobine se sont aussi avérés contrôlés par le fer. Les masses moléculaires de ces polypeptides et la séquence terminale azotée du polypeptide liant l'hémoglobine sont similaires aux séquences polypeptidiques de *tbpA*, *tbpB* et *hgbA*. L'ensemble de ces résultats semble indiquer que les polypeptides isolés par affinités sont les produits des gènes

tbpA, *tbpB* et *hgbA*. Les gènes codants pour le système TonB2 (*exbB2*, *exbD2* et *tonB2*) chez *A. suis* C84 et S04 ont aussi été identifiés et séquencés mais les détails par lesquels le fer est capté de l'hémoglobine et de la transferrine doivent être établis. L'alignement des séquences d'acides aminés du précurseur de TbpB de *A. suis* et *A. pleuropneumoniae* a révélé des régions homologues avec la moitié de leur extrémité C-terminale. De plus, la TbpBr de *A. suis* a été reconnue par le sérum porcin dirigé contre la TbpBr de *A. pleuropneumoniae*. Il est donc logique de croire qu'un vaccin sous-unitaire développé à partir de l'une de ces deux protéines pourrait induire une protection contre *A. suis* et *A. pleuropneumoniae*. Les résultats obtenus par cette étude indiquent que l'acquisition du fer (provenant de la transferrine et de l'hémoglobine) par *A. suis* engendre des mécanismes similaires retrouvés au sein de la famille des *Pasteurellaceae*, tel que *A. pleuropneumoniae*.

Pour plus d'information :

Dr Donald F. Niven

Tél.: (514) 398-7886

Courriel: niven@nrs.mcgill.ca

• Mémoires et Thèses •

- Bahrami, F. 2005. Iron acquisition by *Actinobacillus suis*. Thèse de doctorat. McGill University, Montréal, Québec.

• Publications •

- Bahrami, F., A. Ekins and D.F. Niven. 2003. Iron acquisition by *Actinobacillus suis*: identification and characterization of transferrin receptor proteins and encoding genes. *Vet. Microbiol.* **94**: 79-92.
- Bahrami, F. and D.F. Niven. 2005. Iron acquisition by *Actinobacillus suis*: identification and characterization of a single-component haemoglobin receptor and encoding gene. *Microb. Pathogen.* **39**: 45-51.



Identification de nouveaux facteurs de virulence chez *Streptococcus suis*

Coordonnateurs du projet : Dr Marcelo Gottschalk, Université de Montréal • Dr Josée Harel, Université de Montréal
Dr Philip J. Willson, Vaccine and Infectious Diseases Organization (VIDO)

• Faits saillants •

- De nouvelles protéines ayant un potentiel de virulence ont été mises en évidence.
- Nous avons identifié et cloné une nouvelle protéine, appelée SP1, qui est hautement immunogène et présente chez la plupart des souches de *Streptococcus suis* (de sérotypes différents). Cette protéine est la mieux reconnue par les sérums d'animaux convalescents.
- Nous avons cloné, purifié et caractérisé SP1 et avons démontré qu'elle est très immunogène lorsqu'elle est injectée chez le porc.
- Nous avons démontré que lorsqu'un adjuvant approprié est utilisé, le vaccin protéique confère une protection dans le modèle d'infection à *S. suis* chez les souris.
- La prochaine étape est de tester ce vaccin protéique chez le porc afin de vérifier son effet protecteur.

• Introduction •

Streptococcus suis est l'une des plus importantes bactéries pathogènes chez le porc. Elle a aussi une grande importance comme agent zoonotique chez l'humain. Elle cause différentes pathologies telles que septicémie, choc septique et méningite. Plusieurs approches ont été utilisées pour développer des vaccins contre *S. suis*. Toutefois, le succès entourant ces vaccins est limité car la protection apportée est sérotype-dépendante ou dépendante de la souche et généralement, les résultats sont mitigés. Par exemple, des vaccins constitués de cellules mortes et de cellules vivantes mais non-virulentes ont un effet protecteur. Cependant, des immunisations répétées sont nécessaires pour conférer une protection. Aucune protection contre des souches hétérogènes n'a pu être démontrée. Récemment, les intérêts de recherche se sont davantage dirigés vers des antigènes protéiques de *S. suis* comme candidats pour le vaccin. Les vaccins sous-

unitaires utilisant la suilysine ou la MRP (muramidase release protein) et le facteur EF ont démontré leur capacité à conférer une protection efficace contre les souches homogènes et hétérogènes du sérotype 2 de *S. suis*. Cependant, l'utilité de ces vaccins sous-unitaires est plutôt restreinte étant donné que pour certaines régions géographiques, un nombre important de souches virulentes n'expriment pas ces protéines. Par conséquent, l'identification d'autres facteurs antigéniques, particulièrement des protéines de surface, pourraient contribuer au développement d'un vaccin sous-unitaire. Afin de comprendre davantage la pathogénicité de *S. suis* et d'identifier d'autres protéines qui pourraient s'avérer utiles pour le développement d'un nouveau vaccin, nous avons réussi à identifier une nouvelle protéine de surface appelée SP1 (Surface Protein 1) à partir d'une souche virulente de *S. suis* sérotype 2.

Matériel et méthodes

Identification, caractérisation, production et conservation de SP1

Nous avons construit une banque génomique d'expression en utilisant l'ADN chromosomique de *S. suis* S735. Cette banque a été analysée avec du sérum de porc convalescent. Un clone positif, qui a fortement réagit au sérum, a été séquencé. Le gène codant pour la protéine immunogénique a été identifié et appelé *sp1*. Une analyse bioinformatique a permis d'identifier la séquence d'acides aminés de *sp1*. Le gène *sp1* a été amplifié par PCR à partir d'ADN chromosomique de la souche S735 et cloné dans le plasmide pMAL. Le vecteur d'expression pORF3 obtenu a été transformé chez *E. coli*. SP1-MBP. Après expression de la protéine de fusion dans *E. coli*, SP1-MBP, celle-ci a été purifiée par chromatographie d'affinité sur une résine d'amylose puis coupée avec la protéase Xa. Ensuite, la protéine recombinante dépourvue de la MBP a été purifiée à l'aide d'un chromatographe à échange d'anions. Afin de produire des anticorps mono-spécifiques anti-SP1, des lapins ont été immunisés avec la protéine purifiée SP1. Ces anticorps nous ont permis de confirmer par immuno-localisation en microscopie électronique, la localisation de la protéine SP1 à la surface de *S. suis*. Nous avons également pu déterminer par immunoblot la distribution de SP1 chez les différents sérotypes de *S. suis*, dont le sérotype 2.

Essais d'immunisation chez les porcelets

Dans un intervalle de 3 semaines, 2 groupes de 8 porcs ont reçu 2 injections intramusculaires composées de 100µg de SP1 purifiée et mélangée à 30% d'adjuvant Emulsigen-Plus™ (MVP Laboratories Inc, Ralston, NE) et 30% d'Emulsigen-Plus™ comme contrôle. Ensuite, les IgG totales spécifiques de SP1 ainsi que leurs isotopes (IgG1 et IgG2) ont été mesurées par ELISA dans le sérum de porcs immunisés.

Expérience de protection chez la souris

Des souris CD1 ont été séparées aléatoirement en deux groupes de 10 et immunisées (voie sous-cutanée) par deux injections, à deux semaines d'intervalle, avec SP1 purifiée et mélangée avec l'adjuvant Quil A. L'injection de Quil A seul a été utilisé comme contrôle. Dix jours après la seconde vaccination, les souris ont été infectées par voie intra-péritonéale avec 1×10^8 CFU d'une

souche virulente de *S. suis* (31533). Les souris ont été observées à raison de deux fois par jour pour des signes cliniques et la mortalité et ce, jusqu'au 14e jour après l'infection. Des échantillons sanguins ont été prélevés avant chaque vaccination et infection afin de déterminer la réponse humorale.

SP1 est une protéine de surface ancrée à la surface de *S. suis* et hautement conservée dans sa partie carboxy-terminale

SP1 ne possède aucune homologie avec d'autres séquences connues, ce qui suggère qu'il s'agit d'une nouvelle protéine de *S. suis*. Elle a une masse moléculaire de 110 kDa et est composée de 670 acides aminés. La séquence protéique de SP1 présente des caractéristiques des protéines ancrées à la surface des bactéries à Gram positif par leur

extrémité carboxy-terminale telles qu'une séquence signal amino-terminale et un motif carboxy-terminale LPVTG d'attachement membranaire. Nous avons détecté à l'intérieur de l'extrémité carboxy-terminale de la protéine, une région contenant 10 répétitions d'une séquence de 27 acides aminés qui est immédiatement suivie par une région de 49 acides

aminés qui s'associe à la membrane cellulaire. Nous avons démontré, par microscopie électronique, que SP1 était distribuée de façon homogène à la surface de *S. suis*. L'anticorps spécifique à SP1 réagit avec les lysats de la plupart des sérotypes de *S. suis*, incluant le sérotype 2, ce qui suggère que SP1 est hautement conservée chez *S. suis*.

Résultats et discussion

SP1 combiné à Quil A protège les souris contre une infection expérimentale à *S. suis*.

Une immunisation par voie sous-cutanée des souris avec la protéine recombinante SP1 donne une très haute réponse humorale d'IgG. Toutes les sous-classes d'IgG ont été induites chez les souris immunisées avec SP1. Les IgG2a présentaient le titre le plus élevé, suivie des IgG1, des IgG2b et des IgG3. Il est important de noter que la réponse humorale a conféré une immunité efficace contre une infection expérimentale avec une souche virulente de *S. suis* (31533). On observe une protection complète de la souris contre une mort causée par *S. suis*. Il n'y a eu aucune réaction négative suite au processus d'immunisation.

SP1 recombinant est très immunogène tel que démontré par le modèle expérimental chez le porc

La vaccination avec la protéine recombinante SP1 donne une réponse humorale d'anticorps (IgG) significative (Tableau 1). Cependant, la réponse en IgG1 est supérieure à celle des IgG2, laquelle ne confère pas nécessairement une protection. Nous avons donc évalué la capacité protectrice de SP1 chez la souris avec un modèle de vaccination modifié qui implique des voies d'immunisation différentes et l'utilisation d'adjuvants optimaux.

• Conclusion •

Nous avons identifié une nouvelle protéine de surface de *S. suis* qui est très immunogène et présente chez la majorité des souches de *S. suis*. La vaccination faite avec cette protéine et une formulation adéquate protège les souris contre une infection expérimentale à dose létale avec une souche virulente de *S. suis*. Ces résultats suggèrent que cette protéine pourrait faire l'objet d'un vaccin sous-unitaire. D'autres études cliniques seront faites sur un modèle de vaccination et d'infection chez l'espèce porcine.

Pour plus d'information :

Dr Marcelo Gottschalk

Tél.: (450) 773-8521 poste: 18374

Courriel: marcelo.gottschalk@umontreal.ca

• Mémoires et Thèses •

- Lun, S. 2004. Regulation and the Role of Suilysin in Pathogenesis of *Streptococcus suis* Capsular Serotype 2. Thèse de doctorat. University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan.
- Salles, M.W.S. 2002. The Crypt Lymphoepithelium of the Palatine Tonsils of Pigs: A Study of its Structure, Function and Role in the Pathogenesis of *Streptococcus suis* Infection. Thèse de doctorat. University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan.
- Younes, Fatmé. 2003. Effet du fer et du manganèse sur la croissance bactérienne et l'expression de protéines membranaires chez *S. suis* sérotype 2. M.Sc. Maîtrise. Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec

• Publications •

- Fontaine, M.C., Perez-Casal, J., Willson, P.J. 2004. Investigation of a novel Dnase of *Streptococcus suis* serotype 2. Infect. Immun. **72**:774-81
- Brassard, J., M. Gottschalk, S. Quessy. 2004. Cloning and purification of the *Streptococcus suis* serotype 2 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its involvement as an adhesin. Vet. Microbiol. **102**: 87-94.
- Harel, J., G. Martinez, A. Nassar, H. Dezfoulian, S.J. Labrie, R. Brousseau, S. Moineau, M. Gottschalk. 2003. Identification of an inducible phage in a virulent strain of *Streptococcus suis* serotype 2. Infect. Immun. **71**: 6104-6108
- Martinez, G., Harel, J., Lacouture, S., Gottschalk, M. 2003. Cloning and partial characterization of the gene encoding the putative elongation factor Ts of *Streptococcus suis* serotype 2. Archiv. Microbiol. **180**: 298-302.
- Martinez, G., J. Harel, S. Lacouture and M. Gottschalk. 2002. Genetic diversity of *Streptococcus suis* types 2 and 1/2 isolates recovered from carrier pigs in closed herds. Can. J. Vet. Res. **66**: 240-248.
- Martinez, G. A.F. Pestana de Castro, K. Jordno Ribeiro Pagnani, G. Nakazato, W. Dias da Silveira and M. Gottschalk. 2003. Clonal distribution of an atypical MRP+, EF*, and suilysin+ phenotype of virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains in Brazil. Can. J. Vet. Res. **67**: 52-55.
- Esgleas, M., Lacouture, S., Gottschalk, M. 2005. *Streptococcus suis* serotype 2 Binding to Extracellular Matrix Proteins. FEMS Microbiol. Lett. **1**:244(1):33-40.
- Li Y, Martinez G, Gottschalk M, Lacouture S, Willson P, Dubreuil JD, Jacques M, Harel J. 2006. Identification of a surface protein of *Streptococcus suis* and evaluation of its immunogenic and protective capacity in pigs. Infect. Immun. **74**(1):305-12.
- Lun S, Willson PJ. 2005. Putative mannose-specific phosphotransferase system component IID represses expression of suilysin in Serotype 2 *Streptococcus suis*. Vet. Microbiol. **105**(3-4): 169-180.
- Lun S, Willson PJ. 2004. Expression of Green Fluorescent Protein and its Application in Pathogenesis Studies of Serotype 2 *Streptococcus suis*. J. Microbiol Methods. **56**:401-412.
- Lun S, Perez-Casal J, Connor W, Willson PJ, January 2003, Role of suilysin in pathogenesis of *Streptococcus suis* capsular serotype 2, Microbial Pathogenesis, **34** (1): 27-37.
- Fontaine MC, Perez-Casal J, Willson PJ. 2004. Investigation of a Novel DNase of *Streptococcus suis* serotype 2. Infect. Immun. **72**:774-781.
- Salles MW, Perez-Casal J, Willson P, Middleton DM. 2002. Changes in the leucocyte subpopulations of the palatine tonsillar crypt epithelium of pigs in response to *Streptococcus suis* type 2 infection. Vet Immunol Immunopathol. **87**(1-2):51-63.

Brevet

Streptococcus suis polypeptides and polynucleotides encoding same and their use in vaccinal and diagnostic application. Harel J., et al. Filing for a provisional patent in the United States. File no: 60/713.328

Les activités protéolytiques endogènes et acquises de *Streptococcus suis*: nouveaux facteurs de virulence

Coordonnateurs du projet : Dr Daniel Grenier, Université Laval • Dr Marcelo Gottschalk, Université de Montréal

• Faits saillants •

- Quatre activités protéolytiques majeures ont été identifiées chez *S. suis*
- La dipeptidyl aminopeptidase IV, une sérine protéase reconnue comme facteur de virulence chez d'autres agents pathogènes, a été clonée et purifiée. *S. suis* peut acquérir une activité plasminogène à sa surface par liaison du plasminogène humain et porcin
- Des études sont en cours pour démontrer la contribution des activités protéolytiques endogènes et acquises dans le pouvoir pathogène de *S. suis*

• Introduction •

Streptococcus suis est une bactérie responsable d'infections sévères (méningites, endocardites, septicémies) chez le porc. Malgré l'intensification des recherches au cours de la dernière décennie, les mécanismes utilisés par *S. suis* pour coloniser l'hôte, se disséminer et causer l'infection ne sont pas clairement élucidés. Chez plusieurs agents pathogènes, les activités protéolytiques

jouent un rôle important dans l'acquisition de nutriments, la perturbation des mécanismes de défense de l'hôte et la destruction tissulaire. Toutefois, aucune donnée n'existe dans la littérature concernant la production de telles activités par *S. suis*. Le but du projet était donc de caractériser les activités protéolytiques produites par *S. suis* de même que celles acquises de l'hôte.

Matériel et méthodes

Les activités protéolytiques de *S. suis* (cellules entières et surnageant de culture) ont été mises en évidence par utilisation de substrats synthétiques et naturels. Une analyse par zymographie sur gel de polyacrylamide a permis de déterminer la masse moléculaire des protéases. Afin de caractériser l'activité dipeptidyl aminopeptidase IV (DPP IV), la protéase recombinante a été purifiée en utilisant des techniques de biologie moléculaire. Le gène

codant pour la DPP IV a été cloné dans le système pBAD/TOPO® et surexprimé chez *Escherichia coli*. La DPP IV produite avec ce vecteur possédait une queue polyhistidine permettant ainsi sa purification sur une colonne d'affinité.

L'activité de liaison du plasminogène (porcin et humain) à la surface de *S. suis* a été mesurée à l'aide d'un essai immunologique utilisant des bactéries immobilisées au fond

de puits d'une plaque à microtitre. Dans le but d'activer le plasminogène lié à *S. suis*, les cellules bactériennes ont été mises en présence de streptokinase ou de surnageants de culture de *Streptococcus* spp. isolés des muqueuses du porc ou alors ont été co-cultivées avec des cellules endothéliales. L'activité plasminogène a été mesurée à l'aide d'un substrat chromogénique spécifique.

L'analyse du profil protéolytique de *S. suis* a révélé la présence de quatre protéases majeures: arginine-aminopeptidase, caséinase, pseudo-chymotrypsine et DPP IV. La DPP IV, une sérine protéase présente à la surface de *S. suis* et sécrétée dans le milieu extracellulaire, a fait l'objet d'une étude plus approfondie.

La caractérisation de la DPP IV recombinante et du gène de *S. suis* S735 a permis d'observer certaines ressemblances avec les diverses DPP IV bactériennes rapportées dans la littérature. Le gène possède un cadre de lecture ouvert (2,268 nucléotides) codant pour une protéine de 755 acides aminés ayant une masse molaire moléculaire calculée de 85 kDa. La comparaison de la séquence nucléotidique et protéique de la DPP IV de *S. suis* S735 avec celles retrouvées chez diverses bactéries a montré une homologie de séquence avec un haut pourcentage d'identité avec les DPP IV d'autres streptocoques pathogènes dont *Streptococcus pyogenes* et *Streptococcus pneumoniae*. L'étude de la séquence en acides aminés de la DPP IV de *S. suis* a permis de détecter la présence d'un motif glycine-X-sérine-X-X-glycine qui est caractéristique des sérines protéases. La construction d'un mutant déficient pour la DPP IV permettra de déterminer la contribution de cette enzyme dans la virulence de *S. suis*.

La liaison du plasminogène est considérée comme un élément très important dans la virulence de plusieurs pathogènes. Nos analyses ont révélé que *S. suis* peut lier le plasminogène humain et porcin à sa surface. Cette liaison implique l'interaction des résidus

lysines présents sur cette protéine avec les sites de reconnaissance sur la surface bactérienne. Notre étude a démontré que la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) de *S. suis* possède la capacité de lier le plasminogène. Toutefois, l'utilisation d'un mutant de *S. suis* ne présentant pas de GAPDH à sa surface n'a révélé qu'une faible diminution de la liaison du plasminogène. Cette observation suggère donc que plus d'un type de récepteur serait présent à la surface de *S. suis*. La liaison du plasminogène à la surface de *S. suis* pourrait lui permettre de se camoufler des molécules et des cellules de reconnaissance de l'hôte.

L'activation subséquente du plasminogène en plasmine, une sérine protéase à large spectre d'activité, pourrait contribuer à la migration de *S. suis* jusqu'au système circulatoire où il pourrait atteindre la barrière hématoencéphalique. Chez *S. suis*, la présence d'un activateur de source exogène est essentielle puisque cette bactérie est incapable d'activer par elle-même le plasminogène présent à sa surface. *S. suis* est en mesure d'utiliser l'urokinase sécrétée constitutivement par les cellules endothéliales humaines pour activer le plasminogène lié à sa surface. Non seulement l'hôte peut contribuer à l'activation du plasminogène lié à *S. suis*, mais notre étude a aussi démontré qu'une pseudo-streptokinase produite par *Streptococcus dysgalactiae*, une des espèces bactériennes cohabitant avec *S. suis*, peut également permettre l'activation du plasminogène. Une fois activée, la plasmine pourrait procurer à *S. suis* un avantage supplémentaire lors de l'invasion, comme il a été observé précédemment pour d'autres

pathogènes dont *S. pneumoniae*. Cette activation permettrait possiblement d'augmenter la perméabilité des vaisseaux sanguins et de la barrière hématoencéphalique contribuant à la migration de *S. suis* jusqu'au site de l'infection.

La production de protéases et la capacité d'acquisition d'une activité plasmine sont désormais des éléments à prendre en considération lors de l'établissement d'un modèle d'invasion pour *S. suis*. Des études sont actuellement en cours pour confirmer les rôles pathogéniques de ces facteurs.

Figure 1. Porc infecté à *S. suis* associé à la méningite



Pour plus d'information :

Dr Daniel Grenier

Tél : (418) 656-7341

Courriel : daniel.grenier@greb.ulaval.ca

• Mémoires et Thèses •

- Jobin, M.C. 2005. Étude de deux mécanismes de virulence reliés à la capacité d'invasion tissulaire de *Streptococcus suis* sérotype 2: Production d'activités hydrolytiques et acquisition d'une activité plasmine. Thèse de doctorat. Université Laval, Québec.

• Publications •

- Jobin, M.C., J. Motard, G. Martinez, M. Gottschalk, and D. Grenier. 2005. Cloning and characterization of the dipeptidyl peptidase IV from the swine pathogen *Streptococcus suis*. J. of Bacteriol. **187**: 795-799.
- Jobin, M.C., J. Brassard, S. Quessy, M. Gottschalk, and D. Grenier. 2004. Acquisition of host plasmin activity as a potential virulence factor for the swine pathogen *Streptococcus suis* serotype 2. Infect. Immun. **72**: 606-610.
- Jobin, M.C., and D. Grenier. 2003. Identification and characterization of four proteases produced by *Streptococcus suis*. FEMS Microbiology Letters **220**: 113-119.
- Jobin, M.C., J. Fortin, P.J. Wilson, M. Gottschalk, and D. Grenier. Acquisition of plasmin activity and induction of arachidonic acid release by *Streptococcus suis* in contact with human brain microvascular endothelial cells. (soumis).
- Jobin, M.C., M. Gottschalk, and D. Grenier. Upregulation of prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase 9 production by human macrophage-like cells: synergistic effect of capsular material and cell wall from *Streptococcus suis*. (soumis).
- Melancon D, Grenier D. 2003. Production and properties of bacteriocin-like inhibitory substances from the swine pathogen *Streptococcus suis* serotype 2. Appl. Environ. Microbiol. **69**:4482-4488.

Étude de l'induction des cytokines pro-inflammatoires par des facteurs de virulence connus chez *Streptococcus suis*

Coordonneurs du projet : Dr Martin Olivier, Université McGill • Dr Marcelo Gottschalk, Université de Montréal

• Faits saillants •

- *Streptococcus suis* sérotype 2 échappe à la phagocytose des macrophages en évitant l'activation des voies signalétiques PI-3K/Akt/PKC α qui régulent les fonctions antimicrobiennes
- La capsule de polysaccharide (CPS) est essentielle à la bactérie afin d'éviter la phagocytose déclenchée par des mutants non encapsulés qui ont induit les voies signalétiques conduisant à la phagocytose et à leur destruction
- La modulation de la protéine hôte tyrosine phosphatase (PTP), en l'occurrence la SHP-1, semble jouer un rôle dans ce mécanisme d'inhibition en affectant la phosphorylation de Akt.
- Les résultats obtenus par cette étude permettent de croire que le développement d'une molécule immunomodulatrice pouvant cibler PTP pourrait favoriser l'ingestion et la destruction des bactéries encapsulées.

• Introduction •

Streptococcus suis est l'un des plus important agent pathogène porcin et même zoonotique. Les connaissances portant sur les facteurs de virulence de même que la pathogenèse d'une infection à *S. suis* demeurent limitées. Cependant, étant donné que *S. suis* est une bactérie encapsulée et que la CPS semble avoir des propriétés anti-phagocytaires, on croit que cette capsule est le principal facteur de virulence de

cette bactérie lui permettant de survivre à l'intérieur de son hôte. En effet, il a été rapporté que les souches de *S. suis* déficientes en CPS étaient d'avantage internalisées par les phagocytes murins et porcins. Le but de cette étude a été d'identifier les mécanismes par lesquels *S. suis* pouvait échapper à la phagocytose des macrophages et si la présence de la capsule était un élément clef de l'inhibition de la phagocytose.

Figure 1: *Streptococcus suis*



Matériel et méthodes

La souche virulente et encapsulée *S. suis* de type 2 735-SM et son mutant déficient de la capsule 2A ont été utilisés dans cette étude. Des macrophages murins (BALB/c dérivé de J774.A1) ont servi de cellules hôtes. Durant l'incubation avec différentes souches de *S. suis*, nous avons effectué un suivi de la phagocytose bactérienne, de la survie et de l'activation cellulaire. La modulation des événements qui participent à la régulation de la phagocytose a été suivi par Western blot afin d'identifier le niveau de phosphorylation des kinases étudiées ce qui reflète leur état d'activation (ex: PKC α , Akt et Pi-3K). Des inhibiteurs spécifiques de ces voies signalétiques ont été utilisés pour confirmer leurs rôles au niveau de l'internalisation du mutant non encapsulé 2A. L'identification de potentielles phosphatases répressives a été faite en utilisant des anticorps dirigés contre la phosphatase lipidique PTEN et avec une lignée cellulaire de macrophage dérivée de moelle osseuse déficiente pour la PTP SHP-1.

Notre étude a permis de démontrer que la souche virulente de *S. suis* peut outrepasser la phagocytose en évitant l'induction des voies signalétiques dépendantes des kinases PKC α et Pi-3K/Akt. Nous avons trouvé que la CPS est essentielle pour éviter l'activation de ces kinases qui régulent la phagocytose et que le processus d'activation implique l'induction de molécules régulatrices négatives telle que PTP SHP-1. Une meilleure connaissance sur la façon dont les bactéries encapsulées, dont *S. suis*, peuvent exploiter les voies

signalétiques des cellules et molécules de l'hôte, pourrait mener au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques ayant comme cible la modulation des voies signalétiques de l'hôte et la promotion de la réponse du système immunitaire inné.

Pour plus d'information :

Dr Martin Olivier

Tél.: (514) 398-5592 poste: 398 / 1302

Courriel: martin.olivier@umontreal.ca

• Mémoires et Thèses •

- Segura, M. 2002. Studies on the interactions between *Streptococcus suis* and phagocytic cells. Thèse de doctorat. Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec.
- Vadeboncoeur, N. 2002. Induction de cytokines pro-inflammatoires par des cellules endothéliales stimulées par *Streptococcus suis* serotype 2. M.Sc. Maîtrise. Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec

• Publications •

- Segura, M., M. Gottschalk and M. Olivier. 2004. Encapsulated *Streptococcus suis* inhibits activation of signalling pathways involved in phagocytosis. *Infect. Immun.* **72**: 5322-5330.
- Gottschalk, M. and M. Segura. 2000. The pathogenesis of the infection caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet. Microbiol.* **76**: 259-272.
- Segura, M., N. Vadeboncoeur and M. Gottschalk. 2001. CD14-dependent and -independent cytokine and chemokine production by human THP-1 monocytes stimulated by *Streptococcus suis* capsular type 2. 2001. *Clin. Exp. Immunol.* **127**: 243-254.
- Segura, M. and M. Gottschalk. 2004. Extracellular virulence factors of *Streptococci* associated with animal diseases. *Frontiers in Bioscience* **9**: 1157-1188
- Segura, M., Lacouture, S., Vanier, G., Olivier, M. and M. Gottschalk. Induction of pro-inflammatory cytokines and chemokines by *Streptococcus suis* serotype 2 in a swine whole cell blood model. *FEMS Med Immun.* (sous presse).
- Vadeboncoeur, N., M. Segura, D. Al-Numani, G. Vanier et M. Gottschalk. 2003. Pro-inflammatory cytokine and chemokine release by human brain microvascular endothelial cells stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **35**: 49-58.
- Vanier, G., M. Segura, P. Friedl, S. Lacouture, and M. Gottschalk. 2004. Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by *S. suis* serotype 2. *Infect. Immun.* **72**: 1441-1449.

Développement d'un nouvel outil diagnostique pour caractériser rapidement les isolats d'*Escherichia coli*

Coordonnateurs du projet : Dr Josée Harel, Université de Montréal • Dr Roland Brousseau, Institut de recherche en biotechnologie, CNRC
Dr John M. Fairbrother, Université de Montréal

Collaborateur : Dr Luc Masson, Institut de recherche en biotechnologie, CNRC

• Faits saillants •

- Nous avons développé une micro-puce ayant la capacité de détecter 183 gènes de virulence d'*E. coli* et 30 gènes de résistance aux agents antimicrobiens appartenant aux 6 principales familles d'agents antimicrobiens à Gram négatif.
- Nous avons validé cette micro-puce avec une grande collection de souches d'*E. coli* pathogènes bien connues et caractérisées et avons déterminé sa spécificité en utilisant des souches d'autres espèces bactériennes.
- Nous procédons à des tests afin d'augmenter la sensibilité de notre micro-puce
- La prochaine étape est de développer une micro-puce puissante pour le diagnostic clinique pouvant identifier des bactéries pathogènes d'intérêt vétérinaire, leurs gènes de virulence et leurs gènes de résistance aux agents antimicrobiens.

• Introduction •

Escherichia coli est l'agent causal de plusieurs maladies dans le monde entier. C'est un micro-organisme commun que l'on retrouve tout aussi bien dans l'environnement que dans le tractus intestinal des espèces animales communes, y compris des humains. Les souches d'*E. coli* sont classées dans de nombreux pathotypes distincts basés sur leurs propriétés de virulence et signes cliniques qu'elles causent pendant une infection. Il est important d'établir le contenu génétique codant pour la virulence d'un isolat de *E. coli* afin de déterminer son potentiel pathogène. Nous avons développé un test diagnostique rapide, hautement spécifique et rentable capable de détecter simultanément un grand nombre de gènes de virulence d'*E. coli*. Le développement de cette micro-puce

pour analyser les spécimens cliniques de *E. coli* permettra l'identification rapide de centaines de gènes de virulence sans avoir recours aux méthodes diagnostiques conventionnelles qui sont coûteuses. En outre, le profil génétique des gènes de résistance aux agents antimicrobiens peut également être simultanément assuré. Ces données peuvent fournir des informations épidémiologiques importantes pour dépister la source et la propagation d'une infection particulière tout en donnant de l'information sur les nouveaux pathotypes d'*E. coli* qui apparaissent. De plus, la détection des gènes de résistance aux agents antimicrobiens permettrait de mieux diriger les stratégies de traitement pour les infections dues aux *E. coli*.

Matériel et méthodes

La micro-puce à ADN que notre groupe a développé se compose de 312 oligonucléotides 70-mer qui permettent de détecter la présence ou l'absence de **a)** 183 gènes de virulence de *E. coli* ou leur marqueur de virulence de même que leurs variants et **b)** 30 gènes de résistance appartenant aux 6 principales

classes d'agents antimicrobiens à Gram négatif (Bêta lactames, aminoglycosides, tétracyclines, phénicoles, triméthoprim et les sulfonamides). Ces gènes ont été préalablement caractérisés avec des souches *E. coli* intra-intestinales et extra-intestinales. (Maynard *et al.*, 2003; 2004). De plus, nous y avons inclus d'autres

oligonucléotides spécifiques de gènes d'autres espèces bactériennes telles que *Shigella flexneri* et *Citrobacter freundii*. Nos contrôles négatifs ont été effectués avec un oligonucléotide spécifique à la GFP et un autre oligonucléotide spécifique au gène de la synthétase de chlorophylle d'*Arabidopsis thaliana*.

La réalisation de plusieurs hybridations avec de l'ADN génomique marqué de toutes les souches décrites précédemment, nous a permis de valider notre prototype de micro-puce. Tel qu'attendu, pour toutes les souches d'*E. coli* testées, un signal positif puissant (ratio de l'intensité de la fluorescence plus grand que 2.0) a été observé avec tous les oligonucléotides utilisés comme contrôles positifs. Aucun signal n'est sorti de nos témoins négatifs.

La spécificité des oligonucléotides utilisés sur notre prototype a été validée par l'utilisation d'une collection d'isolats cliniques d'*E. coli* et une grande collection de souches d'*E. coli* pathogènes déjà caractérisées. Dans la majorité des cas, une très bonne corrélation fut observée entre les résultats obtenus avec nos oligonucléotides et ceux obtenus par d'autres techniques moléculaires. Quelques rares différences ont été observées, cependant dans la majeure partie des cas, l'analyse PCR et le séquençage d'ADN ont confirmé les résultats de la micro-puce.

À la lumière de nos résultats, la micro-puce que nous avons produite est un outil de diagnostic convenable pour procéder à la détection chez *E. coli* de nombreux gènes de virulence et gènes de résistance aux agents antimicrobiens. Cette micro-puce est donc un outil moléculaire très puissant pour des études de diagnostic et pour surveiller la résistance aux agents antimicrobiens des souches d'*E. coli*. Il s'avère aussi un instrument précieux pour des études environnementales, épidémiologiques et phylogénétiques. Il devrait faciliter l'identification des nouveaux pathotypes et permettre l'évaluation de la plasticité génomique.

Figure 1. Exemple d'une micro-puce



Les perspectives futures sont a) optimiser les procédures de marquage de l'ADN afin d'augmenter la sensibilité de notre micro-puce et b) développer une nouvelle micro-puce à usage clinique permettant d'identifier les bactéries pathogènes d'intérêt vétérinaire, leurs principaux gènes de virulence ou marqueurs ainsi que leurs gènes de résistance aux agents antimicrobiens. Le développement d'une telle micro-puce permettrait, au cours de la même journée, d'identifier les agents pathogènes et leur résistance aux antibiotiques et procéder à un traitement efficace et rapide.

Pour plus d'information :

Dr Josée Harel

Tél.: (450) 773-8521 poste: 18233

Courriel: josee.harel@umontreal.ca

• Mémoires et Thèses •

- Maynard, C. 2003. Détection des gènes de résistance aux agents antimicrobiens parmi des souches *Escherichia coli* entérotoxigènes et extraintestinales. M.Sc. Maîtrise, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec.

• Publications •

- Bekal, S., R. Brousseau, L. Masson, G. Préfontaine, J.M. Fairbrother, and J. Harel. 2003. Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes through virulence gene detection by DNA microarrays. *J Clin Microbiol* **41**: 2113-25.
- Bruant, G., C. Maynard, S. Bekal, I. Gaucher, L. Masson, R. Brousseau, and J. Harel. 2005. Development and validation of an oligonucleotide microarray for the detection of multiple virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* Soumis.
- Maynard, C, S. Bekal, F. Sanschagrín, R.C. Lévesque, R. Brousseau, L. Masson, S. Larivière and J. Harel. 2004. Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin. *J Clin Microbiol* **42**: 5444-5452.
- Maynard C, J.M. Fairbrother, S. Bekal, F. Sanschagrín, R.C. Levesque, R. Brousseau, L. Masson, S. Lariviere, and J. Harel. 2003. Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrob Agents Chemother.* **47**:3214-3221.
- Maynard, C., F. Berthiaume, K. Lemarchand, J. Harel, P. Payment, P. Bayardelle, L. Masson, and R. Brousseau. 2005. Waterborne Pathogen Detection Using Oligonucleotide-Based Microarrays. *Appl Environ. Microbiol.* **71**(12):8548-57

Brevet

- A DNA microarray for virulence virulence pathotypes in pathogenic *Escherichia coli*. 2001. S. Bekal-Si Ali, R. Brousseau, J. Harel, L. Masson and J.M. Fairbrother. Filling for a provisional patent in the United States. File no:11293-1
- A DNA microarray for antibiotic resistant genes found in bacteria. 2005. M. Arbour, S. Bekal-Si Ali, R. Brousseau, T. Edge, J. Harel, R. Levesques, L. Masson, C. Maynard, G. Préfontaine and F. Sanchagrín. Filling for a provisional patent in the United States. File no: 60/573-885

Identification des gènes d'*Haemophilus parasuis* exprimés de façon différentielle en réponse aux conditions imitant un environnement *in vivo*

Coordonnateurs du projet : Dr Janet MacInnes - Université de Guelph • Dr Josée Harel - Université de Montréal

• Faits saillants •

- Les homologues Fba, PurA, CpdB, LspA, LytB, SodC, une protéine inconnue et une hydrolase appartenant à la famille des HAD sont tous régulés par la restriction en fer.
- PurA, CpdB, SodC, LspA, les homologues LytB du symporteur Na⁺/alanine, FadD, ApaH et une seconde protéine inconnue sont tous régulés par le CSF.
- Les homologues de CySK, FadD, ApaH, PstI, Std, HSPG, PntB sont tous régulés à 40°C en présence et en absence de sérum.
- Tous les gènes régulés différemment sont présents dans tous les sérotypes de *Haemophilus parasuis*, mais nous avons trouvé que l'homologue de l'hydrolase était exprimé seulement chez les souches de *H. parasuis* ayant un potentiel de virulence élevé suggérant ainsi qu'il joue un rôle au niveau de la pathogénèse.

• Introduction •

Haemophilus parasuis est une bactérie omniprésente dans la partie supérieure du tractus respiratoire des porcs. C'est aussi l'agent responsable de la maladie de Glasser. Avec les récents changements des méthodes de production porcine, les maladies causées par *H. parasuis* sont devenues de plus en plus significatives partout dans le monde. Présentement, il n'existe aucun vaccin satisfaisant et la soudaineté de cette maladie rend l'usage d'antibiotiques inutile. À ce jour, plus de 15 sérovars de *H. parasuis* ont été décrits. Cependant, dans certains pays, jusqu'à 25% des isolats ne peuvent être sérotypés. Suite à des études expérimentales et des données épidémiologiques, il a été déterminé que les souches de sérotypes 1, 5, 12, 13 et 14 sont associées aux souches hautement virulentes; les sérotypes 2, 4 et 15 aux souches moyennement virulentes et les sérotypes 3, 6 à 9 et 11 sont, quant à elles, associées aux souches non virulentes. Il y a eu plusieurs tentatives pour isoler le gène de virulence chez *H. parasuis* mais contrairement aux autres bactéries pathogènes, il n'y a pas de toxine évidente ou autre facteur qui permettrait de différencier les *H. parasuis* non pathogènes, de la flore commensale, des souches ayant un potentiel hautement pathogène. Il est donc impossible d'utiliser un test sérologique pour identifier les animaux porteurs de souches à haut potentiel pathogène. Pour répondre à ces questions, nous avons émis l'hypothèse que *H. parasuis* « activerait » ses gènes lorsqu'elle se retrouverait dans les mêmes conditions que lorsque le porc est en phase aiguë de la maladie. Nous serions ainsi capables d'identifier ces gènes par DD RT-PCR.

Matériel et méthodes

Une souche virulente de *H. parasuis* sérotype 5 ATCC1185 a été utilisée pour les études de DD RT-PCR. Les 15 souches KRG de référence ont été analysées pour dépister les gènes exprimés de façon différentielle. Parallèlement, 20 souches soumises pour la production de bactérine, 48 isolats cliniques obtenus de l'Université de Montréal et 45 *H. parasuis* pathogènes provenant d'écouvillons nasaux de porcs soumis à un projet impliquant les troupeaux porcins ontariens ont été analysés pour la présence d'un gène l'homologue à *spdB*. Les souches d'*H. parasuis* ont été mises en culture dans différents milieux de culture: BHI enrichi de NAD et incubé à 37°C

(condition standard), BHI enrichi de NAD avec 40mg d'EDDA dans le but de restreindre le milieu en fer et un milieu CSF collecté post-mortem et en présence de 50% de sérum incubé à 37°C et 40°C. L'ARN a été préparé à partir des *H. parasuis* ayant été mis en culture dans ces différentes conditions. De l'ADNc a ensuite été synthétisé et la présence des différents gènes a été détectée par PCR suite à l'amplification de fragments aléatoires. Les fragments retrouvés parmi les cellules mises en croissance en condition *in vivo* ont été clonés et séquencés. Une analyse avec GenBank a permis d'identifier ces gènes.

Nous avons effectué pour la première fois une étude globale des facteurs de virulences de *H. parasuis*. En répliquant 4 conditions de croissance différentes, telles que celles retrouvées chez le porc lorsqu'il est atteint de la forme aiguë de la maladie de Glasser, nous avons identifié 18 gènes exprimés de façon différentielle. La majorité des gènes sont des gènes de ménage, lesquels sont retrouvés dans plusieurs autres agents pathogènes. Cependant, nous avons trouvé que les homologues de tous ces gènes étaient présents dans les 15 sérovars des souches de référence. Malgré tout, un gène codant pour une hydrolase semble être exprimé que chez les souches ayant un haut potentiel pathogène, ce qui suggère qu'il jouerait peut-être un rôle dans la virulence. Bien qu'une autre étude portant sur un autre gène exprimé de façon différentielle, le gène *cpdB*, révèle des différences au niveau de la taille, ce qui semble corrélérer avec le potentiel pathogène, une analyse d'un second groupe d'échantillons composé de 65 isolats d'origine clinique et de 45 échantillons provenant d'animaux sains a démontré que ce n'était pas toujours le cas.

Pour plus d'information :

Dr Janet MacInnes

Tél.: (519) 824-4120 poste: 54731

Courriel: macinnes@uoguelph.ca

• Mémoires et Thèses •

- Hill, C.E. 2002. Potential virulence factors of *Haemophilus parasuis* identified using differential display RT-PCR. M.Sc. Maîtrise. University of Guelph, Guelph, Ontario
- Metcalf D.S. 2005. Differential gene expression of *Haemophilus parasuis* in response to iron and cerebrospinal fluid. M.Sc. Maîtrise. University of Guelph, Guelph, Ontario

• Publications •

- Hill, C.E., D. S. Metcalf, and J. I. MacInnes. 2003. A search for virulence genes of *Haemophilus parasuis* using differential display RT-PCR. *Vet. Microbiol.* **96**:189-202.
- Metcalf D. S. and J. I. MacInnes. Differential expression of *Haemophilus parasuis* genes in response to iron restriction and cerebrospinal fluid. En preparation



Développement d'un nouveau test sérologique pour le sérotypage des isolats de *Haemophilus parasuis* et la détermination de leur prévalence en Amérique du Nord

Coordonnateurs du projet : Dr Khyali R. Mittal, Université de Montréal • Dr Marcelo Gottschalk, Université de Montréal

• Faits saillants •

- Le test d'hémagglutination indirecte s'est avéré plus spécifique que le test d'immunodiffusion.
- 90% des isolats de terrain peuvent être sérotypés avec le test d'hémagglutination indirecte
- *H. parasuis* sérotype 4 est le plus prévalent en Amérique du Nord
- Le test de coagglutination a été développé afin de détecter les antigènes spécifiques à partir de poumons infectés de porcs morts suite à une infection aiguë.

• Introduction •

La polysérose porcine (maladie de Glasser) causée par *Haemophilus parasuis* est une maladie qui provoque d'importantes pertes économiques puisqu'elle provoque un haut taux de mortalité et de morbidité dans des troupeaux de porcs cliniquement sains ou exempts d'agents pathogènes. *Haemophilus* spp. comprend des bactéries fastidieuses et leur caractérisation a été négligée pendant longtemps. Les récentes épidémies connues en Europe et en Amérique du Nord ont démontré l'importance de *H. parasuis* en tant que pathogène d'importance économique. Plusieurs classifications sérologiques ont été rapportées et des études indépendantes faites en Allemagne et aux États-Unis, toutes deux basées sur le test d'immunodiffusion (ID), suggèrent l'existence de

15 sérovars. Cependant, un nombre considérable d'isolats (30%) demeurent non typables par cette technique et les réactions croisées entre différents sérotypes sont problématiques avec ce test. La caractérisation antigénique de souches prévalentes de *H. parasuis* est essentielle afin de développer des vaccins efficaces et des tests sérodiagnostiques.

Le but de cette étude a été de développer et d'évaluer un test amélioré pour sérotyper *H. parasuis* et de déterminer la prévalence de différents sérotypes à partir d'une collection d'isolats nord américains.

Matériel et méthodes

Les souches de référence des sérotypes 1 à 15 de *H. parasuis* nous ont été fournies par le Dr Ross du ISU, College of Veterinary Medicine, Ames, Iowa et par le Dr Astrid Rabbach du Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Jena, Allemagne. 250 isolats de champ de *H. parasuis* provenant du Canada et 50 isolats de champ provenant des États-Unis, isolés entre 1991 à 2002, ont été évalués.

Des antisérums dirigés contre les 15 souches de référence ont été préparés. Des suspensions de cellules entières combinées à

l'adjuvant incomplet de Freund ont été injectées sous la peau à quatre sites différents. Trois semaines plus tard, une suspension de cellules entières a été injectée par voie intraveineuse à des lapins, suivie de sept doses injectées par voie intraveineuse à raison de deux par semaine. Les lapins ont été saignés 7 jours après la dernière injection.

Afin d'évaluer la spécificité, chez le lapin, de l'antisérum préparé contre la suspension de cellules entières, des tests d'immunodiffusion et d'hémagglutination indirecte ont été effectués avec chaque antisérum. Les résultats de cette analyse avec les antigènes des souches de

référence ont démontré qu'avec les deux tests de sérotypage, l'antisérum de référence était spécifique au sérovar et qu'une faible réaction croisée était observée. Lorsque le test d'immunodiffusion a été utilisé pour sérotyper les isolats provenant du champ, nous avons observé de nombreuses réactions croisées. Avec certains isolats, les réactions croisées étaient trop fortes pour faire la différence entre une réaction sérovar spécifique et une réaction espèce spécifique. De plus, d'autres isolats n'ont tout simplement pas réagi. Plus de 30% des isolats du champ étaient non-typables selon le test d'immunodiffusion.

Distribution (%) des sérotypes de *Haemophilus parasuis* observée à partir d'isolats reçus à la Faculté de médecine vétérinaire entre 1991 et 2002

Sérotypes	1	2	3	4	5	7	9	12	13	14	NT
1991-1999	0	4.4	1.4	48.5	16	6	1.4	0	10.3	3	8.8
2000-2002	2.2	11.5	0.5	25.8	12.1	15.9	0.5	4.9	8.2	3.3	14.8

Dans cette étude, 300 isolats de *H. parasuis* récoltés à partir des voies respiratoires et autres organes d'animaux morts ont été sérotypés par immunodiffusion et hémagglutination indirecte. En tout, plus de 30% des isolats étaient non-typables par immunodiffusion. À l'inverse, plus de 90% des isolats de *H. parasuis*, y compris ceux qui donnaient des réactions croisées avec le test d'immunodiffusion, étaient typables avec le test hémagglutination indirecte. Certains isolats demeurent non-typables quelle que soit la méthode choisie. L'analyse des 250 isolats canadiens a démontré que le sérotype 4 (27% des isolats) était le plus prévalent suivi des sérotypes 5 (15%), 13 (14%), 7 (12%), 2 (8%) et 12 (5%). Au Québec, les sérotypes 4, 5, 7 et 13 étaient les plus prévalents. Des 50 isolats provenant des États-Unis, le sérotype 4 était le plus prévalent (25%) suivi des sérotypes 12 (23%) et 5 (15%). Le sérotypage de *H. parasuis* est important tant pour les études épidémiologiques qu'immunologiques des infections à *H. parasuis*. Différentes préparations antigéniques d'*H. parasuis* sont utilisées dans les différents tests de sérotypage et de sérodiagnostic. La localisation cellulaire des antigènes sérotypes

spécifiques d'*H. parasuis* n'a pas encore été déterminée. Toutefois, certaines études indiquent que ces antigènes seraient peut-être des polysaccharides associés à la capsule ou à des composantes de la membrane extracellulaire.

Cette étude démontre pour la première fois que le test d'immunodiffusion indirecte est une technique très sensible et spécifique pour sérotyper *H. parasuis*. De plus, nous suggérons que cette technique remplace la technique traditionnelle d'immunodiffusion pour le sérotypage des isolats de champ d'*H. parasuis*.

Pour plus d'information :

Dr Khyali R. Mittal

Tél.: (450) 773-8521 ext.: 18296

Courriel: khyali.ram.mittal@umontreal.ca

• Publication •

- Tadjine, M., K.R. Mittal, S. Bourbon, and M. Gottschalk. 2004. Development of a new serological test for serotyping *Haemophilus parasuis* and their isolates and their prevalence in North America. J. Clin. Microbiol. 42:839-40.



Développement d'anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes communs d'*Haemophilus parasuis* pour leur usage en sérodiagnostic

Coordonnateurs du projet : Dr Khyali R. Mittal, Université de Montréal • Dr Marcelo Gottschalk, Université de Montréal

• Faits saillants •

- Deux anticorps monoclonaux ont été identifiés : 4D5 et 4G9
- Les deux anticorps monoclonaux 4D5 et 4G9 ont complètement éliminé *Haemophilus parasuis* du sang ce qui démontre que l'élimination de la bactérie au niveau du sang avec le modèle de la souris, est spécifique aux anticorps.
- L'injection d'anticorps monoclonaux 4G9 protège les souris contre une infection à *H. parasuis*.

• Introduction •

Haemophilus parasuis a récemment refait surface en tant qu'une des principales causes de mortalité dans les pouponnières porcines. Cette bactérie peut également causer la maladie lorsqu'elle est introduite dans des troupeaux sains (Oliveira *et al.*, 2002). Les facteurs responsables de la recrudescence de l'incidence des infections à *H. parasuis* dans les pouponnières demeurent nébuleux. Le but de cette étude était de produire et de caractériser des anticorps monoclonaux contre les « heat-modifiable » OMP et les épitopes lipopolysaccharidiques de *H. parasuis* et enfin d'étudier leurs potentiels effets protecteurs contre une infection à *H. parasuis* chez la souris.

Matériel et méthodes

Les souches de références des sérotypes 1 à 15 d'*H. parasuis* nous ont été fournis par le Dr Ross de ISU, College of Veterinary Medicine, Ames, Iowa et par le Dr Astrid Rabbach du Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Jena, Allemagne.

moins de 21 souches d'autres espèces bactériennes ont également été utilisées pour des études de spécificité. De plus, 500 souches d'*H. parasuis* isolées de cas cliniques en Amérique du Nord, représentant plusieurs sérotypes, ont été testées avec 2 anticorps monoclonaux.

Procédure d'immunisation et production d'anticorps

Quatre souris femelles BALB/c âgées de 6 semaines ont été immunisées par voie intra-péritonéale avec une suspension de cellules entières d'*H. parasuis* SW124 mélangée à l'adjuvant incomplet de Freund (Difco). Ensuite, nous avons réalisé trois autres injections, par voie intra-péritonéale, d'une suspension de cellules, aux jours 14, 21 et 28. Du sang a été prélevé de chacune des souris et la réponse en anticorps a été mesurée par ELISA. La souris ayant le plus haut titre d'anticorps a été sélectionnée comme donneuse de rate et a reçu une injection supplémentaire par voie intra-péritonéale d'une culture de cellules entières d'*H. parasuis* 3 jours avant la fusion.

Épreuve de protection et d'élimination de la bactérie

Les épreuves de protection et d'élimination de la bactérie ont été effectuées avec le modèle de souris BALB/c. Pour l'épreuve de protection, nous avons utilisé une culture d'*H. parasuis* mise en croissance pendant une nuit. Six groupes de souris mâles âgés de 6 semaines ont été injectés par voie intra-péritonéale avec une suspension de la culture bactérienne mélangée soit avec de

l'antisérum polyclonal de lapin ou du fluide ascitique possédant l'un des deux anticorps monoclonaux. Les souris ont été observées pendant 7 jours pour vérifier la mortalité.

Pour l'épreuve d'élimination bactérienne, nous avons injecté aux souris par voie intra-péritonéale une culture d'*H. parasuis*, ayant été mise en culture pendant une nuit. Nous

avons prélevé des échantillons sanguins à différents temps et compté le nombre de bactéries vivantes. Ensuite, les souris ont été euthanasiées et des biopsies ont été prélevées à partir des poumons, du foie, du cœur et de la rate afin de déterminer le nombre total de bactéries par gramme de tissus.

Production d'anticorps monoclonaux

Un total de 65 hybridomes a été testé par ELISA. Deux de ces hybridomes, 4D5 et 4G9, ont montré une réaction positive avec l'ELISA et ont donc été sélectionnés pour être davantage caractérisés. Les anticorps monoclonaux (MAb) 4D5 et 4G9 appartiennent respectivement aux classes d'immunoglobulines IgG2b et IgG33. Des analyses par Western Blot de ces anticorps ont montré que 4D5 possède une masse moléculaire d'environ 35 kDa alors que 4G9 possède une masse moléculaire plus faible. Les deux anticorps monoclonaux reconnaissent des épitopes communs, partagés les souches de références des sérotypes 1 à 15 d'*H. parasuis*.

Résultats et discussion

Épreuve de protection et d'élimination de *H. parasuis*

Deux heures après l'injection, les anticorps monoclonaux 4D5 et 4G9 avaient complètement éliminé *H. parasuis* du sang alors que des bactéries pouvaient être détectées dans le sang des souris ayant été injectées avec *H. parasuis* mélangé au PBS ou au sérum normal. Ceci indique que l'élimination bactérienne est spécifique aux anticorps monoclonaux.

Tableau 1. Activité protectrice des anticorps polyclonaux de lapin et des anticorps monoclonaux 4G9 et 4D5 chez la souris contre une infection avec une souche *H. parasuis*.

Quantité de bactérie injectée (c.u.f./ml)	Substance injectée	Nombre de souris mortes / nombre de souris inoculées	Protection (%)
10 ⁹	Antisérum de lapin	1/6	83
10 ⁹	MAb 4G9	0/6	100
10 ⁹	MAb 4D5	4/6	33
10 ⁹	PBS	6/6	0
10 ⁹	Sérum normal	6/6	0

Les résultats obtenus lors de l'épreuve de protection ont démontré que toutes les souris du groupe contrôle négatif et du groupe injecté avec l'anticorps monoclonal 4D5 démontraient des signes sérieux de maladie ou mouraient. Aucune des souris du groupe ayant été injectées avec l'anticorps monoclonal 4G9 ne sont décédées. *H. parasuis* n'a été retrouvée ni au niveau du foie, de la rate, du cœur et des poumons des souris, retrouvées mortes ou encore euthanasiées 7 jours après l'infection, provenant des deux groupes (traité et non traité avec les anticorps monoclonaux). Cependant, le test de coagglutination a révélé la présence d'un antigène spécifique dans les tissus des souris ayant été infectées avec *H. parasuis* mélangée au PBS ou au sérum normal. Cet antigène n'a pas été détecté dans les tissus des souris ayant été traitées avec les anticorps monoclonaux 4D5 et 4G9.

En conclusion, deux anticorps monoclonaux ont été produits et caractérisés. L'anticorps monoclonal 4D5 reconnaît une protéine extra-membranaire, sensible à la chaleur, de *H. parasuis* et l'anticorps monoclonal 4G9 reconnaît un épitope de nature lipopolysaccharidique. La détection, dans les sérums de porc infectés naturellement par *H. parasuis*, d'anticorps spécifiques de la protéine OmpA et d'un lipopolysaccharide suggère que ces antigènes pourraient jouer un rôle au niveau de la pathogenèse. Les anticorps monoclonaux dirigés contre OmpA et les épitopes lipopolysaccharidiques sont impliqués dans la protection des souris contre des infections à dose létale d'*H. parasuis*.

Pour plus d'information :

Dr Khyali R. Mittal

Tél.: (450) 773-8521 ext.: 18296

Courriel: khyali.ram.mittal@umontreal.ca

• Mémoires et Thèses •

- Tadjine, Mimi. 2004. Caractérisation antigénique et génétique de *Haemophilus parasuis* et l'implication des anticorps monoclonaux produits contre OmpA et LPS dans la protection. Thèse de doctorat. Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec

• Publication •

- Tadjine M, Mittal, K.R., Bourdon S, Gottschalk, M. 2004. Production and characterization of murine monoclonal antibodies against *Haemophilus parasuis* and study of their protective role in mice. Microbiology. 150:3935-45.

Évaluation de l'immunité chez le porc en utilisant des vaccins à base d'ADN codant pour les sous unités fimbriaires F4 de *Escherichia coli*

Coordonnateurs du projet : Dr Philip J. Willson, Vaccine and Infectious Diseases Organization (VIDO)
Dr Jeffrey P. Lewis, Université de l'Île-du-Prince-Édouard
Dr Marcelo Gottschalk, Université de Montréal

Collaborateur : Dr Volker Gerdt, Vaccine and Infectious Diseases Organization (VIDO)

• Faits saillants •

- La diarrhée en période de post-sevrage chez le porc est causée par les *E. coli* ETEC (sérotypage O149:K91:F4ac) qui possède un antigène bactérien F4.
- Les porcs ayant le récepteur intestinal F4 réagissent à l'antigène protéique F4, indépendamment des plaques de Peyer.
- Les plasmides codant pour le fimbriae F4 (construits par *Recursive PCR*).
- L'efficacité du vaccin à ADN et protéique a été testée chez le porc

• Introduction •

Les *Escherichia coli* entérotoxigènes (ETEC) qui expriment le fimbriae F4 (composé de la sous-unité FaeG) causent la diarrhée chez les porcs sevrés. Le fimbriae F4 permet à *E. coli* de se lier aux récepteurs intestinaux F4R de porcs situés sur les cellules épithéliales intestinales. Seuls les porcs qui possèdent ces récepteurs sur leur muqueuse intestinale développent une diarrhée et une réponse immunitaire contre F4. La présence du récepteur F4R est identifiée de façon génétique et les porcs positifs sont identifiés par un test d'adhésion des *E. coli* F4 positifs aux villosités intestinales. L'induction d'une réponse immunitaire par les récepteurs

intestinaux est plutôt rare. Par conséquent, au lieu de prendre les plaques de Peyer comme cible pour le vaccin mucosal, on peut cibler l'épithélium intestinal. Dans un premier temps, nous avons étudié l'induction de la réponse immunitaire contre F4 en présence et en l'absence des plaques de Peyer. Ensuite, nous avons créé des plasmides qui codent pour la sous-unité FaeG en utilisant des codons sélectionnés pour leur expression par les ribosomes porcins. Les analyses d'expression *in vitro* ont démontré que l'expression de FaeG, dans les fibroblastes transfectés avec les plasmides qui possèdent une version codon optimisé FaeG, a augmenté

d'un facteur 40. Les tables d'utilisation des codons sont sensiblement les mêmes pour le porc et la souris. Nous avons donc réalisé des essais de vaccination avec des souris. Nous avons procédé à la vaccination intramusculaire de souris femelles C3H/HeN avec le plasmide possédant le codon optimisé. Cet essai a donné une réponse d'anticorps plus rapide et plus forte. D'autre part, nous avons procédé à l'immunisation de souris avec le codon contrôle. Les souris immunisées par voie sous-cutanée avec la protéine F4 ont démontré la meilleure réponse immunitaire. Par la suite, nous avons procédé à des essais d'immunisation chez le porc.

Matériel et méthodes

Essais de vaccination avec les porcelets

Trente porcelets provenant de troupeaux exempts de diarrhée colibacillaire ont été sevrés à 3 semaines d'âge et ont reçu un des quatre traitements d'immunisation suivants: contrôle, immunisation orale avec la protéine F4, immunisation intramusculaire avec la protéine F4 ou immunisation à base d'ADN. Les porcs ont été immunisés deux fois (à intervalle de trois semaines) et une semaine après la dernière immunisation, le sérum a été récolté. Les porcs ont ensuite été infectés par voie orale avec 5×10^{10} UFC d'ETEC. Des anticorps contre F4 ont été détectés par ELISA. La température corporelle, le poids, la sévérité de la diarrhée et la quantité d'ETEC retrouvés dans les matières fécales ont été suivis sur une période de 7 jours. À la fin de l'expérience, les porcs ont été euthanasiés et une partie du jéjunum a été prélevée pour y rechercher la présence du récepteur F4R.

Il n'y a eu aucune réaction défavorable attribuable au processus d'immunisation. Tel qu'observé dans le Tableau 1, au moment de l'infection, chaque groupe immunisé a développé une réponse sérologique à F4 plus forte que celle observée dans le contrôle.

Tableau 1

Groupe	Réponse sérologique à F4
Contrôle	0.2759
Protéine	1.8127
ADN	1.4252
Orale	1.5007

Bien que tous les groupes immunisés aient développé une réponse immunitaire, seul le groupe ayant été immunisé 2 fois par voie intramusculaire avec le vaccin contenant la protéine F4 a développé un titre sérique plus haut que chez les animaux contrôles. Suite aux infections avec des ETEC, deux porcs du groupe contrôle sont morts alors que dans les groupes immunisés, aucune mortalité n'a été rapportée ($p=0,05$). Il n'y a aucune association apparente entre le fait que les porcs aient été immunisés et leur température corporelle, leur poids, la sévérité de la diarrhée et la quantité d'ETEC retrouvés dans les matières fécales.

L'expression du récepteur F4R a été déterminée à partir d'échantillons prélevés à la fin de l'expérience. Le récepteur F4R a été détecté chez 19 des 23 porcs (73%). Des analyses ont démontré une association entre le récepteur F4R et la diarrhée. Aucune association notable n'a été observée pour la température corporelle, le gain de poids et la quantité de ETEC retrouvés dans les matières fécales. Nos travaux démontrent que l'expression du récepteur F4R par les porcelets s'associe avec la sévérité de la diarrhée suite à une infection expérimentale avec ETEC. De plus, l'immunisation avec le vaccin à ADN a

induit des réponses sérologiques notables. Selon nos résultats, l'immunisation à ADN peut conférer une protection contre les ETEC. Cependant, aucun des vaccins testés n'a apporté un impact significatif pour les autres signes cliniques de la maladie ou encore sur la dispersion de ETEC.

Pour plus d'information :

Dr Philip J. Willson

Tél.: (306) 966-7480

Courriel: philip.willson@usask.ca

• Mémoires et Thèses •

- Park, A.P. 2005. The development of a codon-optimized DNA vaccine for enterotoxigenic *E. coli* in swine. M.Sc. Maîtrise. University of Prince Edward Island, Charlottetown, Prince Edward Island.
- Alcón, V. L. 2004. Evaluation of Lipid-based Delivery Systems for Induction of Mucosal and Systemic Immune Responses: Effect of CpG Motifs. Thèse de Doctorat. University of Saskatchewan, Saskatoon.

• Publication •

- Alcón, V.L., Vega-López M. A., Baca-Estrada M. E., Willson P. J., Babiuk L.A., Hecker R. and Foldvari, M. 2005. Mucosal delivery in pigs of bacterial antigens and CpG oligodeoxynucleotides formulated in biphasic lipid vesicles. *AAPS J.* **14**;7(3):E566-71.
- Alcón VL, Baca-Estrada M, Vega-Lopez MA, Willson P, Babiuk LA, Kumar P, Foldvari M. 2005. Intranasal immunization using biphasic lipid vesicles as delivery systems for OmlA bacterial protein antigen and CpG oligonucleotides adjuvant in a mouse model. *J Pharm Pharmacol.* **57**(8):955-62.
- Alcón, V.L., M. Foldvari, M, Snider, P. Willson, S. Gomis, R. Hecker, L. A. Babiuk, M. E. Baca-Estrada. 2003. Induction of protective immunity in pigs after immunization with CpG oligodeoxynucleotides formulated in a lipid-based delivery system (Biphax™). *Vaccine.* **21**:1811-1814.





Université 
de Montréal

CONFÉRENCES & PRÉSENTATIONS

- Alcón, V., Vega-López, M.A., Willson, P.J., Susantha, G., Hecker, R., Foldvari, M., Baca-Estrada, M.E. Combination of CpG-DNA and Biphaxis™ -Vaccine Targeting Adjuvant (VTA-2) promotes strong systemic and mucosal immune responses after subcutaneous and intranasal immunization in a swine model. 11th International Congress of Mucosal Immunology, The Society for Mucosal Immunology (SMI), Orlando, Florida, USA. June 16-20, 2002.
- Alcon V, Snider M, Vega-Lopez MA, Willson PJ., Gomis S, Hecker R, Foldvari M, Baca-Estrada ME. Immunoadjuvant effect of CpG-DNA and a novel lipid-based delivery system in pigs. 2nd Annual General Meeting Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine, June 5-7, 2002 Guelph, ON.
- Al-Numani, D., M. Segura, M. Doré, M. Gottschalk. Interaction of *Streptococcus suis* serotype 2 with human THP-1 monocytes and endothelial cells. 51st Annual Meeting of the Canadian Society of Microbiologists (CSM), University of Waterloo, Waterloo (Ontario), June 10-13, 2001.
- Amezcua, R., Gyles, C., Dewey C., Friendship R. Prevalence of O149:K88 related to post-weaning diarrhea in Ontario. 2003 Ontario Swine Research Review (<http://www.gov.on.ca/OMAFRA>).
- Bahrami, F., Ekins, A., and Niven, D.F. Acquisition of transferrin-bound iron by *Actinobacillus suis*. 2nd Annual General Meeting of the Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine. Ontario Veterinary College, University of Guelph, Guelph, Ontario. June 2002.
- Bekal S., R. Brousseau, L. Masson, J. M. Fairbrother and J. Harel. Microarrays approach for detection and identification of *E. coli* pathotypes. 2nd Annual meeting of the Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine. University of Guelph, Guelph (Ontario), June 5-7, 2002.
- Bekal, S., R. Brousseau, J. Harel. DNA chips on virulence factors of *E. coli*. Faculté de Médecine Vétérinaire. Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Quebec. December 20, 2001
- Bekal, S., J. Harel, R. Brousseau, G. Préfontaine and L. Masson. Practical considerations on the use of DNA microarrays for detection of virulence factors in *Escherichia coli*. 51st Annual Meeting of the Canadian Society of Microbiologists (CSM), University of Waterloo, Waterloo (Ontario). June 10-13, 2001.
- Berthiaume, F., V. Labrie, C. Martin, E. B. Newman and J. Harel. Influence of L-alanine and L-leucine on Lrp regulation of *foo* coding for F165₁, a Pap homologue. 102nd General Meeting of the American Society for Microbiology, Salt Lake City, Utah, USA. May 2002.
- Berthiaume, F., V. Labrie, C. Martin, E. B. Newman, and J. Harel. Role of aliphatic amino acids during the interaction of Lrp (Leucine responsive protein) with the regulatory region of *foo* operon. 2nd Annual General Meeting of the Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine, Ontario Veterinary College, University of Guelph, Guelph, Ontario. June 5-7, 2002.
- Bertiaume, F., V. Labrie, C. Martin, E.B. Newman and J. Harel. The study of the role of some amino acids during the interaction of Lrp (Leucine responsive protein) with the regulatory region of *foo* operon that encoded for F165₁. 52nd Meeting of the Canadian Society of Microbiologists, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan. June 2002.
- Brassard, J., M. Gottschalk, S. Quessy. Clonage et purification de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase de *Streptococcus suis* sérotype 2. 2^e Colloque international francophone de bactériologie vétérinaire, ISPAIA, Ploufragan, France, 5-6 septembre 2002.
- Brousseau, R. Applications of DNA microarrays for pathogen detection and characterization. Montreal microarray workshop 1st edition. Biotechnology Research Institute, National Research Council of Canada, Montreal, Quebec. September 2001.
- Brooks, A.S., Delay, J., McPhee, M., Kodali, R., Hayes, M.A. Characterization of porcine plasma ficolins that bind to surfaces of *Actinobacillus pleuropneumoniae* O5. Can Fed Biol Soc. Ottawa, May 2001.
- Brooks, A.S., DeLay, J., Hammermueller, J., Hayes, M.A. Characterization of Ficolin ? in Porcine Neutrophils. Poster presented at Graduate Student meeting, Ontario Veterinary College, University of Guelph, Guelph, Ontario. November 2002
- Brooks, A.S., DeLay, J., Lillie, B.N., Hammermueller, J., Hayes, M.A. Comparison of porcine neutrophil ficolins with plasma forms that bind *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. 2nd Annual General Meeting of the Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine, Ontario Veterinary College, University of Guelph, Guelph, Ontario. June 5-7, 2002.
- Brooks, A.S., DeLay, J., Hammermueller, J., Hayes, M.A. Ficolin ? is produced and secreted by porcine neutrophils. Experimental Biology Meeting, San Diego April 2003.
- Brooks, A.S., Delay, J., Hammermueller, J., Lillie, B.N., Hayes, M.A. Ficolin ? is produced and secreted by porcine neutrophils. 3rd Annual General Meeting of the Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine. Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, May 2003.
- Bruant, G., C. Maynard, R. Brousseau, L. Masson, and J. Harel. Development of an oligonucleotide microarray for the detection of virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli*. Conference of Research Workers in Animal Diseases Annual Meeting (CRWAD). November 14-16, 2004, Chicago, Illinois, USA (poster).
- Bruant, G., C. Maynard, C. Sotomey, S. Bekal, L. Masson, R. Brousseau, and J. Harel. Development of an oligonucleotide microarray to detect antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli*. 4th Annual General Meeting of the Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine. June 8-10, 2004, University of Guelph, Guelph, Canada (oral communication).
- Bruant, G. Caractérisation des gènes fimbriaux de souches génitales d'*Haemophilus* (sujet de Ph.D.) Développement d'une biopuce à ADN pour la détection de gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques chez *Escherichia coli* (sujet de postdoctorat). Présentation pour le Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP). 14 octobre 2004, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Canada (oral communication).
- Cardinal, F., S. D'Allaire and J.M. Fairbrother. Feed composition in herds with or without postweaning *Escherichia coli* diarrhoea in early-weaned piglets. Meeting on Perspectives in Pig Science. University of Nottingham, Loughborough, UK, September 10-13, 2002.
- Chabot-Roy, G., S. Lacouture, M. Segura and M. Gottschalk. Killing of *Streptococcus suis* serotype 2 by porcine neutrophils. 85th Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Diseases (CRWAD), Chicago, Illinois, November 14-16, 2004.
- Chernysheva, L., Friendship R., Gyles C. 2002. Does feeding of specific egg antibodies control post-weaning *E. coli* diarrhea? Proc. Amer. Assoc. Swine Vet., Kansas City, pp. 315-317.
- Cleave, J., Gordon, J.R., Willson, P.J. Impact of Inhaled Swine Barn Dust on Airway Hyperactivity and Inflammation. Future of Rural Peoples: Rural Economy, Healthy People, Environment, Rural Communities. Fifth International Symposium: October 19-23, 2003 Saskatoon, Saskatchewan, Oral Presentation #245.
- Cleave, J., Willson P.J., Kirychuk SP, Chenard L, Lemay SP. Distribution of dust, endotoxin and DNA after oil sprinkling in a swine facility. Canadian Society of Animal Science Annual Meeting, June 10-13, 2003, Saskatoon, SK.
- Cloutier, G., G. Martinez, S. D'Allaire, C. Surprenant et M. Gottschalk. Variabilité génétique et transmission de souches de *Streptococcus suis* serotype 5 au sein d'un troupeau. 2^e Colloque international francophone de bactériologie vétérinaire, ISPAIA, Ploufragan, France, 5-6 septembre 2002.
- D'Amours, B., D. Al-Numani, S. Lacouture, G. Vanier, M. Segura and M. Gottschalk. Induction of inflammatory cytokines and chemokines by *Streptococcus suis* in a porcine whole-blood model of infection. 53rd Annual General Meeting of the Canadian Society of Microbiologists (CSM), Ville de Laval, May 25-28, 2003.
- Desabrais, J.A., M.-C. Tessier, C. Martin, J. Harel et M. Drolet. DNA supercoiling and topoisomerases in F165₁ fimbriae expression in the pathogenic *Escherichia coli* 4787 strain. 102nd General Meeting of the American Society for Microbiology, Salt Lake City, Utah, USA. May 2002.
- Desabrais, J.A., M.-C. Tessier, C. Martin, J. Harel et M. Drolet. The effect of divergent transcription on F165₁ fimbriae gene expression. 2nd Annual General Meeting of the Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine, Ontario Veterinary College, University of Guelph, Guelph, Ontario. June 5-7, 2002.

- Esgleas, M., S. Lacouture, M. Gottschalk. Binding of *Streptococcus suis* serotype 2 to extracellular matrix proteins. 84th Conference of Research Workers in Animal Diseases (CRWAD), Chicago, Novembre 2003.
- Fairbrother, J.M., R. Higgins, C. Desautels. Trends in pathotypes and antimicrobial resistance of *E. coli* isolates from weaned piglets. 16th International Pig Veterinary Society Congress. Melbourne, Australia, September 2000.
- Fairbrother, J.M. Actualités sur les *E. coli* du porcelet. Association des vétérinaires en industries animale du Québec (AVIA) ; Après-midi conférences. Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada. April 18, 2002.
- Fittipaldi, N.V., A. Broes, J. Harel, M. Kobisch, et M. Gottschalk. Détection d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* par la méthode PCR : évaluation de différentes épreuves sur les amygdales contaminées expérimentalement. 2^e Colloque international francophone de bactériologie vétérinaire, ISPAIA, Ploufragan, France, 5-6 septembre 2002.
- Fittipaldi, N.V., A. Broes, M. Gottschalk. Recent development on *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarian. Orlando, Florida, USA. March 8-11, 2003.
- Fittipaldi, N., A. Broes, J. Harel, M. Kobisch and M. Gottschalk. « Comparaison et validation sur le terrain d'épreuves PCR pour la détection d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* chez le porc porteur sain » Journée de la Recherche. Faculté de Médecine Vétérinaire Université de Montréal. Saint-Hyacinthe, Québec, Canada. November 2003.
- Fittipaldi, N., A. Broes, J. Harel, M. Kobisch and M. Gottschalk. Comparison and field validation of PCR tests for the detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in carrier pigs. 53rd Annual General Meeting of the Canadian Society of Microbiologists (CSM), Ville de Laval, May 25-28, 2003.
- Fittipaldi, N., B. D'Amours, S. Lacouture, M. Kobisch, M. Gottschalk, J. Harel. *Streptococcus suis* are mutants deficient in capsule and aromatic amino acids biosynthesis. American Society for Microbiology (ASM), New Orleans, May 23-27, 2004.
- Fontaine, F., S. Peres, C. L. Gyles, and J. M. Fairbrother. Trends in O149:K91 enterotoxigenic *Escherichia coli* from pigs in Quebec. 17th International Pig Veterinary Society Congress, Ames, Iowa, USA. June 2-5, 2002.
- Fortin, C., M. Drolet. Sensitivity of *topA* null mutants to low temperature. Keystone Symposia on Bacterial chromosome. Santa Fe, New Mexico, USA. February 7-13, 2001.
- Friendship, R.M., Dewey CE, Amezcua R, Chernysheva L, Gyles C. Failure of non antibiotic treatments for the control of post-weaning *E. coli* diarrhea. Oral presentation. 17th International Pig Veterinary Society Congress, Ames, IA. June 2-5, 2002.
- Graveline, R., M. Segura and M. Gottschalk. Toll-like receptor 2 (TLR2) and CD14, but not TLR4, are involved in the activation of human monocytes by *Streptococcus suis* serotype 2. 85th Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Diseases (CRWAD), Chicago, Illinois, November 14-16, 2004.
- Gottschalk, M. Actualité sur *A. pleuropneumoniae*. Association des vétérinaires en industries animale du Québec (AVIA) ; Après-midi conférences. Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada. April 18, 2002.
- Gottschalk, M., M. Segura, D. Al-Numani and N. Vadeboncoeur. Studies on the pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*. XV Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases, Taj Exotica, Goa, India, October 6-11, 2002.
- Gyles, C.L., Friendship, R.M., K. Ziebell, S. Johnson, I. Yong, R. Amezcua. *Escherichia coli* O157:H7 in pigs. 17th International Pig Veterinary Society Congress, Ames, Iowa, USA. June 2-5, 2002.
- Gyles, C.L., R. Friendship, K. Ziebell. O157. *E. coli* in pigs. 2003 Ontario Swine Research Review (<http://www.gov.on.ca/OMAFRA>).
- Harel, J., D. Tremblay. The diagnostic at the Faculté de Médecine Vétérinaire of l'Université de Montréal. Centre québécois de valorisation des biotechnologies. Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec. April 2001.
- Harel, J. Molecular diagnostic. First Annual General Meeting of The Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine, Waterloo, Ontario (Canada). June 14, 2001.
- Harel, J., Y. Li, M. Jacques, D. Dubreuil, M. Gottschalk. Identification et caractérisation de *Streptococcus suis* codant pour des protéines au potentiel vaccinal. 72^e congrès de l'ACFAS à l'UQAM. Montréal. 2004.
- Harel, J. Y. Li, G. Martinez, S. Lacouture, P. Willson, J.D. Dubreuil, M. Jacques and M. Gottschalk. Identification of a novel surface protein of *Streptococcus suis* and evaluation of its immunogenic and protective capacity in pigs. 2005 Meeting of the International Union of Microbiological Societies. San Francisco, CA. July 23-28, 2005.
- Harper, V. L, M. Gottschalk, and J. I. MacInnes. Identification of new virulence genes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* by differential display RT-PCR. International Pasteurellaceae Society Conference. Banff National Park, Alberta, Canada. May 4-11, 2002.
- Hill, C. E. and J. I. MacInnes. Differential display-RT PCR studies of *Haemophilus parasuis*. International Pasteurellaceae Society Conference. Banff National Park, Alberta, Canada. May 4-11, 2002.
- Hill, C.E., J. I. MacInnes. Identification of differentially expressed genes of *Haemophilus parasuis* using DDRT-PCR. 83rd Annual Meeting of Conference of Research Workers in Animal Diseases. St. Louis, November 10-12, 2002.
- Hill, C. E. and J. I. MacInnes. Differential gene expression in *Haemophilus parasuis*. 82nd Annual Meeting of Conference of Research Workers in Animal Diseases. St. Louis, Nov. 11 to 13, 2001.
- Hraiky, C., J. Demers, M. Drolet. Role of topoisomerase I and RNase H in transcription elongation in *Escherichia coli*. RNase H meeting, Seattle, USA. September 2000.
- Hraiky, C., J. Demers, M. Drolet. Role of topoisomerase I and DNA supercoiling in transcription elongation in *Escherichia coli*. The tenth meeting on Post-Initiation Activities of RNA Polymerases, Virginia, USA. October 2000.
- Harel, J., M. Jacques, J.D. Dubreuil, M. Gottschalk et Y. Li. 2004. Identification et caractérisation de gènes de *Streptococcus* codant pour des protéines au potentiel vaccinal. 72^e Congrès de l'ACFAS. 12-14 mai 2004.
- Jacques, M., S. Messier, M. Gottschalk, J. Harel, J.M. Fairbrother, The diagnostic laboratory at the Faculté de médecine vétérinaire of l'Université de Montréal. Organized by Boehringer Mannheim Canada. Saint-Hyacinthe, Faculty of Veterinary Medicine. October 2, 2001.
- Jacques, M. Le Réseau canadien de recherche sur les bactéries pathogènes du porc. Association des vétérinaires en industries animale du Québec (AVIA); Après-midi conférences. Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada. April 18, 2002.
- Jacques, M., M Archambault, J. Labrie et L. Mikael. Nouveaux systèmes d'acquisition du fer chez *Actinobacillus pleuropneumoniae*. 2^e Colloque international francophone de bactériologie vétérinaire, ISPAIA, Ploufragan, France, 5-6 septembre 2002.
- Jacques, M., J. Labrie, M.A. Paradis, P.C. Dick, C. Klopfenstein, A. Broes, N. Fittipaldi, and M. Gottschalk. Isolation of an atypical strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 with a deep-rough LPS profile. IPVS meeting, Hamburg, July 2004.
- Jamalludeen, N., J. Harel, J. Fairbrother, R. Johnson, C. Gyles. 2004. Isolation and characterization of phages that are active against O149 porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. Poster Abstract. ASM Conference on The New Phage Biology, Key Biscane, FL. August 1-5.
- Jobin, M.-C., M. Gottschalk, D. Grenier. Mise en évidence des activités protéolytiques chez *Streptococcus suis*. 70^e Congrès de l'Acfas, Université Laval, Ste-Foy, Québec, Canada. May 13-17, 2002.
- Jobin, M.-C., G. Martinez, J. Motard, M. Gottschalk and D. Grenier. Molecular cloning and characterization of *Streptococcus suis* dipeptidyl peptidase IV. American Society for Microbiology, New Orleans, May 23-27, 2004.
- Khamessan, A, J.W. Coulton, B. Gibbs and R. Masse. Identification of a TonB-dependent receptor. American Society of Mass Spectroscopy meeting in Chicago, May 2001.
- Magdalena Kozrzynska, Dion Lepp, Roger Wheatcroft, Sadjia Bekal, Josée Harel, Roland Brousseau. Molecular studies of interactions between probiotics and *E. coli* O157:H7. Federal Food Safety and Nutrition Meeting, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada. October 5-7, 2003.
- Li, Y., Harel, J., and Gottschalk, M. Identification of *Streptococcus suis* serotype 2 surface proteins. VRQ meeting. FMV. Saint-Hyacinthe, Québec, Canada. October 9, 2003.
- Y. Li, M. Gottschalk, J. Harel. Identification of *Streptococcus suis* serotype 2 surface proteins. 4th Annual general meeting of the Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine. June 8-10, 2004. Guelph, Ontario.

- Li, Y., M. Gottschalk, J.D. Dubreuil, M. Jacques and J. Harel. Identification and characterization of a gene encoding a *Streptococcus suis* capsular type 2: potential protective protein. 7th International Veterinary Immunology Symposium (IVIS), Québec, Québec. July 25-30, 2004.
- Li, Y., Harel, J., and Gottschalk, M. Identification of *Streptococcus suis* serotype 2 surface proteins. VRQ meeting. FMV. Saint-Hyacinthe, Québec, Canada. November 2004.
- Lillie, B.N., Brooks, A.S., Slavic, D., MacInnes, J.I., Hayes, M.A. Characterization of a pig plasma protein lectin that binds the surface of *Actinobacillus suis*. 2nd Annual General Meeting of the Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine, Ontario Veterinary College, University of Guelph, Guelph, Ontario. June 5-7, 2002.
- Lillie, B.N., Brooks, A.S., DeLay, J., Hammermueller, J., MacInnes, J.I., Jacques, M., Hayes, M.A. Identification of a form of porcine mannan-binding lectin that binds to the surface of *Actinobacillus suis*. Poster presented at Graduate Student meeting, Ontario Veterinary College, University of Guelph, Guelph, Ontario. November 2002.
- Lillie, B.N., Brooks, A.S., DeLay, J., Hammermueller, J., MacInnes, J.I., Jacques, M., Hayes, M.A. Bacterial surface binding collagenous lectins in porcine plasma. 3rd Annual General Meeting of the Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, May 2003.
- Lillie, B.N., A.S. Brooks, J. D. Hammermueller, J. I. MacInnes, M. Jacques, and M. A. Hayes. 2003. Bacterial surface binding collagenous lectins in porcine plasma. Exp. Bio. 2003 San Diego (Abstract 408.6).
- Lillie, B.N., D. Slavic, J.D. Hammermueller, J.I. MacInnes, M. Jacques & M.A. Hayes. Characterization of a mannan-binding lectin in porcine plasma that selectively binds *Actinobacillus suis*. 7th International Veterinary Immunology Symposium, Quebec City, July 25th to 30th 2004.
- Lun, S.-C., J. Perez-Casal and P.J. Willson. Sullisin: A potential virulence factor of Type II *Streptococcus suis*? 51st Annual Meeting of the Canadian Society of Microbiologists (CSM), University of Waterloo, Waterloo (Ontario). June 10-13, 2001.
- MacInnes, J.I., A. G. Lone, D.S. Metcalf, S. Ojha, T. Rosendal, S. B. Watson, and R. M. Friendship. A survey of Ontario swine herds for the presence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *A. suis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, and *Streptococcus suis*. 84th Annual Meeting of Conference of Research Workers in Animal Diseases. Chicago, for presentation. November 9th to 11th, 2003.
- Martinez, G., J. Harel and M. Gottschalk. Genetic relatedness of *Streptococcus suis* types 2 and 1/2 isolates from carrier pigs belonging to clinically healthy or diseased herds as studied by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). 51st Annual Meeting of the Canadian Society of Microbiologists (CSM), University of Waterloo, Waterloo (Ontario). June 10-13, 2001.
- Maynard, C., C. Sotomey, G. Bruant, S. Bekal, J. Harel, R. Brousseau, and L. Masson. Development of oligonucleotide microarrays to detect antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli*. Montreal Microarray Symposium, 3rd edition, March 18-19, 2004, Montreal, Canada (poster).
- Maynard, C., Fairbrother, M. J., Bekal, S., Sanschagrin, F., Lévesque, C. R., Brousseau, R., Masson, L., Larivière, S., Harel, J. Détection des gènes de résistance aux agents antimicrobiens chez *Escherichia coli* entérotoxigènes. 2^e Colloque international francophone de bactériologie vétérinaire, ISPAIA, Ploufragan, France, 5-6 septembre 2002.
- Maynard, C., J. M. Fairbrother, Bekal, S., Sanschagrin, F., Lévesque, R.C., Brousseau, R., Masson, L., Larivière, S., Harel, J. Detection of antimicrobial resistance genes in *E. coli* isolated from postweaning pigs. 2nd Annual General Meeting of the Canadian Research Network on Bacterial pathogens of Swine, Ontario Veterinary College, University of Guelph, Guelph, Ontario. June, 2002.
- Metcalf, D.S., J. I. MacInnes. Identification of virulence of gene in *Haemophilus parasuis*. 85th Annual Meeting of Conference of Research Workers in Animal Disease. Chicago, for presentation. November 14 – 16, 2004
- Mikael, L.G., J.W. Coulton, M. Sirois and M. Jacques. Identification of genes of the ferrichrome hydroxamate uptake system in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. 51st Annual Meeting of the Canadian Society of Microbiologists (CSM), University of Waterloo, Waterloo (Ontario). June 10-13, 2001.
- Mikael, L.G., J.W. Coulton, M. Sirois, and M. Jacques. Molecular quest for the ferrichrome hydroxamate uptake system in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. 81st Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animals Diseases. Chicago, USA. November 2000.
- Mikael, L.G., P.D. Pawelek, J. Labrie, M. Sirois, J.W. Coulton and M. Jacques. Cloning and characterization of genes encoding proteins of the ferric hydroxamate uptake system in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. 102nd General Meeting of the American Society for Microbiology, Salt Lake City, Utah, USA. May 2002.
- Mikael, L.G., P.D. Pawelek, J. Labrie, M. Sirois, J.W. Coulton and M. Jacques. Molecular cloning and characterization of the ferric hydroxamate uptake operon in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. 17th International Pig Veterinary Society Congress, Ames, Iowa, USA. June 2-5, 2002.
- Mikael, L.G., P.D. Pawelek, J. Labrie, M. Sirois, J.W. Coulton and M. Jacques. Molecular cloning and characterization of the ferric hydroxamate uptake operon in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. 52nd Meeting of the Canadian Society of Microbiologists, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada. June 2002.
- Nassar, A., M. Gottschalk, R. Higgins, R. Brousseau, H. Dezfoulian et J. Harel. Présence d'un phage inducible dans une souche virulente de *Streptococcus suis* sérotype 2. 1^{er} Colloque international de bactériologie vétérinaire de langue française, Saint-Hyacinthe, Québec. 17-19 mai 2000.
- Noamani, B., J. M. Fairbrother, and C. L. Gyles. 2002. K88 (F4)-positive enterotoxigenic *Escherichia coli* in weaned pigs in Ontario. 17th International Pig Veterinary Society Congress, Ames, Iowa, USA. June 2-5, 2002.
- Paradis, M.A., MacInnes, J.I., L. Slavic, S. Watson, G.H. Vessiel, C.P. Dick, and J.B. Wilson. Efficacy of Tilmicosin in reducing the severity of experimentally induced *Haemophilus parasuis* infections in swine. 17th International Pig Veterinary Society Congress, Ames, Iowa, USA. June 2-5, 2002.
- Park, A., S. Heaney, P. Willson and J. Lewis. Recursive PCR: A method to create expression-optimized DNA vaccines. 2nd Annual General Meeting of the Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine. Ontario Veterinary College, University of Guelph, Guelph, Ontario. June 2002.
- Pérès, S., C. Desautels, B. Lehoux, C. Surprenant and J.M. Fairbrother. Pathogenicity of F18-positive enterotoxigenic *Escherichia coli* in weaned pigs. 101st General Meeting of American Society for Microbiology, Orlando, Florida, USA, May 20-24, 2001.
- Pérès, S., C. Desautels, B. Lehoux, J. M. Fairbrother. Mise au point d'un modèle de diarrhée colibacillaire post-sevrage chez le porc : caractère pathogène de souches de *Escherichia coli* entérotoxigènes F. 18 positives. 33^e Journées en recherche porcine en France. Paris, France. 2-5 Février 2001.
- Salles, M, P.J. Willson and D.M. Middleton. Leukocyte populations in crypt epithelium of the palatine tonsil if pigs infected with *Streptococcus suis* type 2. 6th International Veterinary Immunology Symposium. Uppsala, Sweden. July 15-20, 2001.
- Segura, M., D. Al-numani, N. Vadeboncoeur, G. Vanier, M. Gottschalk. Description of a poorly encapsulated strain of strain of *Streptococcus suis* serotype 2 with high inflammatory activities. 84th Conference of Research Workers in Animal Diseases, Chicago, Novembre 2003.
- Segura, M., D. Al-Numani, S. Lacouture and M. Gottschalk. Characterization of an atypical *Streptococcus suis* capsular type 2 isolate: a poor encapsulated strain with high inflammatory activities. 53rd Annual General Meeting of the Canadian Society of Microbiologists (CSM), Ville de Laval, May 25-28, 2003.
- Segura, M., N. Vadeboncoeur, M. Gottschalk. CD14-dependent and independent cytokine and chemokine production by human monocytes stimulated by *Streptococcus suis* capsular type 2. 81st Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animals Diseases. Chicago, USA. November 2000.
- Segura, M.A. and M. Gottschalk. Interactions of *Streptococcus suis* capsular type 2 with phagocytic cells: Adhesion and cytotoxicity. 101st General Meeting of American Society for Microbiology, Orlando, Florida, USA, May 20-24, 2001.
- Shakarji L., et M Jacques. La protéine FhuA d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*: un bon candidat pour un vaccin. Journée de la recherche, Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, St-Hyacinthe, 7 novembre 2003.

- Shakarji, L., C. Ng, J. Gauthier, C. Rioux, P.J. Willson, J.W. Coulton, and M. Jacques. Use of FhuA and HgbA, two iron receptors of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, as new antigens for the formulation of a subunit mucosal vaccine against porcine pleuropneumonia. CRWAD meeting, Chicago, November 2004.
- Sirois, M., A. St-Arneault, J. Provancher, N. Perreault and L. Gagnon. Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* DNA sequences encoding exported proteins using PhoA. 101st General Meeting of American Society for Microbiology, Orlando, Florida, USA, May 20-24, 2001.
- Slavic, D., and J.I. MacInnes. Analysis of *Actinobacillus suis* genes encoding for novel CPS antigens (1-6 β glucan). 102nd General Meeting of the American Society for Microbiology, Salt Lake City, Utah, USA. May 2002.
- Tessier, M.-C., C. Martin, M. Drolet et J. Harel. Le niveau de surenroulement de l'ADN affecte l'expression et la variation de phase de l'opéron *foo* codant pour le fimbriae F165 (type Prs) de la souche septicémique porcine *Escherichia coli* 4787. 1^{er} Colloque international de bactériologie vétérinaire de langue française, Saint-Hyacinthe, Québec. 17-19 mai 2000.
- Tadjine, M., K.R. Mittal. Étude de l'hétérogénéité antigénique du sérotype 7 d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*. 1^{er} Colloque international de bactériologie vétérinaire de langue française, Saint-Hyacinthe, Québec. 17-19 mai 2000.
- Tadjine, M., K. R. Mittal, S. Bourdon, and M. Gottschalk. Development of a new serological test for serotyping *H. parasuis* and their prevalence in Quebec. First Annual General Meeting of Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine. Ron Eydt Village, University of Waterloo, Waterloo, Ontario. June 14, 2001.
- Tadjine, M., K.R. Mittal. Evaluation of serological tests for detection of antigens in tissues and antibodies in serum of pigs infected with *Haemophilus parasuis*. First Annual General Meeting of the Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine. Ron Eydt Village, University of Waterloo, Waterloo, Ontario. June 14, 2001.
- Tadjine, M., K. R. Mittal, S. Bourdon, and M. Gottschalk. Development of a new serological test for serotyping *H. parasuis* and their prevalence in Quebec. International Pasteurellaceae Society Conference. Banff National Park, Alberta, Canada. May 4-11, 2002.
- Tadjine, M., K. R. Mittal, S. Bourdon et M. Gottschalk. Sérotypage de *Haemophilus parasuis* et sa prévalence au Québec. 70^e Congrès de l'Acfas. Université Laval, Québec, May 13- 17, 2002.
- Tadjine, M., K. R. Mittal, S. Bourdon, and M. Gottschalk. Production and characterization of murine monoclonal antibodies against *Haemophilus parasuis*. Communication at 53rd Annual Meeting Society of Microbiologists (CSM). Laval. Québec. Canada. May 2002.
- Tadjine, M., K.R. Mittal, S. Bourdon, and M. Gottschalk. Development of a new serological test for serotyping *H. parasuis* and their prevalence in Quebec. 2nd Annual General Meeting of the Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine. Ontario Veterinary College, University of Guelph, Guelph, Ontario. June 2002.
- Tadjine, M., and K.R. Mittal. Antigenic characterization of *H. parasuis* using polyclonal and monoclonal antibodies. St-George's University, School of Veterinary Medicine. Grenada. September 19th, 2002.
- Tadjine, M. and K.R. Mittal. Antigenic characterization *H. parasuis* using polyclonal and monoclonal antibodies. St. George's University, School of Veterinary Medicine, Grenada, September 19th, 2002.
- Tadjine, M., K. R. Mittal., S. Bourdon., M. Gottschalk., J. Harel and D. Tremblay. Comparative assessment of genotyping methods for epidemiologic study of *Haemophilus parasuis*. Communication at 84th Conference of Research Workers in Animal Diseases (CRWAD) meeting. Chicago. November 2003.
- Tadjine, M., K.R. Mittal, S. Bourdon, and M. Gottschalk. Production and characterization of murine monoclonal antibodies against *Haemophilus parasuis*. Communication at 84th Conference of Research Workers in Animal Diseases (CRWAD) meeting. Chicago. November 2003.
- Tadjine, M., K.R. Mittal, S. Bourdon, and M. Gottschalk. Production of murine monoclonal antibodies against *Haemophilus parasuis* and their implication in diagnosis and protection. Poster and Oral communication at 7th International Veterinary Immunology Symposium. Québec city, Canada, July 25-30, 2004.
- Travis, R., Archambault M., Gyles, C., Boerlin, P. 2003. Associations between virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* from pigs in Ontario. Conference of Research Workers in Animal Diseases. 84th Annual Meeting, Chicago, IL. November 9-11, 2003. 53P.
- Tremblay, D., J. Harel. Principes de diagnostic moléculaire. Saint-Hyacinthe, Faculty of Veterinary Medicine. January 31st, 2002.
- Tremblay, D., J. Harel. Aspects pratiques du diagnostic bactériologique par PCR. Association des vétérinaires en industries animale du Québec (AVIA) ; Après-midi conférences. Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada. April 18, 2002.
- Tremblay, D., J. Harel. Diagnostic moléculaire. Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec, Saint-Hyacinthe, Faculty of Veterinary Medicine. October 24, 2001.
- Tremblay, D., J. Harel. The PCR technique. Formation continue Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec, Saint-Hyacinthe, FMV. Organized by Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec. December 10-11, 2001.
- Vadeboncoeur, N., M. Segura, M. Gottschalk. Production de cytokines proinflammatoires par des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux humains stimulés avec *Streptococcus suis* sérotype 2. 1^{er} Colloque international de bactériologie vétérinaire de langue française, Saint-Hyacinthe, Québec. 17-19 mai 2000.
- Vadeboncoeur, N., M. Segura, D. Al-Numani, G. Vanier, M. Gottschalk. Pro-inflammatory release by human brain microvascular endothelial cells stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2. 81st Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animals Diseases. Chicago, USA. November 2000.
- Vadeboncoeur, N., M. Segura, D. Al-Numani and M. Gottschalk. *Streptococcus suis* serotype 2 stimulates the release of pro-inflammatory cytokines by human brain microvascular endothelial cell. 101st General Meeting of American Society for Microbiology, Orlando, Florida, USA, May 20-24, 2001.
- Vanier, G., B.D'Amours, D. Al-Numani, S. Lacouture, M. Segura, M. Gottschalk. Inflammatory cytokines and chemokines induced by *Streptococcus suis* serotype 2 in a porcine whole-blood model of infection. 84th Conference of Research Workers in Animal Diseases, Chicago, November 10-11, 2003.
- Vanier, G., A. Szczotka, S. Lacouture, M. Jacques and M. Gottschalk. *Haemophilus parasuis* is able to adhere and invade porcine brain microvascular endothelial cells. 85th Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Diseases (CRWAD), Chicago, Illinois, November 14-16, 2004.
- Vega-López, M.A., Alcón, V., Buchannan R., Hecker, R., and Willson, P.J. Adjuvant effect of CpG-ODN on early immunization. 12th International Congress of Immunology, July 18-23. 2004, Montreal. Abstracts published as a supplement in Clinical and Investigative Medicine, Vol. 27 No. 4, August 2004.
- Willson, P.J. Manitoba Swine Seminar, Research Update, February 1, 2001.
- Willson, P.J. Research Updates. Western Canadian Association of Swine Practitioners (WCASP). October 12, 2001.
- Younés, F., D.F. Niven, M. Gottschalk. Environmental conditions influencing *Streptococcus suis* growth: effect of iron and manganese. First Annual General Meeting of the Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine. Ron Eydt Village, University of Waterloo, Waterloo, Ontario. June 2001.
- Younés, F., D.F. Niven, M. Gottschalk. Environmental conditions influencing *Streptococcus suis* growth and antigen expression: effect of iron and manganese. 2nd Annual General Meeting of the Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine. Ontario Veterinary College, University of Guelph, Guelph, Ontario. June 2002.

CONFÉRENCIERS INVITÉS

- **Broes, A.** Les mesures de biosécurité dans les élevages porcins québécois. Journée : « De la démarche hygiène à la biosécurité », ISPAIA-Sogeval, Ploufragan, France. April 24, 2002.
- **Brousseau, R.** participated to a forum by FQRNT on research on GMO biosecurity, Ste-Foy, Québec, January 21, 2004.
- **Brousseau, R.** A taxonomic microarray approach to the characterization of complex microbial communities. Annual Meeting of the Genomics and Health Initiatives, Saskatoon, Saskatchewan, August 21, 2003
- **Brousseau, R.** Utilisation des puces d'ADN pour l'identification des bactéries présentes dans les produits commerciaux basés sur les consortia microbiens. Invited speaker. Association québécoise de biotechnologie, Montréal, December 5, 2003.
- **Brousseau, R.** Perspectives on the use of DNA microarrays in veterinary microbiology of swine pathogens. 51st Annual Meeting of the Canadian Society of Microbiologists. Symposium 6. Use of Genomics to Study Veterinary Pathogens. Abstract S25 University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada. June 10-13, 2001
- **Drolet, M.** RNase H1 is involved in transcription elongation in *E. coli*. Ribonuclease H meeting. Japan. September 2002
- **Drolet, M.** Le rôle de la topoisomérase I durant la transcription chez *Escherichia coli*. CNRS Orléans, France. June 2002.
- **Drolet, M.** DNA topoisomerases and supercoiling in bacterial gene expression. McGill University, Department of Microbiology and Immunology, Montreal, Quebec, Canada. November 2000
- **Drolet, M.** Le surenroulement de l'ADN et les topoisomérases dans l'expression génique chez les bactéries. INRS-Institut Armand-Frappier, Montréal, Québec, Canada. February 2000.
- **Fairbrother, J.M.** Vaccins oraux contre la diarrhée post-sevrage associée à *E. coli* chez le porc. Rencontre technologique, Vaccins innovants pour le contrôle des maladies en production porcine, Centre québécois de valorisation des biotechnologies. Décembre 2005.
- **Fairbrother J.M.** Update on *E. coli* diarrhea in postweaning pigs. Pig Research and Disease Unit, NRE, Department of Primary Industries, Bendigo, Victoria, Australia, April, 2003.
- **Fairbrother, J.M.** Physiologie et facteurs de risque de la diarrhée colibacillaire; immunité dans le système digestif chez le porcelet. Rencontres Internationales de Production Porcine, Loudéac, France. June 14, 2002.
- **Fairbrother, J.M.** Review of *Escherichia coli* in Swine. Schering-Plough Animal Health, Montreal, Québec, Canada. September 29, 2001.
- **Fairbrother, J.M.** *E. coli* diarrhea in pigs. Bendigo Pig Forum, Bendigo Swine Practitioners meeting, Bendigo, Victoria, Australia. September 2000.
- **Fairbrother, J.M.** Pathogenesis of extra-intestinal *Escherichia coli* infections in animals. McGill University, Department of Microbiology and Immunology. Montreal, Quebec, Canada. October 26, 2000.
- **Fairbrother, J.M.** Pathogenesis of extra-intestinal *Escherichia coli* infections in animals. American Society for Microbiology, 101st General Meeting Program Committee, Orlando, Florida, USA. May 20-24, 2001
- **Friendship, R.M., Dewey, C.E., Amezcua, R., Chernysheva, L., Gyles, C.** Failure of non antibiotic treatments for the control of post-weaning *E. coli* diarrhea. 17th International Pig Veterinary Society Congress, Ames, IA. June 2-5, 2002
- **Friendship, R.M.** Exploring alternatives to antibiotics. London Swine Conference, London. 2002.
- **Gottschalk, M.** *Streptococcus suis* immunity : the Dr. Jeckill and Mr. Hyde story. 36th Annual Meeting American Association of Swine Veterinarians (AASV), Toronto, ON, CANADA, March 5-8, 2005.
- **Gottschalk, M.** Studies on the pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*, an important swine and human pathogen. Mc Gill Centre for the Study of Host Resistance, Montreal General Hospital, Montreal, QC, CANADA, March 21, 2005.
- **Gottschalk, M.** News on *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Swine Disease Group, University of Minnesota, MN, USA. April 1st, 2005.
- **Gottschalk, M.** Meningitis caused by *Streptococcus suis*: an interesting model. PharmacNeuroImmunology Program, Faculty of Medicine, University of Minnesota, MN, USA. April 1st, 2005.
- **Gottschalk, M.** News on the diagnosis of the infection caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. 4th Annual Meeting of the Canadian Animal Health Laboratorians Network (CAHLN)/Réseau Canadien des Travailleurs des Laboratoires de Santé Animale (RCTLSA), Faculté de médecine vétérinaire, Saint-Hyacinthe, QC, CANADA. 5-8 juin 2005.
- **Gottschalk, M.** New aspects on the pathogenesis of the meningitis caused by "*Streptococcus suis*". The XVth Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases, Cairns, AUSTRALIA. September 28, 2005.
- **Gottschalk, M.** Les implications légales de la transmission d' *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Table ronde organisée par Vétoquinol, Bono. FRANCE. 4-5 octobre 2005.
- **Gottschalk, M.** Pleuroneumonia porcina y *Streptococcus suis*: investigaciones recientes Guadalajara, Regional meeting of Intervet International, MEXIQUE, November 9, 2005.
- **Gottschalk, M.** Actualidades en la pleuroneumonia porcina. Quinto congreso anual de la Asociacion de Medicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, Estado de Mexico (Mexican Association of Swine Veterinarians from Mexico State, 5th annual congress) Toluca, MEXIQUE. November 11, 2005.
- **Gottschalk, M.** Advances on swine health for the XXIth Century. Research on Swine Diseases at the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal. INTA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación Agropecuaria, Marcos Juárez, ARGENTINE, Décembre 2005
- **Gottschalk, M.** Research on Swine Diseases at the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal: Université de Rio Cuarto, Cordoba, Département de production porcine, Universidad Nacional de Rio Cuarto, Cordoba, Décembre 2005.
- **Gottschalk, M.** *Streptococcus suis* strains as source of infection in humans: the Chinese experience and the situation in North America. Keynote speaker at the Congress of Researcher Workers in Animal Disease (CRWAD) St-Louis, MI, USA. December 5, 2005.
- **Gottschalk, M.** Recherche sur *Streptococcus suis* effectuée à la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal. Universidad de Catalunya, Barcelone, Spain. November 2004.
- **Gottschalk, M.** Abordaje integral de la infección por *Streptococcus suis* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Jornada de Anaporc en Expoaviga, Barcelona, Spain. November 2004.
- **Gottschalk, M.** *Streptococcus suis* Infections. Cipep, Rosario, Santa Fe, Argentina, September 2004.
- **Gottschalk, M.** Tout sur la pleurpneumonie porcine. Faculté de médecine vétérinaire, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, September 2004.
- **Gottschalk, M.** Avances recientes sobre el control y diagnostico de la pleuropneumonia porcina. Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos (AMVEC), Mazatlán, Sinaloa, Mexico, July 2004.
- **Gottschalk, M.** Diagnostico de la pleuropneumonia porcina. Génétiporc, Mazatlán, Sinaloa, Mexico, July 2004.
- **Gottschalk, M.** Manejos y alternativas para el control de la pleuroneumonia porcina. V reunión anual de producción porcina Cajeme, Ciudad Obregon, Mexico, May 2004.
- **Gottschalk, M.** Control de las enfermedades infecciosas porcinas: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis* and *Haemophilus parasuis*. Asociacion Peruana de Porcicultores. Lima, Pérou, 2 octobre 2003.
- **Gottschalk, M.** Avances recientes en APP y *Streptococcus suis*. 1^{er} Simposium Peninsular Grupo Porcicola de Yucatan 2003, Merida, Mexique. 10 juillet 2003.
- **Gottschalk, M.** *Streptococcus suis* infections. Invited by National Veterinary Research Institute, Pulawy, Pologne. June 3-4, 2003.
- **Gottschalk, M.** Activity of microbial toxins on brain endothelial cells : "Breaching the blood-brain barrier". Endothelial cell-pathogen interactions. Society of General Microbiology, Edinburgh University, Edinburgh, Royaume-Uni. April 8-9, 2003.
- **Gottschalk, M.** An update on *Streptococcus suis* infections. *Streptococcus suis* Symposium 2002, Copenhagen, Danemark. August 21, 2002
- **Gottschalk, M.** *Streptococcus suis* infections. National Federation of Hog Farmers. Mandaluyong, Philippines. May 24, 2002
- **Gottschalk, M.** Diagnostic and control of *Streptococcus suis* infections. Swine Veterinary Association of Philippines, Manille, Philippines. May 23, 2002.
- **Gottschalk, M.** Diagnostic and control of *Streptococcus suis* infections. Swine Veterinary Association of Thailand, Bangkok, Thailand. May 21, 2002.

- **Gottschalk, M.** Actualité sur *A. pleuropneumoniae*. Association des médecins vétérinaires en industrie animale du Québec (AVIA). Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec. April 2002.
- **Gottschalk, M.** *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App): Es posible su erradicación? Circulo Verde : Enfermedades que impactan en la producción Circulo Verde : Recursos Diagnosticos disponibles Conférence Intervet, Guadalajara, Jalisco, Mexico. April 11-12, 2002.
- **Gottschalk, M.** Everything on *Streptococcus suis*. Pharmacia Animal Health, Kalamazoo, Michigan, USA. March 26, 2002
- **Gottschalk, M.** *Streptococcus suis*: Update on pathogenesis and progress on control. Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians, Kansas City, Missouri, USA. March 4, 2002
- **Gottschalk, M.** Recent research on *Streptococcus suis*. Pharmacia Animal Health, Kalamazoo, Michigan, USA. January 15, 2002
- **Gottschalk, M.** An update on *Streptococcus suis* infections. Belgian Branch of the International Pig Veterinary Society, Ghent, Belgium. December 14, 2001
- **Gottschalk, M.** Avances recientes en los conocimientos sobre *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Streptococcus suis*. Federacion de Productores Porcinos de Sonora, Sonora, Mexico. December 6-8, 2001.
- **Gottschalk, M.** Manejo para la prevencion y control de las enfermedades mas comunes en la region. Precongreso del X dia del Porcicultor 2001, Navojoa, Sonora, Mexico. December 6-8, 2001
- **Gottschalk, M.** Les infections à *Streptococcus suis*. Virbac, Nice, France. November 23, 2001.
- **Gottschalk, M.** Mise à jour sur l'entérite proliférative (iléite) et état de la sérologie au Québec. "À l'ère des connaissances" 10^e anniversaire Génétiporc, Drummondville, Québec, Canada. October 23, 2001.
- **Gottschalk, M.** 2001. An update on *Streptococcus suis* infections. Italian Society of Pathologists. Verona, Italy. October 5, 2001
- **Gottschalk, M.** La pleuropneumonie porcine et *Streptococcus suis*. Journée de formation pour Boehringer Ingelheim-France. Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada. 2 octobre 2001
- **Gottschalk, M.** La sérologie pour la pleuropneumonia porcina. INTA. Buenos Aires, Argentine. August 9, 2001.
- **Gottschalk, M.** Studies on the pathogenesis of the infection caused by *Streptococcus suis*, an important porcine and human pathogen. 51st Annual Meeting of the Canadian Society of Microbiologists (CSM) University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada. June 10-13, 2001.
- **Gottschalk, M.** Recent advances on Streptococcal diseases. International Virtual Conference on Animal Health. Brazil. May 2-8, 2001.
- **Gottschalk, M.** L'infection à *Streptococcus suis* chez le porc : Revue générale. 33^e Journées en recherche porcine en France. Paris, France. January 30 - February 1st, 2001
- **Gottschalk, M.** Pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus suis*. Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montréal. December 2000
- **Gottschalk, M.** Advances in the diagnosis of porcine pleuropneumonia caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae*; Control and eradication of pleuropneumonia caused by *S. suis*; Recent advances in the diagnosis of *Streptococcus suis*. Congreso Mercusur de Produccion Porcina, Buenos Aires, Argentina. October 2000
- **Gottschalk, M.** *Streptococcus suis* infections recent developments; Recent advances on swine pleuropneumonia; The use of diagnostic tools for monitoring swine infections. X Congreso Mexicano de Produccion Porcina. Acapulco, Mexico. July 2000
- **Gottschalk, M.** Étude des interactions entre *Streptococcus suis* sérotype 2 et des cellules endothéliales, épithéliales et phagocytaires. 1^{er} Colloque international de bactériologie vétérinaire de langue française, Saint-Hyacinthe, Québec. 17-19 mai 2000
- **Gyles, C., R. Friendship, K. Ziebell, R. Amezcua.** *E. coli* O157:H7 in pigs. Centralia Swine Research Update. Centralia, Ontario, January 31, 2002.
- **Gyles, C.L.** Living with *E. coli*. Videoconference between the four Canadian Veterinary Colleges. October 18th, 2001
- **Gyles, C. L.** Post-Weaning *E. coli* Diarrhea. Schering-Plough Animal Health, Montreal, Quebec, September 29, 2001.
- **Gyles, C.L.** R. Friendship, K. Ziebell, R. Amezcua. *E. coli* O157:H7 in pigs. Centralia Swine Research Update. Centralia, Ontario, January 31, 2002.
- **Gyles, C.** *Escherichia coli* in diseases of weaned pigs: biological aspect. American Association of Swine Veterinarians. 32nd Annual Meeting, Nashville, TN. February 24-27, 2001.
- **Harel, J.** Nouveau vaccin efficace pour contrôler les infections à *Streptococcus suis*. Rencontre technologique, Vaccins innovants pour le contrôle des maladies en production porcine, Centre québécois de valorisation des biotechnologies. Décembre 2005.
- **Harel, J.** Évolution des pathogènes dans le contexte du risque. Séminaire annuel sur les pathogènes : Analyse et gestion du risque, La Fondation des Gouverneurs en collaboration avec Agriculture et agroalimentaire Canada, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, December 4, 2003.
- **Harel, J.** The PCR technique. Continuing education for the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation (MAPAQ). Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada. December 10 - 11, 2001.
- **Harel, J.** PEPEC (pig attaching and effacing *E. coli*), un modèle pour étudier les *E. coli* (AEEC). INRA Clermont-Ferrand, Theix, France, November 15, 2001.
- **Harel, J.** Molecular Diagnostics. Presentation to the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation (MAPAQ). Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada. October 24, 2001
- **Harel, J.** Regulation of expression of genes coding for fimbriae involved in the pathogenesis of septicemic *Escherichia coli*. McGill University, Department of Microbiology and Immunology. Montréal, Québec. October 5, 2000
- **Harel, J.** Expression des gènes codant pour les fimbriae F165 d'*Escherichia coli* responsable de septicémies. 1^{er} Colloque international de bactériologie vétérinaire de langue française, Saint-Hyacinthe, Québec. 17-19 mai 2000
- **Jacques, M.** Vaccination pour la pleuropneumonie porcine. Rencontre technologique, Vaccins innovants pour le contrôle des maladies en production porcine, Centre québécois de valorisation des biotechnologies. Décembre 2005.
- **Jacques, M.** Molecular characterization and biological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* LPS and CPS mutants. Department of Microbiology and immunology, McGill University, Montreal, Québec, Canada. April 12, 2001
- **Jacques, M.** Caractérisation moléculaire et propriétés biologiques de mutants LPS et CPS d'*A. pleuropneumoniae*. Faculté de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada. November 23, 2001
- **Jacques, M.** *Actinobacillus pleuropneumoniae* vaccines: past, present and future. International Veterinary Vaccines and Diagnostics Conference, Oxford University (UK). July 26, 2000
- **Jacques, M.** Virulence factors of *Pasteurellaceae* - Formidable animal pathogens. American Society for Microbiology, Division Z Lecture, Orlando, Florida, USA. May 23, 2001
- **Jacques, M.** Surface polysaccharides and iron uptake systems of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. International Pasteurellaceae Society, Banff National Park, Alberta, Canada. May 7, 2002.
- **Jacques, M.** Pfizer Animal Health Canadian Swine Symposium 2005, February 7, 2005.
- **Jacques, M.** InnoVet 2004, an International Veterinary Business Conference, Saint-Hyacinthe, November 8, 2004.
- **Jacques, M.** Symposium on Veterinary Vaccines and Delivery Systems, Association Canadienne Française pour l'Avancement des Sciences (ACFAS), Université du Québec à Montréal, Montreal, May 12, 2004.
- **Jacques, M.** Continuing education symposium, Association des vétérinaires en industrie animale du Québec (AVIA), Drummondville, November 19, 2003.
- **Lewis, P.J.** DNA Immunization: Overview and Application to Veterinary Pathogens. 51st Annual Meeting of the Canadian Society of Microbiologists. Symposium 6. Use of Genomics to Study Veterinary Pathogens. Abstract S24. University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada. June 2001
- **Mittal, K.R.** Antigenic characterization of *H. parasuis* using polyclonal and monoclonal antibodies. St-George University, School of Veterinary Medicine, Grenada. September 19th, 2002.
- **Nash, J.** Genomics of two pathogens: DNA arrays of *Campylobacter jejuni* and genome sequencing of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. GREMIP, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada. September 27, 2002
- **Tremblay, D.** November 2003. Les nouvelles techniques de biologie moléculaire, appliquées au diagnostic vétérinaire. Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal. Saint-Hyacinthe. PTM6666Z. Bactériologie et mycologie vétérinaire.
- **Willson, P.J.** 2004. Effect of injection method on pigs injected at 1 day of age. Canadian Liaison Meeting, 14 October 2004, Saskatoon, Saskatchewan.
- **Willson, P.J.** 2005. Novel vaccine delivery technology. Banff Pork Seminar, 18-21 January, 2005, Banff, Alberta.
- **Willson, P.J.** 2005. Airborne bacteria and endotoxin around hog barns. Livestock Environmental Initiative Conference. 7-8 February 2005, Toronto, Ontario.