

2711.3390.7

Université de Montréal

Mise au point d'un prototype de vaccin mucosal contre les infections à *Salmonella* chez le porc

par  
Amélie Desautels

Département de pathologie et microbiologie  
Faculté de médecine vétérinaire

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

Août 2005

© Amélie Desautels, 2005



SF

607  
U54

2006

V.015



## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

Mise au point d'un prototype de vaccin mucosal contre *Salmonella* chez le porc

présenté par  
Amélie Desautels

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr Marcelo Gottschalk, Président-rapporteur

Dr Sylvain Quessy, Directeur de recherche

Dre Ann Letellier, Codirectrice

Dr Serge Messier, Membre du jury

## SOMMAIRE

*Salmonella* est une cause importante de toxi-infection alimentaire dans le monde. L'issue la plus fréquente de l'infection chez le porc est le portage asymptomatique de la bactérie. Bien que le porteur silencieux ne présente pas de signe clinique, il constitue la source première de propagation de la bactérie pour les porcs sains, à la ferme comme à l'abattoir. La contamination des produits dérivés du porc par *Salmonella* représente un important problème de santé publique puisque la plupart des sérotypes sont pathogènes pour l'homme. Les méthodes de prophylaxie utilisées à la ferme jusqu'à maintenant ne permettent pas l'éradication complète de la bactérie chez les porcs. L'émergence de souches résistantes aux agents antimicrobiens favorise le développement de nouvelles méthodes prophylactiques. L'administration d'un vaccin par voie orale ou nasale est à privilégier en ce sens qu'elle induit la sécrétion d'immunoglobulines A, principaux effecteurs du système immunitaire mucosal, dirigées contre l'antigène dans le lumen intestinal. Malgré le fait que (synonyme de bien que) plusieurs protéines immunogènes de *Salmonella* aient été identifiées, aucun antigène connu n'assure une protection efficace. L'objectif de ce projet est d'évaluer les paramètres reliés à la mise au point d'un vaccin sous-unitaire afin de diminuer l'incidence de salmonelloses sous-cliniques chez le porc.

La localisation extracytosolique d'une enzyme immunogène, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), a été évaluée par un test d'activité enzymatique de surface. Le gène codant *gapA* a été identifié et séquencé. Les séquences en nucléotides et en acides aminés démontrent une forte homologie avec les gènes *gapA* de microorganismes de la famille des *Enterobacteriaceae*. Le clonage de *gapA* dans un vecteur d'expression a permis la purification d'une GAPDH recombinante en conditions natives grâce à une signature d'histidines en N-terminal de la protéine clonée. L'immunogénicité de la GAPDH chez les porcs avec et sans signes cliniques a été confirmée par immunobuvardage. Un protocole d'émulsion double a été développé afin de créer des microsphères d'acide poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA), un composé polyester aliphatique biodégradable et biocompatible. La protéine recombinante a été encapsulée dans les microsphères polymériques et il a été démontré que la coencapsulation d'une protéine ayant une activité interfaciale est nécessaire à son encapsulation. Le potentiel immunoprotecteur de la GAPDH pourra être évalué ultérieurement par son administration orale via le véhicule de livraison polymérique dans un modèle d'infection expérimentale.

Mots clés: *Salmonella* Typhimurium; Porc; Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase; Microsphères d'acide poly (DL-lactique-co-glycolique); Vaccin

## SUMMARY

*Salmonella* is an important cause of foodborne disease worldwide. The most frequent outcome of this infection in pig is asymptomatic carriage of bacteria. Silent carriers show no clinical signs and they appear to be the primary source of infection for healthy pigs on farm and at slaughter. *Salmonella* contamination of pork-derived products is an important public health concern since most serotypes are pathogenic for man. Current on farm prophylaxis methods are not successful in eradication of bacteria in swine. Emergence of antimicrobial agents resistant strains promotes the search of new prophylaxis methods. Oral or nasal vaccine administration should be carefully evaluated since it induces luminal secretion of immunoglobulins A, main effectors of mucosal immune system. Although many immunogenic *Salmonella* proteins were identified, the nature of protective antigen is still elusive. The purpose of this study is the assessment of parameters involved in the development of a subunitary vaccine against asymptomatic *Salmonella* infection in swine.

Extracytosolic localization of immunogenic *Salmonella* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was evaluated by a surface enzymatic activity assay. Coding gene *gapA* was identified and sequenced. Nucleotide and amino acids sequences show high homology with *gapA* gene of other members of *Enterobacteriaceae* family. Cloning of *gapA* in expression vector allowed its native purification by mean of N-terminal histidine tag. GAPDH immunogenicity in swine with or without clinical signs was confirmed by immunoblotting. Double emulsion protocol was elaborated for generation of poly (DL-lactic-co-glycolic) acid (PLGA) microspheres, a biodegradable and biocompatible aliphatic polyester. Recombinant protein was encapsulated in polymeric microspheres and it was shown that coencapsulation of protein having interfacial activity is imperative for GAPDH encapsulation. GAPDH immunoprotective potential will be evaluated subsequently by its oral administration via polymeric delivery vehicle in an experimental infection model.

Keywords: *Salmonella* Typhimurium; Swine; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Poly (DL-lactic-co-glycolic) acid microspheres; Vaccine

## TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY .....	ii
SOMMAIRE .....	iii
SUMMARY .....	v
TABLE DES MATIÈRES .....	vi
LISTE DES FIGURES .....	ix
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	x
DÉDICACE.....	xiii
REMERCIEMENTS.....	xiv
CHAPITRE 1. INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 2. RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....	3
<b>2.1 Caractéristiques générales de <i>Salmonella</i></b> .....	4
<b>2.2 Distribution des sérovars</b> .....	4
<b>2.3 Croissance et survie des salmonelles</b> .....	5
<b>2.4 L'impact de <i>Salmonella</i> sur la santé publique</b> .....	5
<b>2.5 Sources de contamination</b> .....	6
<b>2.5.1 Sources infectieuses chez le porc</b> .....	6
<b>2.5.2 Sources infectieuses chez l'homme</b> .....	7
<b>2.6 Salmonellose chez l'homme</b> .....	8
<b>2.6.1 Signes cliniques</b> .....	8
<b>2.6.2 Facteurs de risque</b> .....	8
<b>2.7 Formes cliniques de salmonellose chez le porc</b> .....	9
<b>2.7.1 Salmonellose entérique</b> .....	9
<b>2.7.2 Salmonellose septicémique</b> .....	10
<b>2.8 Forme asymptomatique de salmonellose chez le porc</b> .....	10
<b>2.8.1 Caractéristiques générales</b> .....	10
<b>2.8.2 Sites de colonisation et de réplication de <i>Salmonella</i></b> .....	10
<b>2.8.3 Excrétion de <i>Salmonella</i> par les fèces</b> .....	11
<b>2.8.4 Causes hypothétiques de l'état de porteur</b> .....	12
<b>2.9 Structures antigéniques de <i>Salmonella</i></b> .....	13
<b>2.9.1 Lipopolysaccharides</b> .....	13



<b>2.9.2 Flagelle</b> .....	13
<b>2.9.3 Fimbriae</b> .....	14
<b>2.10 Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase (GAPDH)</b> .....	15
<b>2.10.1 Caractéristiques générales</b> .....	15
<b>2.10.2 Recensement de GAPDH extracytosoliques chez les procaryotes</b> .....	16
2.10.2.1 Mécanismes de ciblage chez les bactéries à Gram positif .....	17
2.10.2.2 Mécanismes chez les bactéries à Gram négatif .....	17
<b>2.10.3 Description des activités des GAPDH de surface</b> .....	18
2.10.3.1 Attachement aux protéines de l'hôte .....	18
2.10.3.2 Implication dans la voie fibrinolytique .....	18
2.10.3.3 Activité ribosylante .....	19
2.10.3.4 Implication dans la transduction de signal .....	19
<b>2.10.4 Immunogénicité et potentiel immunoprotecteur de la GAPDH de surface</b> .....	20
<b>2.11.1 Plaques de Peyer</b> .....	21
<b>2.11.2 Les cellules M des plaques de Peyer</b> .....	22
2.11.2.1 Propriétés morphologiques des cellules M .....	22
2.11.2.2 Échantillonnage d'antigènes luminaux .....	23
2.11.2.3 Les cellules M comme voie d'invasion pour les microorganismes .....	23
2.11.2.4 Récepteurs en surface des cellules M .....	24
<b>2.11.3 Amygdales du palais mou</b> .....	25
2.11.3.1 Caractéristiques histologiques .....	25
2.11.3.2 Morphologie des cryptes des amygdales du palais mou .....	25
2.11.3.3 Induction de l'immunité mucoale le long du GALT .....	26
2.11.3.4 Structure des différents types d'épithélium des amygdales du palais mou ..	26
2.11.3.5 Localisation des différents sous-groupes de lymphocytes .....	27
2.11.3.6 Les amygdales du palais mou comme voie d'invasion .....	27
<b>2.12 Mécanismes immunitaires de l'hôte contre <i>Salmonella</i></b> .....	28
<b>2.12.1 Immunité innée</b> .....	28
2.12.1.1 Acidité gastrique .....	28
2.12.1.2 Flore intestinale microbienne .....	29
<b>2.12.2 Immunité acquise</b> .....	29
2.12.2.1 Immunité humorale .....	30
2.12.2.2 Immunité cellulaire .....	32
<b>2.13 Traitement et prophylaxie des infections à <i>Salmonella</i> chez le porc</b> .....	35
<b>2.13.1 Vaccins</b> .....	35



## LISTE DES FIGURES

- Fig. 1. GAPDH activity measured spectrophotometrically on whole *Salmonella* Typhimurium B1 in mid-logarithmic growth phase.....71
- Fig. 2. Hydrophobicity profile for *gapA* encoded GAPDH in *Salmonella* Typhimurium B1 according to Kyte-Doolittle hydropathy plot.....72
- Fig. 3. Purification of (His)<sub>6</sub>GAPDH from pQE-30::*gapA* transformed cells under native conditions using Ni-NTA agarose. Proteins of polyacrylamide SDS-PAGE are stained with Coomassie brilliant blue.....73
- Fig. 4. Scanning electron micrograph of 65:35 PLGA microspheres generated by double emulsion solvent evaporation method.....74
- Fig. 5. SDS PAGE results of extracted GAPDH and BSA by dichloromethane dissolution of the PLGA microspheres.....75

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

A : Absorbance  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
ADP : Adénine diphosphate  
ARN: Acide ribonucléique  
Bp: "Base pair"; Paire de base  
BSA : "Bovine serum albumin"; Albumine sérique bovine  
°C : degré Celsius  
CD: "Cluster of differentiation"; Classe de différenciation  
CFU : "Colony forming unit"; Unité formatrice de colonie  
CHM : Complexe d'histocompatibilité majeur  
Da: Dalton  
DCM: Dichlorométhane  
DL : Dose létale  
DT : "Definitive type" ; Type définitif  
EHEC : "Enterohemorrhagic *Escherichia coli*"; *Escherichia coli* entérohémorragique  
EPEC : "Enteropathogenic *Escherichia coli*"; *Escherichia coli* entéropathogène  
FAE: "Follicule associated epithelium"; Épithélium associé aux follicules  
Fc: Portion constante des immunoglobulines  
g : Gramme  
G3-P : Glycéraldéhyde-3-phosphate  
GALT: "Gut associated lymphoid tissue"; Système lymphoïde du tube digestif  
GAPDH : Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase  
GTP : "Guanosine triphosphate"; Triphosphate de guanosine  
(His)<sub>6</sub>: Signature de six histidines  
HPA: Hélix pomatia  
Hrs : "Hours"; Heures  
IFN : Interféron  
Ig : Immunoglobuline  
IgAs : Immunoglobuline A sécrétée  
IL : Interleukine  
IPTG : Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside  
kDa : Kilo dalton  
kg: Kilogramme  
LB: Luria-Bertani

LPS : Lipopolysaccharide  
M: Molaire  
m : Mètre  
MALT: "Mucosal associated lymphoid tissue"; Système lymphoïde des muqueuses  
MAP: "Mitogen-activated protein"; Protéine activée par des agents mitogènes  
mg : Milligramme  
min : Minute  
mL : Millilitre  
mm : Millimètre  
mM: Millimolaire  
NaCl : Chlorure de sodium  
NAD<sup>+</sup> : Nicotinamide dinucleotide, forme oxydée  
NADH : Nicotinamide dinucleotide, forme réduite  
NiNTA: "Nickel-nitriloacetic acid"; Acide nickel-nitriloacétique  
NO : "Nitric oxide"; Oxyde nitrique  
OD : "Optical density"; Densité optique  
PAGE: "Polyacrylamide gel electrophoresis" ; Électrophorèse sur gel de polyacrylamide  
PCL : Poly-ε caprolactone  
PCR : "Polymerase chain reaction"; Réaction de polymérase en chaîne  
PHA : Phaseolus vulgaris  
pIgR: "Polymeric Immunoglobulin receptor"; Récepteur d'immunoglobuline polymérique  
PLA: Poly (DL-lactide)  
PLG: Poly (DL-glycolide)  
PLGA : "Poly (DL-lactic co-glycolic) acid"; Acide poly (DL-lactique co-glycolique)  
PVA: "Poly vinyl alcohol"; Alcool polyvinyl  
RCT: Récepteur de cellule T  
Rpm: "Revolution per minute"; Rotation par minute  
s: Seconde  
SDH : "Streptococcal Surface Dehydrogenase"; Déshydrogénase de surface streptococcale  
SDS : "Sodium dodecyl sulfate"; Dodécyl sulfate de sodium  
SEM : "Scanning electron microscopy"; Microscopie électronique à balayage  
SSTT : Système de sécrétion de type III  
TGF : "Transforming growth factor"; Facteur de croissance transformant  
Th : "T helper cell"; Cellule T auxiliaire  
TLR : "Toll like receptor" ; Récepteurs Toll

TNF : "Tumor necrosis factor"; Facteur onconécrosant

UEA: Ulex europaeus

µg : Microgramme

µm : Mètre

VIH: Virus de l'immunodéficience humaine

W: Watt

WGA : "Wheat germ agglutinin"; Agglutinine du germe de blé

w/o : "Water in oil"; Eau dans huile

w/o/w: "Water in oil in water"; Eau dans huile dans eau

*À ma famille*

## REMERCIEMENTS

Bien qu'un seul nom figure sur ce mémoire, il est loin d'être le résultat d'un travail individuel. Je tiens à remercier les personnes qui, par leur participation et leurs encouragements, ont contribué à sa réalisation.

Dr Sylvain Quessy pour m'avoir confié ce projet et m'avoir toujours offert le soutien et les encouragements conséquents. Son approche multidisciplinaire, son sens critique et son optimisme m'auront assurément permis d'atteindre mes objectifs. Merci Sylvain pour la bienveillance à l'égard de tes étudiants, pour les sympathiques réunions du lundi matin et pour ton sens de l'humour (même si parfois plutôt original).

Dre Ann Letellier pour ses suggestions et son support à chaque étape de ce projet et son soutien lors de mes études. Merci en particulier pour les sérum, pour ta bonne humeur indéfectible et ta disponibilité lors des inoubliables journées FPLC, entre autres.

Dre Julie Brassard pour m'avoir initié au clonage et à la purification de protéines dans le souci du détail, pour les conseils et le support qu'elle m'a prodigué à mes débuts.

Dr Robert E. Prud'homme et Dre Carole Fraschini du Département de Chimie de l'Université de Montréal. Leurs réponses à mes nombreuses questions, leurs conseils et leur disponibilité m'auront été de précieux outils dans la compréhension des polymères lactides.

Diane Montpetit du CRDA et Michel Thibodault de l'IMI-CNRC pour leur conseils et le traitement des échantillons en microscopie électronique.

Aux membres du projet VRQ pour leurs critiques constructives et les échanges à propos du développement des vaccins vétérinaires.

Dre Judith Bossé et Sylvie Desmarchais, directrices du LSTH qui m'ont permis de profiter des infrastructures de leurs laboratoires. Merci aux employés du LSTH pour m'avoir accueilli parmi eux et pour avoir partagé avec moi leurs connaissances, astuces et équipements.



Tous les membres du labo que j'ai eu la chance de côtoyer, une équipe motivante et dynamique. Vous faites du labo un endroit stimulant et agréable à travailler et égayez sans contredit les réunions mensuelles. Un merci tout spécial à Louise Lessard, pour ton enthousiasme, pour les belles discussions à l'improviste au G-16 et pour tes « Non, tu ne me déranges jamais ». Ton support y est pour beaucoup dans l'accomplissement de ce projet.

À mes parents, pour m'avoir soutenue de façon inconditionnelle peu importe la situation. Aucun remerciement n'est assez grand face à tout ce que vous m'apportez, aucune formule ne pourrait rendre toute l'admiration et l'amour que j'éprouve pour vous. Merci à Alex et Yana. Par votre persévérance et votre détermination, vous avez été encore une fois les plus grandes inspirations de votre petite soeur. Merci à Bénédicte et Robert pour la belle complicité que l'on partage.

A Isabelle, Myriam, Marjolaine et Geneviève, pour avoir allégé mes préoccupations par n'importe quel moyen possible, pour vos encouragements et votre amitié.

J'aimerais finalement remercier la Fédération des producteurs de porc du Québec pour m'avoir octroyé la Bourse d'excellence en production porcine et le VRQ qui a financièrement encouragé nos efforts.

**Chapitre 1.**  
**INTRODUCTION**

Le genre *Salmonella* comprend plus de 2500 sérotypes et s'inscrit dans la famille des *Enterobacteriaceae*. Cette bactérie à Gram négatif est l'agent étiologique de la salmonellose, une affection entérique ou septicémique habituellement d'origine alimentaire. Les symptômes chez l'humain varient selon la souche et la condition immunitaire de l'hôte. Un nombre significatif de cas de salmonelloses est imputable aux produits de boucherie. L'infection du porc par *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium résulte le plus souvent en portage asymptomatique, alors que chez l'homme, l'infection se traduit par une forme clinique. Par l'excrétion de *Salmonella* dans leurs fèces, les porcs porteurs constituent une source de contamination majeure pour les animaux sains et pour les infrastructures de la ferme jusqu'à l'abattoir. Ils représentent donc une menace en matière de santé publique. Le contrôle des infections par l'administration d'agents antimicrobiens est délicat étant donné l'émergence de souches multirésistantes. Les méthodes de vaccination conventionnelles sont d'une faible efficacité dans l'activation du système immunitaire mucosal. La génération d'immunoglobulines dans le lumen intestinal implique généralement l'administration d'un antigène par voie orale ou nasale. Ce mode d'immunisation est compliqué par la présence d'effecteurs immunitaires et physiologiques le long du segment gastro-intestinal pouvant dégrader l'antigène. Sa protection peut s'effectuer par son encapsulation dans un véhicule de livraison polymérique ciblant les organes impliqués dans la génération d'une réponse immunitaire. À ce jour, aucun antigène protecteur n'a encore été identifié quant aux infections à *Salmonella*. L'évaluation de l'immunoprotection d'une protéine immunogène passe par l'administration de cette dernière chez des animaux dans le cadre d'une infection expérimentale. L'objectif principal de cette étude est d'évaluer les paramètres de mise au point d'un vaccin sous-unitaire contre les infections sous-cliniques à *Salmonella* chez le porc. Le véhicule de livraison développé permettra d'examiner le potentiel protecteur d'une protéine immunogène chez le porc, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, suite à une administration par voie orale. Le clonage et la purification de cette protéine faciliteront sa caractérisation sommaire et son encapsulation dans le véhicule de livraison.

**Chapitre 2.**  
**RECENSION DE LA LITTÉRATURE**

## 2.1 Caractéristiques générales de *Salmonella*

Le genre *Salmonella* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae* et définit un groupe de bactéries dont les caractéristiques morphologiques et biochimiques sont homogènes (Schwartz, 1999). Plus de 2500 sérotypes ont été répertoriés jusqu'à maintenant. Les salmonelles sont des bacilles de 3  $\mu\text{m}$  de long sur 0,6 à 0,7  $\mu\text{m}$  de diamètre, à Gram négatif, non sporulantes et non encapsulées. La plupart des salmonelles peuvent se mouvoir à l'aide de flagelles péritriches. Cependant, les sérovars Pullorum et Gallinarum et certains mutants sont non motiles (LeMinor, 1984). À l'instar des autres *Enterobacteriaceae*, l'habitat premier des salmonelles est le tractus intestinal des animaux vertébrés à sang chaud et froid. Leur présence ubiquiste dans l'eau, dans les aliments et dans l'environnement est expliquée a priori par la contamination fécale (Laval et coll., 1991) et facilite l'infection d'espèces animales susceptibles. Les conséquences d'une infection à *Salmonella* varient en fonction de facteurs propres à l'hôte et à la souche infectante. Elles vont d'un portage asymptomatique jusqu'à une infection systémique grave, pouvant même conduire à la mort de l'individu. Les animaux d'élevage constituent un réservoir important de *Salmonella*. L'infection d'un troupeau, qu'elle soit clinique ou asymptomatique, a des répercussions économiques considérables, par la mortalité, la morbidité et les conséquences non négligeables sur la santé humaine. La large distribution de *Salmonella* dans l'environnement et sa prévalence dans la chaîne alimentaire justifient les préoccupations économiques et sanitaires attribuables à cet agent pathogène.

## 2.2 Distribution des sérovars

*Salmonella* est répandu à travers le monde mais chaque sérotype possède son propre patron de distribution géographique. Le patron de distribution des salmonelles ayant un hôte spécifique dépend de la répartition de ce dernier mais la majorité des sérotypes de *Salmonella enterica* n'ont pas d'hôte déterminé. C'est le cas de *S. Typhimurium* puisque ce sérotype n'a pas d'hôte spécifique (Ekperigin et Nagaraja, 1998). C'est le sérovar le plus souvent isolé chez l'homme (Bean et Potter, 1992), les bovins (Clarke et Gyles, 1993) et les porcs (Quessy et coll., 2001). Au Québec, l'éradication du sérovar Cholerasuis dans la production porcine a favorisé l'émergence du sérovar Typhimurium comme principal agent causatif de salmonellose chez le porc. Les

salmonelloses causées par *S. Cholerasuis* sont de forme septicémiques et spécifiques au porc (Schwartz, 1999).

### 2.3 Croissance et survie des salmonelles

Les salmonelles ont des besoins nutritionnels simples. Cela facilite l'adaptation à l'environnement dans lequel elles évoluent. *Salmonella* est dotée de systèmes de régulation complexes qui lui permettent de s'adapter à son milieu et de survivre aussi bien à l'intérieur de l'hôte que dans l'environnement de ce dernier. Les salmonelles sont des organismes facultatifs anaérobiques et facultatifs intracellulaires. Elles peuvent croître en conditions aérobiques à une température optimale de 37°C. Lorsque cultivés sur géloses sang, la plupart des sérovars forment des colonies brillantes et grises de 2 à 4 mm de diamètre (LeMinor, 1984). Elles survivent aisément dans un milieu anaérobique ayant une activité de l'eau de 0.930 ou plus. La température optimale de croissance est de 35°C à 37°C, mais elles peuvent aussi se multiplier à des températures allant de 7°C à 45°C et même survivre à la congélation (Schwartz, 1999). Le pH de croissance habituel est de 6.5 à 7.5, mais comme d'autres bactéries entériques, elles peuvent résister à des pH aussi bas que 4.0 grâce à un système de survie induit lorsque l'environnement est acidifié. Ceci permet à une certaine proportion d'un inoculum oral de survivre à l'acidité de l'estomac (Bearson et coll., 1997). La survie du genre *Salmonella* en milieu extérieur dépend de la matière dans lesquelles elles se trouvent. Elles peuvent survivre jusqu'à 280 jours dans le sol et plus de 28 mois dans les fèces de volailles (Morse et Duncan, 1974). Elles peuvent être inactivées par la chaleur et par les désinfectants, notamment ceux à base d'iode, de chlore et de phénol (Schwartz, 1999).

### 2.4 L'impact de *Salmonella* sur la santé publique

*Salmonella* est responsable d'un nombre substantiel de toxi-infections alimentaires à travers le monde. Plus de 1,3 milliards de cas cliniques ont été rapportés en 1995, alors que 3 millions d'individus sont décédés de cette infection (Pang et coll., 1995). De ces faits, la salmonellose est la plus importante des zoonoses des pays industrialisés et sa déclaration est obligatoire au Québec et au Canada. L'incidence augmente de façon quasi-constante depuis la Deuxième Guerre Mondiale. Ceci est dû aux changements des méthodes d'agriculture et d'élevage ainsi qu'à l'augmentation du nombre d'individus âgés, immuno-compromis et de malades chroniques (Darwin et Miller, 1999). La recrudescence d'infections à *Salmonella* est d'autant plus préoccupante étant

donné les profils d'antibiorésistance qui émergent rapidement chez certains isolats. L'utilisation vétérinaire d'antibiotiques à titre prophylactique chez les animaux de boucherie est donc reconsidérée par plusieurs intervenants régissant les élevages. La prévalence de salmonelles chez les animaux de boucherie est un facteur notable en ce qui a trait à la santé publique. L'ingestion de viandes contaminées par des souches résistantes à certains agents antibactériens peut s'avérer problématique si l'infection progresse vers une forme de salmonellose nécessitant un traitement aux antibiotiques (Ekperigin et Nagaraja, 1998). Le caractère ubiquiste de *Salmonella* complique son élimination de la chaîne alimentaire. Son exposition aux différentes conditions rencontrées tout au long de la chaîne alimentaire peut provoquer des changements génotypiques et phénotypiques rapides lui permettant de survivre dans plusieurs milieux. Des mesures d'hygiène simples peuvent cependant diminuer l'incidence de *Salmonella*, particulièrement dans les pays sous-développés.

## **2.5 Sources de contamination**

*Salmonella* possède tous les attributs pour s'assurer une distribution considérable dans son milieu : capacité d'infecter plusieurs hôtes de façon asymptomatique, excrétion fécale efficace chez les animaux porteurs, persistance dans l'environnement et utilisation de plusieurs vecteurs, inertes ou non. Il est important de noter que le porc peut être infecté par la plupart des sérotypes de *Salmonella* sans développer de forme clinique. Cette contamination asymptomatique représente un risque pour les consommateurs de produits dérivés du porc puisque la plupart des sérotypes sont pathogènes pour l'homme (Schwartz, 1999).

### **2.5.1 Sources infectieuses chez le porc**

Les sources potentielles de contamination à *Salmonella* chez le porc sont multiples et variées. Les porteurs sains sont la source principale de contamination d'un troupeau. À la ferme, les porcs sont plus souvent infectés par ingestion de fèces contaminées provenant des porcs porteurs (Linton et coll., 1970). Chez le porc comme chez la plupart des espèces, les animaux porteurs excrètent un nombre significatif de *Salmonella* dans leurs fèces de façon périodique ou continue (Schwartz, 1999). En effet, il est estimé qu'environ 40% d'un troupeau de porcs est contaminé au moment de l'abattage (Botteldoorn et coll., 2003). L'excrétion peut être exacerbée par des événements stressants pour l'animal comme le transport, le surpeuplement et le manque

d'eau (Isaacson et coll., 1999). Hurd et coll. (2002) ont démontré que la rapidité de l'infection durant le transport, et particulièrement durant la période d'attente avant l'abattage, est relié à la prévalence élevée de *Salmonella* chez le porc : la fréquence d'isolement de la bactérie est sept fois plus importante chez les porcs nécropsiés à l'abattoir que ceux nécropsiés à la ferme. Les animaux infectés peuvent contaminer les installations et le personnel (Fedorka-Cray et coll., 1994). Il a d'ailleurs été observé que les populations de *Salmonella* caractérisées au niveau des infrastructures de l'abattoir reflètent la flore microbienne intestinale des porcs sur une période de temps donnée (Botteldoorn et coll., 2003). D'autres vecteurs sont à considérer dans la transmission de *Salmonella* à la ferme: la litière, l'air, l'eau et la nourriture, le matériel d'élevage, le personnel d'entretien, les oiseaux, insectes et rongeurs environnants. Ceux-ci sont probablement impliqués dans la réinfection par *Salmonella* (Letellier et coll., 1999). La transmission de la bactérie est aussi possible par aérosol ou par la poussière (Proux et coll., 2001; Fedorka-Cray et coll., 1995). La nourriture est un facteur significatif dans la propagation de bactéries aux animaux d'élevage. Les farines animales, telles les farines de poisson, d'os, de viandes et de lait sont toutes des sources potentielles de *Salmonella*. La contamination de nourritures à base de farines animales a contribué à la dissémination de différentes souches à travers le monde et à l'introduction de sérovars chez des espèces animales naïves (Murray, 2000). Il est important de souligner que les farines végétales peuvent aussi être impliquées dans la transmission (Schwartz, 1999). Puisque *Salmonella* a la capacité de survivre plusieurs mois dans le fumier et les sols, ceci facilite sa transmission par voie orale ou nasale aux animaux. La susceptibilité du porc à ces vecteurs est accrue dû à sa petite taille et à son comportement, puisqu'il explore son environnement par son groin (Fedorka Cray et coll., 1995).

### **2.5.2 Sources infectieuses chez l'homme**

Plus de 95% des cas de salmonelloses cliniques sont d'origine alimentaire (Mead et coll., 1999). Épidémiologiquement, la source première d'infection à *Salmonella* chez l'homme est la consommation de produits de boucherie et de volaille contaminés. Le personnel des fermes court davantage de risques d'être infecté par les animaux porteurs ou malades. La manipulation des aliments est aussi un facteur de risque. La cuisson à température trop basse, le stockage non convenable des aliments et la contamination croisée sont des points à investiguer lors de cas sporadiques ou d'épidémies de salmonelloses (Humphrey et coll., 2004). L'attachement de la souche multirésistante *S. Typhimurium* DT104 aux tissus musculaires porcins lui permet une plus grande résistance



à la chaleur. Ainsi, les salmonelles associées à des pièces de viandes contaminées lors de leur transformation ne seront pas inactivées si elles ne sont pas adéquatement cuites (Humphrey et coll., 1997). Les salmonelles peuvent aussi survivre dans certains produits laitiers comme le lait et le fromage. Par exemple, le lait improprement pasteurisé est un véhicule pour les sérovars Typhimurium et Dublin (Humphrey, 2000). En 1985, plus de 1500 Canadiens contractèrent la salmonellose suite à la consommation de fromages contaminés (Bezanson et coll., 1985). Règle générale, tous les aliments crus ou improprement pasteurisés sont des sources potentielles de contaminations (Altekruse et coll., 1997).

## **2.6 Salmonellose chez l'homme**

### **2.6.1 Signes cliniques**

La gastroentérite aiguë est l'affection clinique la plus commune reliée aux infections à salmonelles chez l'homme. La période d'incubation varie de 6 à 48 heures après ingestion de substance contaminée et est suivie par l'apparition des signes cliniques : diarrhée, douleurs abdominales et musculaires, nausées, vomissements et maux de tête. Les symptômes, parfois accompagnés de fièvre, perdurent habituellement de 4 à 7 jours et leur spectre de sévérité est large. Les individus sains peuvent aussi être porteurs et excréter des salmonelles jusqu'à 3 mois après la disparition des symptômes cliniques (Hohmann, 2001). Environ 5% des individus atteints de la forme entérique développeront une bactériémie pouvant occasionner de sérieuses complications (Hohmann, 2001). Cette forme affecte davantage les individus immunocompromis, âgés ou en bas âge (Levine et coll., 1991 ; Humphrey, 2000).

### **2.6.2 Facteurs de risque**

Chez les individus en bonne santé, une infection à *Salmonella* ne provoque pas toujours une salmonellose clinique. La sévérité de l'infection est influencée par le sérotype et la virulence de la souche, l'état immunitaire de l'hôte, la route d'infection et la dose infectante (Schwartz, 1999). La prévalence de salmonellose est 20 fois plus importante dans la population d'individus séropositifs au VIH (Dellamonica et Pradier, 1992). Chez ces patients, la dissémination de *Salmonella* dans l'organisme est facilitée par l'inflammation intestinale, les infections parasitaires et la malnutrition (Hohmann, 2001). Plusieurs facteurs peuvent cependant diminuer la dose requise pour causer l'infection: la matrice dans laquelle l'organisme est ingéré, le souche bactérienne, l'état physiologique

de la bactérie et l'état immunitaire de l'hôte, lequel est affecté par l'âge, la prise de médicaments immuno-suppressifs et la condition générale (Humphrey, 2004). L'hypoacidité gastrique peut aussi prédisposer les individus à la salmonellose (Hohmann, 2001). Notons aussi qu'une matrice alimentaire à forte teneur en graisse peut procurer un effet protecteur pour *Salmonella* par rapport à l'environnement gastrique et intestinal (Humphrey et coll., 1993).

## **2.7 Formes cliniques de salmonellose chez le porc**

Comme chez l'homme, l'état immunitaire du porc, sa santé générale, son âge mais aussi sa race sont d'importants éléments à considérer quant aux conséquences de l'infection primaire chez le porc. La présence d'autres pathologies est souvent un facteur important prédisposant les animaux à l'infection. Les facteurs impliqués dans l'efficacité du système immunitaire tels le débalancement de la flore intestinale, le transport, la chirurgie et l'administration d'antibiotiques oraux peuvent rendre l'individu plus susceptible à une infection. Le nombre de bactéries viables nécessaire à l'infection chez le porc varie selon le sérotype et la route d'invasion (Ekperigin et Nagaraja, 1998). La plupart des salmonelloses porcines sont dues au sérovar Typhimurium. Celles-ci résultent souvent en une haute morbidité et une faible mortalité. D'autres sérovars peuvent aussi infecter les porcs et parmi les plus communs, on note *S. Dublin*, *S. Enteritidis* et *S. Choleraesuis* (Schwartz, 1999).

### **2.7.1 Salmonellose entérique**

La salmonellose entérique est la forme de salmonellose clinique la plus répandue (Laval et coll., 1991). Elle est habituellement causée par *S. Typhimurium* et consiste en une diarrhée jaunâtre liquide pouvant être nécrotique et une entérite qui persistent de 3 à 7 jours. Chez certains individus, les déjections sont teintées de sang (Laval et coll., 1991). Les animaux malades peuvent montrer des signes d'anorexie. Ces signes cliniques peuvent persister pour une durée de deux semaines. La salmonellose entérique est rarement létale sauf dans les cas de déshydratation et d'hypocalcémie excessive. La plupart des survivants demeureront porteurs sains. La sécrétion d'entérotoxines peut aussi, indépendamment du dommage mucosal, causer ou aggraver la diarrhée. L'infection chez les porcs non sevrés résulte rarement en salmonellose clinique à cause de l'immunité lactogène de la mère. Les porcelets sont plus vulnérables à la forme

clinique après le sevrage, lorsque l'immunité humorale maternelle n'est plus présente (Laval et coll., 1991).

### **2.7.2 Salmonellose septicémique**

La salmonellose septicémique, ou systémique, est une affection assez rare qui se traduit par une généralisation de l'infection à plusieurs systèmes physiologiques. Cette forme est principalement rapportée chez les porcs en post-sevrage et en début d'engraissement. Les symptômes varient selon le ou les organes infectés. Parmi les symptômes généraux, on note la fièvre (40-41°C), l'anorexie et la dépression. Ceux-ci peuvent être accompagnés de pneumonie, d'avortement, de méningite et parfois par une mort subite (Ekperigin et Nagaraja, 1998). La majorité des salmonelles parasitent des macrophages et phagocytes tissulaires, mais des bactéries libres peuvent être observées quand le niveau de bactéries est élevé dans un tissu donné (Mastroeni et coll., 2000). Les bactéries libres et les macrophages infectés sont transportés vers les ganglions lymphatiques mésentériques. De là, les macrophages et les salmonelles atteignent la circulation sanguine pour rejoindre le foie et la rate (Clarke et Gyles, 1993).

## **2.8 Forme asymptomatique de salmonellose chez le porc**

### **2.8.1 Caractéristiques générales**

L'état de porteur est défini par l'absence de signe clinique chez un animal capable de transmettre l'infection à des individus susceptibles, habituellement par le biais de fèces contaminées. Le diagnostic est donc plus difficile que celui des formes cliniques. Le porc porteur constitue une source importante de contamination pour le troupeau ou pour son environnement. Certains sérovars semblent être plus enclins à induire l'état de porteur chez un animal. Les animaux en bas âge excrètent la bactérie habituellement seulement pendant leur convalescence suite à une salmonellose entérique tandis que les adultes ont plus de chance de devenir des excréteurs chroniques (Laval et coll., 1991). Les porteurs asymptomatiques rendent l'assainissement d'un élevage contaminé problématique.

### **2.8.2 Sites de colonisation et de réplication de *Salmonella***

Par un modèle d'infection expérimental, Wood et Rose (1992) et Wood et coll. (1989) ont étudié la dissémination de *S. Typhimurium* dans les organes de porcs rétablis de salmonellose entérique. Vingt huit semaines après l'infection, la souche est isolée

exclusivement des amygdales du palai mou, de l'iléon, du cæcum, du colon et des nœuds lymphatiques adjacents à ces organes. À ces endroits, les populations salmonelliques sont basses mais stables (Wood et Rose, 1992). Les amygdales semblent être un site primaire de colonisation chez les porcs devenant porteurs asymptomatiques (Gray et coll., 1995; Wood et coll., 1989; Wood et Rose, 1992) puisque *S. Typhimurium* a la capacité de se répliquer dans la lamina propria *in vitro* et *in vivo* (Fedorka-Cray et coll., 1995). Au niveau intestinal, les populations bactériennes de l'iléon semblent s'agréger dans les plaques de Peyer, tandis que les populations du côlon ne peuvent s'ancrer que dans le contenu mucosal et luminal, les plaques de Peyer étant peu nombreuses (Wood et Rose, 1992). Le cæcum est tout de même une source importante de *Salmonella* à l'abattoir, et le porc peut excréter des quantités importantes de salmonelles, allant jusqu'à 10000 bactéries par gramme de fèces (Côté et coll., 2004; Wood et Rose, 1992). Malgré cela, l'efficacité des écouvillons rectaux pour l'isolement de *Salmonella* est discutable. L'analyse bactériologique d'écouvillons amygdalaires est un moyen plus efficace pour la détection de porcs porteurs (Wood et coll., 1989). La constante réinfection orale-fécale est un facteur non négligeable dans les taux d'isollements importants rapportés au niveau de ces organes (Wood et coll., 1989).

### **2.8.3 Excrétion de *Salmonella* par les fèces**

Les porcs porteurs peuvent excréter des salmonelles par leurs déjections de façon sporadique jusqu'à 28 semaines après la fin des symptômes de la forme entérique (Wood et Rose, 1992). La libération de catécholamines lors de situations stressantes facilite l'infection orale-fécale et la survie des salmonelles chez le porc. Ces neurotransmetteurs causent entre autre une augmentation du pH gastrique et une augmentation de la motilité intestinale. Ces deux phénomènes combinés créent un cercle vicieux où la quantité de matériel contaminé augmente dans un lot où les porcs sont plus vulnérables à l'infection (Schwartz, 1999). Il a été démontré que le temps d'attente des animaux à l'abattoir est proportionnel à la prévalence de carcasses contaminées (Grau et Smith, 1974). Les fèces des porcs porteurs sont souvent négatives pour la culture de *Salmonella* mais positives lorsque le porc est soumis à un stress, fait important à considérer lors du transport et de l'abattage des animaux.

#### 2.8.4 Causes hypothétiques de l'état de porteur

La constante réinfection orale-fécale à la ferme est probablement un facteur important dans la persistance de *Salmonella* à long terme chez les animaux, particulièrement chez les porcs de troupeaux confinés (Heard et Linton, 1966). En effet, la diminution du nombre d'animaux porteurs dans un troupeau amenuise les chances de réinfections orales-fécales (Wood et Rose, 1992). Les travaux menés par Isaacson et Kinsel (1992) ont permis de proposer un mécanisme pouvant expliquer l'état de porteur. Cette hypothèse s'appuie sur la découverte de deux phénotypes chez *S. Typhimurium* : adhésif et non adhésif. Les infections asymptomatiques seraient dues à la présence dominante de bactéries non adhésives. Les phénotypes diffèrent quant à l'expression d'antigènes de surface, la composition des protéines de l'enveloppe, leur survie à l'intérieur des macrophages, leur habilité à produire des fimbriae et en leur capacité à adhérer aux entérocytes (Althouse et coll., 2003). Les traits associés à ces phénotypes sont co-régulés et un même isolat peut alterner l'expression des deux phénotypes. Les cellules adhésives, qui possèdent 10 à 15 protéines exclusives associées à l'enveloppe, sont phagocytées plus facilement par les neutrophiles et macrophages mais sont résistantes à leurs mécanismes de destruction intracellulaire (Isaacson et Kinsel, 1992). Le gène *rfaL* est exclusivement associé au phénotype adhésif. Il code pour la protéine RfaL, une ligase requise pour lier les sous-unités de l'antigène O à la chaîne de lipopolysaccharides (LPS) naissante (Klena et coll., 1992). Les cellules de phénotype non adhésif ont un antigène O plus court de une ou deux sous-unités de longueur (Kwan et Isaacson, 1998). Or, l'antigène O confère la résistance au complément sérique en inhibant son activation ou en empêchant la formation du complexe d'attaque membranaire par stérance hindrique. Le complément est donc activé à distance de la membrane bactérienne (Liang-Takasaki et coll., 1983). En ayant un antigène O incomplet, le complément peut être activé à proximité des salmonelles de phénotype non adhésif et la cellule sera détruite par lyse osmotique. En modulant la fraction de cellules adhésives et non adhésives en conditions *in vivo*, la population de *S. Typhimurium* peut atteindre un équilibre suffisant pour maintenir une population *in vivo* mais non suffisante pour être pathogène (Kwan et Isaacson, 1998).

## 2.9 Structures antigéniques de *Salmonella*

### 2.9.1 Lipopolysaccharides

Les LPS sont des composantes antigéniques importantes de la membrane externe. Ils sont composés d'un lipide interne, le lipide A, d'un noyau oligosaccharidique et d'une région antigénique polysaccharidique O. La structure du lipide A est bien conservée parmi les *Enterobacteriaceae* (Freudenberg et coll., 2001). Les mammifères comme les porcs, les chevaux et les humains sont très sensibles à l'action des LPS. L'injection de LPS purifiés chez des animaux et chez des individus volontaires simule la libération de LPS dans l'organisme lors de la désintégration de la bactérie et provoque les mêmes réactions observées lors d'infections naturelles aux bactéries à Gram négatif: fièvre, maux de tête, nausée, diarrhée, choc et mort. Toutes ces réactions sont induites par des cytokines et d'autres médiateurs produits par l'interaction des composantes humorales et cellulaires avec le LPS, principalement le lipide A. Le caractère protecteur des anticorps spécifiques à l'antigène O est indéterminé et les études rapportées à ce sujet sont contradictoires (Uchiya et Sugihara, 1990; Srisart et coll., 1985). Les LPS jouent un rôle important dans la résistance au système immunitaire inné de l'hôte. L'induction du système PhoP/PhoQ active des mécanismes qui modifient les lipides A, remodelant ainsi l'enveloppe bactérienne durant la colonisation. Le système PhoP/PhoQ diminue la longueur de l'antigène O et modifie le lipide A par palmitation, hydroxylation et déacétylation (Guo et coll., 1997). Ces changements confèrent à *S. Typhimurium* une meilleure résistance aux peptides antimicrobiens (Gunn et al, 1996).

### 2.9.2 Flagelle

Les flagelles de *Salmonella* sont constitués de trois composantes structurales : le corps basal, le crochet et le filament. Le filament est composé de polymères de flagellines, un monomère arrangé en hélice avec une amplitude fixe et qui peut atteindre 10  $\mu\text{m}$  à l'extérieur de la cellule. La structure, l'assemblage et les fonctions du flagelle sont codés par plus de 40 gènes répartis sur 17 opérons. Son rôle varie selon le sérotype. Chez *S. Typhi*, le flagelle est essentiel à l'invasion des cellules épithéliales, mais chez *S. Typhimurium*, il ne sert qu'à propulser la bactérie dans un environnement propice (Macnab, 1996).

Les salmonelles entériques expriment de façon alternative deux types de flagelles n'ayant pas le même profil antigénique. Le sérovar *Typhimurium* peut exprimer soit la

phase 1 (antigène i) ou la phase 2 (antigène 1,2). Une seule phase est exprimée à la fois, mais une population de salmonelles peut exprimer les deux phases en même temps. Des régions conservées sont communes aux 2 phases en N- et C-terminal, mais ne sont pas accessibles lorsque les monomères sont polymérisés. Elles ne sont probablement pas impliquées dans l'activation des mécanismes immunitaires. Les antigènes spécifiques de phase se situent dans la région centrale de la flagelline et sont exposés à la surface du flagelle polymérisé (Wei et Joys, 1985). L'expression des flagelles est régie par le promoteur *hin* dont l'orientation dépend de facteurs environnementaux indéterminés (Sojka et coll., 2001). L'orientation préférentielle de *hin* favorise l'expression de la protéine FliC associée à la phase 1 tandis que l'orientation inverse rend possible la transcription de la protéine FliB, associée la phase 2. La phase 1 est davantage exprimée que la phase 2 et cette tendance semble être une propriété innée. Contrairement à la variation de phase de l'antigène O, la signification biologique de l'expression diphasique du flagelle est jusqu'à présent nébuleuse. Les nombreux épitopes flagellaires sont inefficaces pour induire une réponse humorale chez des souris vaccinées avec une souche atténuée de *Salmonella* (De Almeida et coll., 1999). Cependant, il a été démontré que des anticorps spécifiques à FliC ont la capacité de protéger des souris contre une infection létale de souche virulente de *Salmonella* (McSorley et coll., 2000).

### 2.9.3 Fimbriae

Les fimbriae sont des organelles protéiques exprimées à la surface de plusieurs bactéries et qui médient leur adhésion aux cellules hôtes. *Salmonella enterica* peut produire au moins 9 fimbriae différents, mais la plupart restent à être caractérisés (Althouse et coll., 2003). La description de chacun des types de fimbriae n'est pas le but de cette revue mais les caractéristiques les plus importantes lors d'infections salmonelliques seront mentionnées. Le fimbriae de type 1 est présent chez la plupart des *Salmonella*. Il semble initier la première phase de colonisation intestinale en s'associant aux récepteurs de glycoprotéines mannosides trouvés sur plusieurs cellules eucaryotes. Chez les souris, le tropisme de *S. Typhimurium* est lié à la sous-unité protéique FimHS du fimbriae de type 1. Celle-ci permet l'association de la bactérie avec les protéines mannosylatées et l'agrégation secondaire de *S. Typhimurium* sur la surface des entérocytes (Thankavel et coll., 1999). Ceci est probablement un élément essentiel à la persistance de la bactérie de phénotype non adhésif chez les porteurs sains (Althouse et coll., 2003). Le fimbriae de type 1 est aussi nécessaire à l'attachement, l'internalisation et la survie de *E.coli* et de *Salmonella* dans les macrophages (Keith et coll., 1990).

L'adhésion de *S. Typhimurium* aux plaques de Peyer de souris est médiée par le fimbriae long polaire (Bäumler et coll., 1996) et ce dernier semble aussi jouer un rôle dans le recrutement de neutrophiles au site d'infection (Bäumler et coll., 1997). Les fimbriae agrégatifs fins de *S. Enteritidis* peuvent aussi s'associer au plasminogène, ce qui suggère l'implication possible de ces fimbriae dans l'invasion (Sjöbring et coll., 1994).

Tout comme *Escherichia coli*, *S. Typhimurium* alterne entre l'état fimbrié et non fimbrié (Duguid et coll., 1966). Selon l'environnement dans lequel elles se trouvent, les salmonelles ayant un génome fim+ peuvent effectuer une variation de phase entre l'état fimbrié (fim+) et non-fimbrié (fim-) (Eisenstein, 1987). Par exemple, l'expression des fimbriae de type 1 augmente lorsque la bactérie se trouve dans un environnement anaérobique, comme le tractus intestinal. Les facteurs environnementaux régissant la variation de phase sont pour la plupart inconnus (Duguid et coll., 1966) mais il est probable que la variation de phase des fimbriae soit un mécanisme pour éviter les conséquences d'une immunité croisée entre différents sérotypes de salmonelles (Nicholson et Bäumler, 2001; Norris et Bäumler, 1999). Il est important de noter que un ou plusieurs types de fimbriae peuvent être exprimés sur une même bactérie.

## **2.10 Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase (GAPDH)**

### **2.10.1 Caractéristiques générales**

Un nombre grandissant d'études rapporte le caractère multifonctionnel de certaines enzymes métaboliques. Parmi celles-ci, on note la GAPDH, une enzyme présente dans le cytoplasme de toutes les entérobactéries et qui s'est révélée stable au cours de leur évolution (Cocks et Wilson, 1972). La GAPDH est une enzyme de ménage qui catalyse la phosphorylation oxydative du glycéraldéhyde-3-phosphate en 1,3-biphosphoglycérate lors de la sixième étape du cycle de Embden-Meyerhof. Elle catalyse aussi la réaction inverse lors de la gluconéogenèse. Ces réactions nécessitent la présence d'un phosphate inorganique et du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD<sup>+</sup>), un cofacteur qui agit à titre d'accepteur d'électrons. Les GAPDH sont des structures tétramériques où chaque monomère a un poids moléculaire de 34 à 41 kDa. La forme tétramérique est essentielle à l'activité enzymatique (Walker et coll., 1980). Les études menées par différents laboratoires soulignent le rôle non glycolytique de la GAPDH chez les cellules procaryotes mais aussi chez les eucaryotes, chez lesquels l'enzyme est impliquée notamment au niveau de la fusion membranaire, de la formation de



microtubules, de l'exportation d'ARN nucléaire et de la réplication et la réparation de l'ADN (Sirover, 1999).

### 2.10.2 Recensement de GAPDH extracytosoliques chez les procaryotes

C'est en 1992 qu'est rapportée la première observation de protéines membres de la famille des GAPDH à la surface d'une bactérie. Les streptocoques de groupe A expriment la protéine "streptococcal surface dehydrogenase" (SDH). L'analyse de la séquence en acides aminés en N-terminal a permis d'identifier cette protéine comme étant une GAPDH (Pancholi et Fischetti, 1992). La résistance de la GAPDH de surface à un traitement au SDS 2% ou NaCl 2M suggère que la protéine est solidement associée à la cellule. De plus, la concentration de SDH en surface est plus élevée que celle de la protéine M, une protéine de surface majeure chez les streptocoques de groupe A (Pancholi et Fischetti, 1992). Subséquemment, des molécules de surface, qui, part leur structure et leurs fonctions, font partie de la famille des GAPDH, ont été observées et étudiées chez plusieurs bactéries à Gram positif dont *Staphylococcus aureus* (Taylor et Heinrichs, 2002), *Streptococcus oralis* (Maeda et coll., 2004), *Streptococcus pneumoniae* (Bergmann et coll., 2004), *Streptococcus suis* (Brassard et coll., 2004) et *Streptococcus agalactiae* (Seifert et coll., 2003). Leur présence en surface de la majorité des streptocoques étudiés dans la littérature suggère un rôle significatif dans la survie ou le fonctionnement de ces bactéries. Chez les bactéries à Gram négatif, la GAPDH extracytosolique a été recensée chez *Aeromonas hydrophila* (Villamón et coll., 2003) et chez *Edwardsiella tarda* (Kawai et coll., 2004). Bien que ces enzymes soient localisées à la surface de la cellule, elles catalysent tout de même la synthèse du 1,3-biphosphoglycérate à partir du glycéraldéhyde-3-phosphate, suggérant leur structure tétramérique. Initialement, la présence de GAPDH en surface chez les procaryotes et eucaryotes était attribuée à des artefacts dûs à la copurification de matériel cytosolique durant la préparation des fractions membranaires. Des études de microscopie immunochimique et électronique ont cependant confirmé la présence de ces molécules cytosoliques à la surface des cellules (Alvarez et coll., 2003). Jusqu'à maintenant, aucune donnée ne démontre comment des enzymes normalement présentes dans le cytoplasme sont exportées à la paroi cellulaire de pathogènes microbiens (Villamon et coll., 2003).

### 2.10.2.1 Mécanismes de ciblage chez les bactéries à Gram positif

Les gènes codant pour la GAPDH de *Streptococcus pyogenes* et *S. agalactiae* ne contiennent pas de séquences signal ni de motif LPXTGE, contrairement à la majorité des gènes codant des protéines membranaires des bactéries à Gram positif (D'Costa et coll., 2000; Seifert et coll., 2003). Des études de microscopie immunoélectronique rapportent que la GAPDH de *S. pyogenes* serait colocalisée avec la protéine antiphagocytaire M et ses protéines associées, soulevant la possibilité d'interactions physiologiques et pathogènes entre les deux protéines (D'Costa et coll., 2000). Cependant, la GAPDH de surface est retrouvée chez une souche de streptocoques de groupe A négative pour la présence de protéines M (Pancholi et Fischetti, 1992), ce qui rend l'hypothèse plus ou moins plausible.

### 2.10.2.2 Mécanismes chez les bactéries à Gram négatif

Chez les bactéries à Gram négatif, il existe quatre mécanismes par lesquels les protéines sont transportées du cytoplasme jusqu'à la membrane externe ou interne dans le milieu extracellulaire ou à la surface de la bactérie (Hueck, 1998). Les systèmes de sécrétion de type II et IV sont *sec* dépendants et les molécules exportées comportent une courte séquence d'acides aminés hydrophobes à titre de séquence signal. Cette dernière est clivée par une peptidase lors du passage de la protéine dans le périplasma (Hueck, 1998). Plusieurs molécules accessoires sont requises, telle la protéine chaperonne SecB. Les systèmes de sécrétion de type I et III sont *sec* indépendants et ne requièrent pas de transformations en N-terminal de la protéine sécrétée. Cependant, l'assemblage de l'appareil de sécrétion de type III peut nécessiter la voie *sec*. En effet, plusieurs composantes du système de sécrétion de type III (SSTT) sont pourvues de séquences signales spécifiques à la voie *sec* en N-terminal. Le SSTT est dédié au trafic de protéines impliquées dans la virulence et est induit par des conditions associées à l'hôte (Charkowski et coll., 1997). Il est composé d'une vingtaine de protéines pour la plupart localisées dans la membrane interne. Tandis que le mécanisme de sécrétion de type III est bien conservé, les protéines sécrétées sont variables selon la bactérie et selon l'hôte (Hueck, 1998). Ce procédé est continu et n'implique pas habituellement d'intermédiaires périplasmiques distincts. Le SSTT a trois caractéristiques principales : (i) l'absence d'un peptide signal, (ii) la participation essentielle de protéines chaperonnes et (iii) la nécessité

d'un contact avec la cellule hôte pour l'activation complète de la voie de sécrétion (Galan et Collmer, 1999). Chez *A. hydrophila*, la séquence codante ne contient pas de séquence signal. La voie de sécrétion utilisée par la GAPDH périplasmique de cette bactérie reste à être déterminée.

### **2.10.3 Description des activités des GAPDH de surface**

#### **2.10.3.1 Attachement aux protéines de l'hôte**

Les études rapportant la présence de protéines de surface tentent de définir le rôle des GAPDH extracellulaires, souvent en étudiant l'activité liante à une ou plusieurs protéines de l'hôte pour confirmer ou infirmer un rôle hypothétique dans la virulence. Déjà en 1992, Pancholi et Fischetti avaient observé la liaison de la SDH à l'actine, à la fibronectine, au domaine globulaire de la myosine et au lysozyme (Pancholi et Fischetti, 1992). L'habileté de la SDH à lier ces protéines de l'hôte est probablement sollicitée dans le processus de colonisation des surfaces muqueuses et pourrait possiblement contribuer à la virulence des streptocoques. Son adhésion à la fibronectine exprimée à la surface des cellules de l'hôte peut être importante dans les premières étapes de la colonisation des muqueuses. L'attachement de la SDH à l'actine et à la myosine, deux protéines du cytosquelette présentes dans le cytoplasme des cellules eucaryotes, peut sembler banal puisque celles-ci ne sont pas exposées à la surface des cellules. Cependant, la bactérie peut utiliser cette capacité pour adhérer à des cellules endommagées où les composantes cytoplasmiques sont en partie exposées dans le lumen (Pancholi et Fischetti, 1992). Chez *S. suis*, l'adhésion aux anneaux trachéaux est principalement due à la SDH de surface de cette bactérie (Brassard et coll., 2004).

#### **2.10.3.2 Implication dans la voie fibrinolytique**

Une des stratégies utilisées par les bactéries pathogènes pour dégrader la matrice extracellulaire et promouvoir l'invasion est le recrutement de l'activité protéolytique à la surface de la bactérie. La présence de récepteurs de plasminogène procure à cette molécule un support fixe pour la synthèse de la plasmine par les activateurs eucaryotes ou procaryotes. La plasmine est une sérine protéase essentielle de la voie fibrinolytique qui peut dégrader la fibronectine et la laminine, deux composantes de la matrice extracellulaire de l'hôte (Bergmann et coll., 2004). Elle facilite donc l'invasion des tissus en dégradant la fibrine et les glycoprotéines de la matrice extracellulaire et de la membrane basale (Lahteenmaki et coll., 1995). Les récepteurs de plasmine ou

plasminogène en surface des bactéries permettent à ces dernières d'acquérir une activité protéolytique de surface et d'augmenter leur potentiel invasif (Jobin et coll., 2004). L'association du plasminogène ou de la plasmine à la GAPDH de surface a été recensée chez plusieurs streptocoques (Jobin et coll., 2004 ; Bergmann et coll., 2004 ; Seifert et coll., 2003).

### 2.10.3.3 Activité ribosylante

Chez les streptocoques de groupe A, la SDH est aussi une enzyme ADP-ribosylante. La mono-ADP-ribosylation est une modification post-translationnelle qui altère la structure et la fonction d'une protéine, où l'ADP-ribose du NAD est ajouté de façon covalente à un résidu libre d'un substrat (Pancholi et Fischetti, 1993). Les toxines diphtériques, cholériques, pertussis et clostridiales ont des fonctions ADP-ribosylantes qu'elles utilisent pour modifier des molécules de l'hôte comme la sous unité  $\alpha$  des protéines GTP-liantes et le facteur d'élongation 2. Ces modifications ont pour conséquence d'activer ou d'inactiver de façon permanente les fonctions cellulaires (Corda et Di Girolamo, 2003). Le rôle précis de la ribosylation de l'ADP chez les streptocoques de groupe A est inconnu, mais que ce mécanisme soit potentialisé par l'oxyde nitrique (NO) permet d'établir deux hypothèses. La ribosylation de l'ADP pourrait médier un mécanisme de transduction de signal, ou bien elle pourrait modifier une composante de surface des cellules épithéliales durant les premières phases de l'infection.

### 2.10.3.4 Implication dans la transduction de signal

L'adhérence bactérienne aux cellules épithéliales intestinales est un mécanisme important dans la pathogenèse des infections aux EPEC et aux EHEC. Ce phénomène est médié par un fimbriae de type IV et par l'altération du cytosquelette de l'hôte, où on note l'effacement des microvilli de surface. Une structure ressemblant à un piédestal est ensuite formée, et le contact intime de la bactérie à la cellule épithéliale et le réarrangement du cytosquelette sont médiés par l'intimine, protéine de la membrane externe de l'EPEC (Donnenberg et Kaper, 1991). La réponse de la cellule hôte au contact avec l'EPEC implique un flux d'inositol triphosphate, une augmentation du niveau de calcium intracellulaire (Foubister et coll., 1994), la phosphorylation des protéines (Rosenshine et coll., 1992) et l'accumulation de protéines du cytosquelette sous la bactérie adhérente (Kenny et Finlay, 1995). Cinq protéines essentielles à la transduction de signal, dont la GAPDH, sont sécrétées par SSTT chez les EPEC et les EHEC

lorsqu'elles sont associées aux cellules HeLa (Kenny et Finlay, 1995). La sécrétion de ces protéines est spécifique aux souches pathogènes et n'est pas observée en milieu Luria-Broth (LB). Il est possible que l'adhérence de l'EPEC soit nécessaire pour que les molécules sécrétées agissent sur la cellule hôte. La sécrétion de ces molécules près de la surface de la cellule hôte permet une livraison concentrée de protéines bactériennes effectrices. Les cinq protéines identifiées sont régulées par des conditions connues pour contrôler d'autres facteurs de virulence chez les EPEC, comme l'intimine.

#### 2.10.4 Immunogénicité et potentiel immunoprotecteur de la GAPDH de surface

De tous les microorganismes, c'est chez le trématode *Schistosoma mansoni* que le potentiel immunoprotecteur de la GAPDH de surface a été le plus étudié. La présence d'immunoglobulines G (IgG) dirigés contre la GAPDH de *S. mansoni* chez les humains corrèle avec une faible susceptibilité à l'infection, tandis que le sérum des individus susceptibles ne réagit pas avec la protéine de surface de 37 kDa (Goudot-Crozel et coll., 1989). La région épitopique dominante pour l'immunité humorale a été identifiée et est en partie responsable de la résistance à une infection expérimentale chez les souris (Argiro et coll., 2000). L'efficacité se traduit par une diminution de la quantité de vers et d'oeufs chez les souris immunisées et challengées (Argiro et coll., 1999).

L'administration d'une GAPDH recombinante de *Echinococcus multilocularis* par le biais d'une souche atténuée de *S. Typhimurium* induit une protection contre le parasite lors d'une infection expérimentale chez les souris BALB/c. L'immunité induite par le vaccin contre une infection avec les œufs d' *E. multilocularis* semble être davantage due à une immunité cellulaire qu'à une immunité humorale. Ces résultats concordent avec le rôle important de l'immunité cellulaire contre les larves de cestode (Müller-Schollenberger et coll., 2001).

Les IgG sériques des bovins et ovins infectés réagissent contre la GAPDH de *Brucella abortus*. Les auteurs confirment que les épitopes protecteurs de la GAPDH de *B. abortus* ne chevauchent pas des régions homologues à la GAPDH humaine. L'efficacité d'un vaccin ADN exprimant *gap* est synergisé par l'administration d'un plasmide exprimant l'interleukine-12 (IL-12). L'immunisation contribue à diminuer la charge bactérienne au niveau de la rate de souris challengées puisque le vaccin à ADN testé induit une réponse de type T auxiliaire 1 (Th1). À cause de la nature intracellulaire de *B. abortus*, l'induction d'une immunité cellulaire est nécessaire (Rosinha et coll., 2002).

La GAPDH extracellulaire d'*E. tarda* a un poids moléculaire de 37 kDa et est détectée chez différents sérotypes d'*Edwardsiella* (Kawai et coll., 2004). L'administration intrapéritonéale de GAPDH d'*E. tarda* protège les plies *Paralichthys olivaceus* contre l'edwardiellose (Kawai et coll., 2004; Liu et coll., 2005). En effet, le taux de survie des plies du groupe contrôle est de 30% tandis qu'il est de 85% et 74% chez les plies vaccinées avec la GAPDH prélevée de la membrane et avec la GAPDH recombinante. Les deux types d'antigènes utilisés induisent une réponse humorale spécifique dans le sérum des poissons (Liu et coll., 2005).

### **2.11 Structures organisées des « mucosal associated lymphoid tissues » (MALT) du tube digestif**

Les "mucosa associated lymphoid tissues" (MALT) désignent les follicules lymphoïdes solitaires ou regroupés distribués dans toutes les surfaces muqueuses de l'organisme, soit le tractus gastro-intestinal, la cavité orale, les voies respiratoires et la conjonctive de l'oeil. Parmi toutes les localisations du MALT, c'est le "gut associated lymphoid tissue" (GALT) qui est le plus caractérisé. Les plaques de Peyer et les follicules solitaires dispersés dans la lamina propria de l'intestin constituent les principaux sites effecteurs du MALT. Ces composantes sont essentielles à l'induction d'une immunité muqueuse dans l'intestin.

#### **2.11.1 Plaques de Peyer**

Les plaques de Peyer sont des agrégats de follicules lymphoïdes recouverts de lymphoépithélium spécialisé, le "follicle associated epithelium" ou FAE. Il existe deux catégories de plaques de Peyer chez le porc. La plaque iléo-cæcale, longue de 2.5 m, est située dans l'iléon terminal et régresse avec l'âge. Les plaques situées le long du jéjunum et de l'iléon proximal sont nombreuses, de 25 à 35, relativement petites et fonctionnelles tout au long de la vie du porc (Stokes et coll., 1994). Chacune de ces plaques contient de nombreux follicules germinatifs peuplés de cellules B, de cellules dendritiques et de macrophages. Les follicules, approvisionnés en lymphocytes via les veinules post-capillaires, sont séparés par des régions inter et para-folliculaires riches en cellules T et en cellules dendritiques interdigitées (Gebert, 1997b). Les cellules T auxiliaires ont un récepteur de cellule T (RCT) associé au complexe moléculaire CD3 et expriment la molécule accessoire CD4. Les cellules T CD4<sup>+</sup> répondent aux peptides associés au

complexe d'histocompatibilité majeure II (CHM-II) (Janeway et coll., 1988). L'activation intracellulaire de ces cellules par le biais du RCT et du complexe CD3 conduit le lymphocyte à sécréter des cytokines qui médient les fonctions des cellules B (Coffman et coll., 1988). Les cellules auxiliaires 1 (Th1) produisent l'IL-2, l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et le facteur onconécrosant (TNF) par lesquels elles activent l'immunité cellulaire et l'inflammation. Les cellules auxiliaires 2 (Th2) synthétisent l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-6 et induisent l'activation et la différenciation des cellules B. Les deux sous populations sont retrouvées en nombre égal dans les plaques de Peyer (Kraehenbuhl et Neutra, 1992). L'autre groupe de cellules T retrouvé dans le MALT exprime la molécule accessoire CD8 et un RCT spécifique aux peptides associés au CHM-I. Au dessus de chaque follicule se trouve un dôme riche en lymphocytes B et T, où la plupart des cellules B naïves expriment le récepteur IgM+/IgD+ tandis que les cellules B des centres germinatifs sont d'isotype A (McGhee et coll., 1989). C'est dans les centres germinatifs que la production d'Ig commute aux IgA et que les anticorps subissent une maturation d'affinité (Lavelle et coll., 1995). En effet, plus de 90% des lymphocytes B des centres germinatifs expriment un récepteur de surface IgA et sont considérés comme les précurseurs des cellules effectrices B qui quitteront le MALT et passeront dans la circulation sanguine par le biais des vaisseaux lymphatiques mésentériques. Les cellules IgA+ migreront ensuite vers des sites glandulaires et mucosaux où elles se différencieront en plasmocytes (Kraehenbuhl et Neutra, 1992).

### **2.11.2 Les cellules M des plaques de Peyer**

L'expression des cellules M est exclusive au FAE qui recouvre les follicules lymphoïdes du GALT (Clark et coll., 2000a). Au niveau du GALT, on les retrouve dans les follicules isolés et dans les plaques de Peyer du petit intestin, dans l'appendice et aussi dans le cæcum, le colon et le rectum (Gebert, 1997b).

#### **2.11.2.1 Propriétés morphologiques des cellules M**

Les caractéristiques morphologiques des cellules M reflètent leur fonction principale, soit l'échantillonnage des antigènes luminaux. Les cellules M sont rondes ou ovoïdes et se différencient des entérocytes par la distribution irrégulière des microvilli. Les cellules M sont caractérisées par une invagination de la membrane basolatérale qui contient des lymphocytes, des macrophages et des cellules dendritiques (Clark et coll., 2000a; Iwaski et Kelsall, 2001). Le cytoplasme est parsemé de vésicules impliquées dans

la transcytose (Gebert, 1997b). L'accessibilité des cellules M est supérieure à celle des entérocytes parce que leur bordure en brosse est moins développée et les couches de glycocalyx et d'IgA qui les recouvrent est moins importante (Frey et coll., 1996). Contrairement aux autres cellules épithéliales de l'intestin, la surface apicale des cellules M contient peu d'enzymes digestives (Gebert, 1997b).

#### 2.11.2.2 Échantillonnage d'antigènes luminaux

La fonction première des cellules M est le transport transépithélial d'antigènes afin d'initier une réponse immunitaire par le biais des cellules lymphoïdes sous-jacentes. Ce transport constitue donc un pré-requis pour l'induction d'immunité mucoale (Frey et coll., 1996) et l'intégrité antigénique n'est habituellement pas compromise (Stokes et coll., 1994; Lavelle et coll., 1995). Les cellules M peuvent endocyter les antigènes protéiques et les macromolécules avec une efficacité nettement supérieure aux entérocytes (Gebert, 1997b). Les cellules M ont recours à l'endocytose médiée par récepteur ou à la pinocytose pour acheminer les antigènes particuliers du lumen aux centres immunostimulateurs sous-jacents. Durant tous les types d'endocytose, les microfilaments sous-membranaires sont impliqués et réorganisés (Clark et coll., 1994). Les vésicules de transport fusionnent ensuite avec la pochette invaginée de la cellule M et exocytosent leur contenu dans l'espace intercellulaire occupé par les lymphocytes B et T (Gebert, 1997b). Après la stimulation antigénique, les lymphocytes B quittent le MALT par les vaisseaux lymphatiques afin de rejoindre des sites glandulaires ou mucoaux spécifiques et se différencient en plasmocytes pour produire des IgA polymériques dirigés contre l'antigène.

#### 2.11.2.3 Les cellules M comme voie d'invasion pour les microorganismes

Paradoxalement, les cellules M sont utilisées par certains agents pathogènes comme route d'invasion (Sansonetti et Phalipon, 1999). Dans un modèle murin, *S. Typhimurium* adhère de façon préférentielle aux cellules M (Jones et coll., 1994) et ce phénomène est rapporté chez plusieurs espèces bactériennes, dont *Campylobacter jejuni*, *Shigella flexneri* et *E. coli* (Gebert et coll., 1996). Des particules de latex se lient aussi davantage aux cellules M qu'aux entérocytes (Jepson et coll., 1993), suggérant l'implication d'interactions non spécifiques hydrophobes ou ioniques dans l'adhésion bactérienne (Kraehenbuhl et Neutra, 1992). Les sites de dommages non permanents comme l'apex des villi des entérocytes peuvent devenir des routes d'invasion secondaires



(Jepson et Clark, 2001). Les virus et les particules adhérentes sont internalisés par endocytose dépendante à la clathrine (Neutra et coll., 1987) alors que les particules non adhérentes sont absorbées par endocytose de phase fluide (Gebert, 1997b). Les bactéries et les particules de taille similaires sont internalisées par phagocytose classique, où le réarrangement des filaments d'actine du cytosquelette des cellules M permet la formation de pseudopodes (Gebert, 1997b). Une fois les vésicules internalisées, elles rejoignent la membrane basolatérale, ce qui coïncide avec la réorganisation de la surface apicale de la bordure en brosse (Ohl et Miller, 2001). Cependant, lorsque *Salmonella* pénètre la cellule M, cette dernière subit l'apoptose, ce qui permet la libération des salmonelles dans les follicules lymphoïdes où elles pourront entrer en contact avec les macrophages. Bien que les cellules M ne soient pas les seules cellules responsables de la transcytose de particules, elles représentent une cible de choix quant à la livraison de vaccins muqueux par leur grande capacité transcytotique et à leur association intime avec les sites inducteurs du système immunitaire muqueux.

#### 2.11.2.4 Récepteurs en surface des cellules M

L'état de glycosylation des cellules M diffère de celui des entérocytes. Plusieurs études ont été publiées quant à la caractérisation de récepteurs sur la surface apicale des cellules M ou du glycocalyx chez différents mammifères. Le glycocalyx des cellules épithéliales est composé de glycoconjugués utilisés comme site de liaison par les adhésines bactériennes et virales (Weenerås et coll., 1995). Bien que l'expression de ces récepteurs diffère d'une espèce à l'autre, les glycoconjugués exprimés en surface jouent un rôle important dans l'interaction des cellules M avec les microorganismes (Jepson et coll., 1996). Deux études rapportent que la lectine Ulex europaeus-1 (UEA-1) peut identifier et cibler les cellules M de murins (Jepson et coll., 1996; Clark et coll., 2000a). Chez le lapin, le glycocalyx qui recouvre les cellules M du cæcum est riche en N-acetyl-galactosamine, tandis que le glycocalyx des cellules M de l'intestin ne diffère pas des entérocytes environnants (Gebert et Hach, 1993). Les lectines UEA-1 et Helix pomatia (HPA) s'associent aux cellules M présentes dans les amygdales de lapin, suggérant la présence de fucose et de N-acetyl-galactosamine (Gebert, 1997a). Cependant, aucun récepteur de cellule M universel n'a été identifié jusqu'à maintenant chez aucune espèce, suggérant que les patrons de glycosylation sont probablement spécifiques à la localisation et au microenvironnement de la cellule (Gebert et coll., 1996). La grande variabilité de ces molécules sur la surface des cellules M peut être un moyen efficace pour générer un répertoire de molécules d'association pour reconnaître les protéines dérivées des lectines

à la surface des bactéries (Neutra et coll., 1995). Plusieurs groupes de recherche se penchent sur l'identification de lectines pouvant lier les différents carbohydrates exprimés sur les cellules M de différentes espèces dans l'optique de cibler des véhicules de livraison à ces cellules.

### **2.11.3 Amygdales du palais mou**

#### **2.11.3.1 Caractéristiques histologiques**

Les amygdales sont des agrégats de tissu lymphoépithélial organisés situées à la jonction de l'oropharynx et du nasopharynx. Elles sont constituées de deux plaques bien définies situées sur la surface ventrale du palais mou (Horter et coll., 2003), à l'entrée des voies gastriques et respiratoires. Histologiquement, elles sont composées de cryptes, de lymphoépithélium, de follicules lymphoïdes, de régions para-folliculaires, de tissu conjonctif, de cellules lymphoïdes B et T, de cellules dendritiques et de macrophages. Elles sont larges, plates et ovoïdes et mesurent 33 mm de long sur 18 mm de large (Belz et Heath, 1996). Chez des porcelets de 6 à 10 semaines d'âge, la surface mucosale est plate et parsemée de 160 à 190 ouvertures de 90 à 500 µm de long (Belz et Heath, 1996). Parallèlement, chez les humains, on compte de 10 à 30 ouvertures dans l'organe lymphoïde secondaire et seulement une chez le lapin (Kassay et Sandor, 1962; Slipka, 1988). Ces ouvertures, alignées selon l'axe cranio-caudal et régulièrement espacées, sont circulaires ou ovales et pénètrent les tissus lymphoïdes (Belz et Heath, 1996). Ces composantes confèrent aux amygdales des rôles dans l'immunité innée, cellulaire et humorale au niveau systémique et local (Horter et coll., 2003). La position stratégique des amygdales leur permet de jouer un rôle dans la surveillance et la détection de différents pathogènes contractés par voie orale ou nasale et d'initier une réponse immunitaire. Elles peuvent être de type folliculaire ou non folliculaire, les follicules désignant des cryptes où se trouvent des follicules lymphoïdes sous-jacents (Belz et Heath, 1996). Chez le porc, les amygdales du palais mou, tubaires et paraépiglottiques sont folliculaires, tandis que les amygdales pharyngéales et linguales sont non-folliculaires (Trautmann et Fiefiger, 1957).

#### **2.11.3.2 Morphologie des cryptes des amygdales du palais mou**

Le réseau de cryptes maximise la surface entre l'environnement extérieur et les tissus lymphoïdes. Chaque crypte a un col formé par une invagination de l'épithélium du palais mou et d'un segment principal qui se prolonge à travers le tissu conjonctif

jusqu'aux tissus lymphoïdes. Puisqu'aucun réseau de vaisseaux lymphatiques afférents ne draine les amygdales du palais mou chez le porc, celles-ci n'échantillonnent que les antigènes contractés par voie orale (William et Rowland, 1972). Les déchets contenus dans les cryptes consistent en des cellules dégénérées, de la nourriture et des bactéries (Belz et Heath, 1996). L'évacuation de ces détritits est possible par le mucus sécrété par les cellules à Gobelet (Belz et Heath, 1996).

#### 2.11.3.3 Induction de l'immunité mucoale le long du GALT

Le rôle principal des amygdales du palais mou est d'échantillonner et de transloquer les antigènes présents dans les cryptes. Les effecteurs immunitaires des amygdales confèrent une protection aux voies d'entrées potentielles de pathogènes, permettant une réponse rapide et efficace face à une possible réinfection (Horter et coll., 2003). Les cytokines, les lymphocytes et les plasmocytes migrent par les veinules post-capillaires jusqu'aux organes du MALT par les vaisseaux sanguins ou lymphatiques où ils participeront à l'immunité mucoale (Belz, 1998).

#### 2.11.3.4 Structure des différents types d'épithélium des amygdales du palais mou

Comme toutes les amygdales folliculaires, les amygdales du palais mou sont recouvertes d'épithélium pavimenteux stratifié avasculaire non kératinisé. Les ouvertures des cryptes sont recouvertes d'un épithélium identique. Le reste des cryptes est recouvert de lymphoépithélium pavimenteux stratifié, plus mince que l'épithélium en surface des amygdales et diffère donc de l'épithélium pavimenteux stratifié de la cavité orale (Sato et coll., 1990). L'épithélium réticulaire des cryptes agit à titre de zone d'échantillonnage d'antigènes (Clark et coll., 2000b). Il est donc caractérisé par la présence marquée de cellules M (Horter et coll., 2003), de cellules à Gobelet et de nombreux lymphocytes (Belz et Heath, 1996; Brandtzaeg, 1984). Tout comme les cellules M des plaques de Peyer, les cellules M des amygdales présentent les antigènes luminaux aux macrophages, cellules dendritiques et aux lymphocytes des régions folliculaires et parafolliculaires. Elles partagent plusieurs caractéristiques avec les cellules M des plaques de Peyer, à savoir une spécialisation de la membrane apicale, la présence de vacuoles dans le cytoplasme et l'association avec les lymphocytes (Belz et Heath, 1996).

### 2.11.3.5 Localisation des différents sous-groupes de lymphocytes

Sous le lymphoépithélium se trouvent les follicules lymphoïdes, site de maturation des cellules B et de différenciation des cellules T. Les cellules B et les cellules dendritiques sont localisées dans les follicules lymphoïdes tandis que les cellules T se retrouvent au niveau des régions parafolliculaires. Les régions parafolliculaires sont constituées de cellules T et de cellules dendritiques régulatrices, de macrophages, de plasmocytes et de cellules B (Bianchi et coll., 1992). La population de cellules T des cryptes est constituée majoritairement de cellules auxiliaires CD4 et de cellules T  $\gamma\delta$  (Salles et Middleton, 2000). Les cellules T  $\gamma\delta$  ne possèdent pas de marqueur CD4 ou CD8 et ne requièrent pas de traitement d'antigènes pour la reconnaissance d'antigènes. Elles reconnaissent les antigènes communs aux microorganismes sans présentation par le CHM-II et leur réponse rapide précède celle des cellules CD4 et CD8. Les cytokines produites ont un rôle immunorégulateur dans les phases initiales de l'infection (Boismenu et Havran, 1998). Les cellules T des amygdales peuvent produire une variété de cytokines (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) qui régulent les fonctions des lymphocytes et cellules présentatrices d'antigènes dans leur microenvironnement mais aussi systématiquement (Zuckermann, 1999).

### 2.11.3.6 Les amygdales du palais mou comme voie d'invasion

Les amygdales servent à la fois de porte d'entrée, de site de multiplication et de persistance pour certains microorganismes pathogènes porcins (Salles et Middleton, 2000). En effet, les cryptes et villi sont colonisés par des bactéries commensales et étrangères tel que *S. suis* (Devriese et coll., 1994). Comme la transmission de *Salmonella* se fait habituellement par la voie orale ou nasale, la bactérie utilise les cryptes des amygdales du palais mou pour envahir l'hôte par le système lymphatique et pour se répliquer (Horter et coll., 2003; Wilcock et Olander, 1978). La présence d'un faible nombre de microorganismes dans les cryptes procure une stimulation immunitaire continue. La présence de bactéries extracellulaires dans le microenvironnement de la crypte rend difficile leur élimination par le système immunitaire. La persistance de *Salmonella* dans les cryptes et sur les couches superficielles de l'épithélium chez les porcs peut être à l'origine de l'état de porteur (Fedorka-Cray et coll., 1995).

## 2.12 Mécanismes immunitaires de l'hôte contre *Salmonella*

La plupart des études concernant les mécanismes d'immunité lors d'infections à *Salmonella* ont été effectuées sur des modèles de rongeurs et de souris (Mastroeni et coll., 2000; Mittrücker et Kaufmann, 2000). Les différentes lignées de souris utilisées diffèrent dans leur susceptibilité à l'infection puisqu'elles sont rendues susceptibles par la délétion de différents gènes tels *Nramp1* (Mittrücker et Kaufmann, 2000). Les résultats de ces études doivent donc être interprétés avec prudence. Chez les humains, *S. Typhimurium* cause habituellement une infection de forme entérique, alors que chez la souris, elle cause une infection systémique qui ressemble à la fièvre typhoïde, causée par *S. Typhi* chez les humains (Hughes et Galán, 2002). Ces modèles ne recréent pas exactement l'infection et l'extrapolation des résultats aux mammifères est délicate (Mittrücker et Kaufmann, 2000). Cependant, deux concepts sont applicables à toutes les espèces. Premièrement, l'immunité humorale et cellulaire sont toutes deux nécessaires à la résistance aux salmonelles. Deuxièmement, une infection primaire à *Salmonella* permet d'acquérir une immunité spécifique (Hormaeche et coll., 1991).

### 2.12.1 Immunité innée

Comme le mode habituel d'entrée des salmonelles chez un individu est la voie orale, les microorganismes devront faire face à divers mécanismes immunitaires non spécifiques tels que l'environnement acide de l'estomac, le mucus intestinal et la microflore de l'intestin (Clarke et Gyles, 1993). Les cellules épithéliales, les jonctions serrées entre les cellules et la couche de glycocalyx agissent à titre de barrières physiques contre l'invasion de pathogènes (Lamm, 1997).

#### 2.12.1.1 Acidité gastrique

Le sérovar *Typhimurium* est neutroaliphilique, c'est-à-dire que sa survie et sa croissance sont optimisées à des pH neutres. Durant la pathogenèse, *S. Typhimurium* est confronté à des milieux acides en particulier lors de son passage dans le tractus gastrique. Un pH égal ou inférieur à 3 permet l'infiltration des protons à l'intérieur de la cellule à une vitesse telle que les systèmes d'homéostasie internes ne peuvent les rejeter à l'extérieur. L'augmentation de la concentration intracellulaire de protons altère ou stoppe certaines réactions biochimiques nécessaires à l'homéostasie de l'organisme. Comme toutes les entérobactéries, *Salmonella* est dotée de plusieurs mécanismes pour contrer

l'acidité. Le facteur alternatif sigma  $\sigma^s$ , codé par *rpoS* (Bearson et coll., 1997) et le système PhoP-PhoQ agissent en synergie et sont induits lors d'une acidification du milieu environnant (Bearson et coll., 1998). Malgré cette adaptabilité, seulement un faible pourcentage de la population bactérienne pourra survivre à l'acidité de l'estomac et rejoindre le petit intestin.

#### 2.12.1.2 Flore intestinale microbienne

La flore intestinale commensale exerce un contrôle important dans les infections salmonelliques. Parmi les probiotiques intestinaux, *E.coli*, qui ne dispose d'aucune activité antimicrobienne, protège le tractus digestif contre l'établissement de *S. Typhimurium* chez des souris stériles (Hudault et coll., 2001). Une étude de Fedorka-Cray et coll. (1999) propose le contrôle de la salmonellose porcine par l'introduction d'une flore bactérienne spécialisée afin de compétitionner avec les souches pathogènes de *Salmonella*. La colonisation et la croissance de *Salmonella* dans l'intestin sont donc facilitées puisque les bactéries n'ont pas à compétitionner pour les nutriments (Clarke et Gyles, 1993). Au niveau du cæcum, la flore bactérienne complexe et abondante représente un obstacle majeur à la colonisation. Bien que les mécanismes innés soient efficaces dans la contenance de la croissance initiale de *S. Typhimurium*, ils ne peuvent éliminer la bactérie de l'hôte. La réponse lymphocytaire adaptée peut permettre une éradication de la bactérie et une protection en vue d'une éventuelle réinfection.

#### 2.12.2 Immunité acquise

Le sérum des adultes exposés aux salmonelles contient des anticorps spécifiques à différents sérotypes et cette immunité peut être transmise passivement à leur progéniture lors de l'allaitement via le colostrum et le lait maternel (Clarke et Gyles, 1993). Les porcelets allaités sont rarement atteints de la forme clinique, mais cette résistance cesse peu après le sevrage, soulignant l'importance de l'immunité lactogène (Laval et coll., 1991). En conditions physiologiques normales, les sécrétions ne contiennent pas de système de complément. Cependant, lors d'inflammation, les composantes du complément peuvent être présents dans le mucus intestinal. L'importance de ce phénomène dans le système immunitaire est encore obscure, tout comme celle de l'opsonisation (Lamm, 1997).

### 2.12.2.1 Immunité humorale

L'exposition aux salmonelles résulte en une production d'anticorps dirigés contre des composantes protéiques et non protéiques (Mastroeni et coll., 2000). Il est important de noter que la seule présence d'anticorps ne corrèle pas toujours avec la résistance à une réinfection et que la quantité d'immunoglobulines sériques n'indique pas nécessairement l'état de protection du système intestinal (Forrest, 1992).

#### 2.12.2.1.1 Classification des IgA

Les IgA constituent l'isotype d'immunoglobulines le plus abondant dans les sécrétions mucosales (Fagarasan et Honjo, 2003). Puisque l'association d'antigènes aux IgA sécrétés ne déclenche pas de réactions inflammatoires, les IgA sont considérés comme des immunoglobulines non inflammatoires (van Egmond et coll., 2001) et sont de mauvais activateurs du complément par la voie classique (Kerr, 1990). Les IgA se subdivisent en deux classes de molécules hétérogènes, soit IgA1 et IgA2. Elles diffèrent par la présence ou l'absence d'une région charnière de 13 acides aminés. Cette région est exclusive aux IgA1 et comporte plusieurs sites de glycosylation. Elle est la cible de protéases bactériennes IgA1 dont l'expression est associée à la virulence (van Egmond et coll., 2001). Les IgA1 sont caractérisées par une structure en T, contrairement à la structure habituelle en Y (Boehm et coll., 1999). Aucune implication fonctionnelle de l'hétérogénéité des molécules d'IgA n'a été démontrée.

#### 2.12.2.1.2 Sécrétion des IgA dans le lumen

Les IgA sécrétés (IgAs) consistent en 2 molécules d'Ig associées par un lien disulfide. Les IgA dimériques ou polymériques des sécrétions sont associées avec la chaîne polypeptidique J (Kraehenbuhl et Neutra, 1992). La chaîne J est acquise durant le procédé de polymérisation dans les plasmocytes juste avant la sécrétion. Les IgA sécrétés gagnent les sécrétions mucosales par la transcytose épithéliale médiée par le récepteur glycoprotéinique polymérique Ig situé sur la surface basolatérale des cellules épithéliales. Les IgA polymériques se lient à ce récepteur, sont endocytées puis transloquées vers la surface apicale. Le clivage protéolytique entre le domaine transmembranaire et extracellulaire du récepteur polymérique Ig libère dans le lumen les IgAs, un complexe d'IgA polymérique et de composant sécrétoire, un reste du récepteur polymérique Ig (Mazanec et coll., 1993). Les propriétés uniques des IgAs leur confèrent

une résistance au microenvironnement hostile des muqueuses. Dans le sérum, les IgA sont de forme monomériques.

#### 2.12.2.1.3 Fonctions immunitaires des IgA

La fonction première des IgA est d'agir comme barrière immunologique afin d'exclure les antigènes et particules du système de l'hôte (Williams et Gibbons, 1972). Elles interfèrent avec l'attachement et la pénétration des cellules épithéliales en agglutinant des unités de surface de la bactérie. Les IgA sécrétées protègent contre un challenge chez *Shigella* (Phalipon et coll., 1995), *Vibrio cholerae* (Apter et coll., 1993) et le virus influenza (Renegar et coll., 1991). L'injection d'un hybridome de cellules B produisant des IgA spécifiques à *Salmonella* peut prévenir l'établissement d'une infection suite à un inoculum oral (Michetti et coll., 1992). En s'associant avec des épitopes flagellaires, les IgA peuvent inhiber la motilité des salmonelles (Lamm, 1997). Les IgAs ont la capacité de bloquer directement des sites microbiens qui médient l'attachement à l'épithélium soit en s'associant à des molécules impliquées dans l'adhésion ou en empêchant leur contact avec l'épithélium par stérance hindrique (Kraehenbuhl et Neutra, 1992). Elles préviennent donc le stage primaire de l'infection (Clarke et Gyles, 1993) et ce même en l'absence d'autres mécanismes immunitaires (Michetti et coll., 1992). Les complexes IgAs-antigène sont facilement piégés dans le mucus, ce qui rend possible leur élimination par le péristaltisme. Ce phénomène, appelé exclusion immune, peut prévenir efficacement le contact de différents agents pathogènes et antigènes avec les surfaces épithéliales (Kraehenbuhl et Neutra, 1992). Les complexes immuns peuvent aussi être phagocytés par le biais du récepteur Fc $\alpha$  présent à la surface des neutrophiles, éosinophiles et des monocytes (van Egmond et coll., 2001). La présence de récepteurs Fc pour les IgA chez les cellules myéloïdes démontre le rôle important des IgA dans l'immunité. Plusieurs études ont montré que l'association d'IgA au récepteur Fc $\alpha$  de ces cellules déclenche des fonctions cellulaires telles que la dégranulation et la stimulation du métabolisme oxydatif (van Egmond et coll., 2001). Cependant, une étude *in vivo* effectuée chez des souris plgR $^{-/-}$  suggère que chez les animaux vaccinés, les IgA sécrétés ne sont pas une composante essentielle à une immunoprotection face à *S. Typhimurium* (Uren et coll., 2005). Il est intéressant de souligner que la livraison mucosale de vaccin est la seule route qui induit efficacement une commutation isotypique des cellules B et le développement de cellules plasmiques produisant des IgA sécrétées (Foster et Hirst, 2005).



## 2.12.2.2 Immunité cellulaire

### 2.12.2.2.1 Les cellules T

L'importance des cellules T est démontrée par le fait que les souris nues et les souris déficientes en cellules T  $\alpha\beta$  sont plus susceptibles aux infections à *Salmonella* (Nauciel, 1990). La contribution des différentes classes de cellules T n'est pas clairement définie. Dans la plupart des cas, les cellules CD4+ semblent plus importantes que les cellules CD8+ (Hughes et Galán, 2002), particulièrement les CD4+ Th1. Le transfert de cellules T CD4+ de souris vaccinées chez des souris naïves résulte en une meilleure protection que le transfert de cellules CD8+ (Nauciel, 1990). Cependant, les cellules CD8+ participent aussi à l'immunité contre *Salmonella*. Les cellules CD8+ peuvent se différencier en cellules cytotoxiques par des mécanismes rigoureusement contrôlés, étant donné le haut potentiel destructeur de ces cellules. La lyse des cellules infectées par les cellules T cytotoxiques est encadrée par la granulysine, protéine antibactérienne contenue dans les cellules cytotoxiques pouvant cibler un grand nombre de bactéries dont *S. Typhimurium* (Stenger et coll., 1998).

Comme il a été démontré chez d'autres bactéries intracellulaires, l'élimination de *S. Typhimurium* nécessite l'action synergique des cellules T restreintes aux CHM-I et CHM-II (Lo et coll., 1999). Les cellules CD8+ générées durant l'exposition à *Salmonella* ne sont pas restreintes à la reconnaissance par les molécules CHM-I classiques mais bien par la molécule CHM de classe Ib Qa-1. Ces clones reconnaissent non seulement les cellules infectées par *S. Typhimurium* mais aussi les cellules infectées avec une variété de bactéries à Gram négatif (Lo et coll., 1999), indiquant que les cellules CD8+ peuvent réagir aux composantes bactériennes conservées lorsqu'elles sont présentées par la molécule Qa-1.

### 2.12.2.2.2 Cellules dendritiques

L'étude *in vitro* des cellules dendritiques est rendue plus complexe par la difficulté de les prélever des tissus. Le seul fait de les isoler peut altérer l'expression génétique et le phénotype (MacPherson et coll., 2004). Dans le contexte d'une infection à *Salmonella*, leur rôle principal est d'internaliser et de traiter la bactérie pour ensuite présenter les antigènes processés par les CHM-I et II aux cellules T CD4+ et CD8+ (Yrlid et Wick, 2002; Svensson et coll., 2000). Les cellules dendritiques interdigitées au niveau de l'épithélium folliculaire peuvent participer à l'échantillonnage des microorganismes du

lumen sans toutefois compromettre la barrière épithéliale. L'intégrité de l'épithélium est assurée par l'expression de protéines de jonctions serrées telles l'occludine, la claudine 1 et la zonula occludens au niveau des plaques de Peyer (Rescigno et coll., 2001). Les cellules dendritiques spectatrices peuvent aussi présenter du matériel apoptotique de macrophages induits à l'apoptose par *Salmonella* (Yrlid et Wick, 2000). La capacité de *Salmonella* à induire l'apoptose chez les cellules présentatrices d'antigènes ne signifie donc pas qu'elle évite automatiquement les mécanismes immunitaires. Les cellules dendritiques sont une source importante des cytokines TNF- $\alpha$ , IL-12 et IFN- $\gamma$ , médiateurs importants dans la survie de l'hôte à une infection à *Salmonella* (Mitrücker et Kaufmann, 2000). Dans la plupart des tissus, les cellules dendritiques sont dans un état immature et incapable de stimuler les cellules T puisqu'elles n'expriment pas les molécules costimulatoires CD40, CD54 et CD86 ni le CHM-II (Banchereau et Steinman, 1998). Elles peuvent néanmoins accomplir les mécanismes qui en font d'excellentes cellules phagocytaires tels la phagocytose (Svensson et coll., 1997), la macropinocytose d'antigènes solubles et la pinocytose adsorptive (Banchereau et Steinman, 1998).

#### 2.12.2.2.3 Macrophages

Les récepteurs de surface des macrophages s'associant à *S. Typhimurium* sont jusqu'à présent inconnus, mais il est établi que l'internalisation de la bactérie est reliée à un mécanisme dépendant à l'actine (Aderehem et Underhill, 1999). Les macrophages processent *S. Typhimurium* pour présenter les peptides par les CHM-I et II (Wick et Ljunggren, 1999). La présentation d'épitopes de *Salmonella* par les CHM-I est indépendante du transporteur associé au traitement des antigènes (Day et coll., 1995). Après liaison à la surface, les souches virulentes de *Salmonella* induisent la formation d'extensions membranaires provoquant l'internalisation de la bactérie dans un phagosome où elles peuvent se multiplier (Alpuche-Aranda et coll., 1994). Bien que les souches non virulentes puissent se lier à la surface des macrophages, elles n'induisent ni la macropinocytose ni le plissement de la membrane (Alpuche-Aranda et coll., 1995). La capacité de *Salmonella* à survivre et à se répliquer dans les phagolysosomes est conférée par les protéines du SSTT de l'îlot de pathogénicité 2 (Hensel et coll., 1998), permettant aux macrophages d'éviter les systèmes de défense de l'hôte (Jones, 1997).

L'IFN- $\gamma$  prépare le phagocyte à l'activation par le TNF $\alpha$  sécrété suite à la ligation du TLR (Mosser, 2003). Cependant, des études menées chez des modèles murins rapportent que l'IFN- $\gamma$  est crucial uniquement dans les phases initiales de l'infection (Pie

et coll., 1997). L'activation augmente la quantité d'espèces d'oxygènes toxiques par l'induction de la synthèse NO inductible. L'IL-10 et le TGF $\beta$  régulent négativement l'activation des macrophages étant donné le haut potentiel inflammatoire des espèces réactives de l'oxygène (Ho et Moore, 1994). L'infection des macrophages porcins par *S. Typhimurium* conduit à la libération soutenue d'IL-1, de TNF $\alpha$  et de IL-6 par les macrophages (Watson et coll., 2000).

Les chimiokines libérées par différents médiateurs attirent les macrophages au site d'infection. Environ 90% des salmonelles ayant pénétré dans la sous-muqueuse seront détruites par les cellules phagocytaires (Uzzau et coll., 2000). L'entrée des bactéries dans le milieu intracellulaire du macrophage produit, tout comme lors de la pénétration des cellules épithéliales, un réarrangement du cytosquelette (Monack et coll., 1996). La migration des macrophages infectés vers les autres centres réticulo-endothéliaux comme la rate facilite la dissémination des bactéries parce qu'ils constituent une porte d'entrée vers la circulation sanguine. Les salmonelles peuvent coloniser d'autres organes comme les poumons et le système nerveux central (Ohl et Miller, 2001). Les macrophages ont donc un rôle primordial à jouer dans la dissémination des salmonelles. En effet, la réduction des populations de macrophages chez les souris diminue significativement la morbidité et la mortalité des infections à *Salmonella* (Richter-Dahlfors et coll., 1997). L'expression des gènes de virulence est contrôlée par au moins deux systèmes régulateurs : PhoP/PhoQ et RpoS. PhoP/PhoQ est impliqué dans l'activation et la répression de plus de 40 gènes requis pour l'invasion cellulaire et la survie dans le milieu intracellulaire des macrophages et à la résistance aux peptides antimicrobiens (Miller et coll., 1989; Ernst et coll., 2001).

Les cellules présentatrices d'antigènes peuvent phagocyter les microorganismes de façon non spécifique (Inaba et coll., 1993) ou par le biais de récepteurs reconnaissant des structures moléculaires propres aux bactéries. Par exemple, le récepteur de mannose peut lier certains sucres présents à la surface de bactéries (Storni et coll., 2005). Les bactéries pathogènes expriment en surface des patrons moléculaires conservés associés aux pathogènes (PMAPs), et l'association des PMAPs aux Toll-like receptors (TLR) donne lieu à une réponse immunitaire rapide et sans délai, puisque, contrairement à l'immunité adaptative, elle n'implique pas d'expansion clonale. La stimulation des TLR conduit à l'activation du facteur de transcription NF $\kappa$ B et des kinases MAP, ce qui induit la production de médiateurs inflammatoires de l'immunité innée comme IL-6, IL-12, IL-8, IFN- $\alpha$  et IFN- $\gamma$  (Storni et coll., 2005). Simultanément, le signalement par le TLR induit les

molécules co-stimulatrices tels que CD80 et CD86, des protéines de surface exprimées par les cellules présentatrices d'antigènes (Storni et coll., 2005). La phagocytose par les cellules présentatrices d'antigènes permet donc la génération de l'immunité adaptative.

### **2.13 Traitement et prophylaxie des infections à *Salmonella* chez le porc**

Le contrôle des infections à *Salmonella* peut se faire au niveau prophylactique et thérapeutique. L'administration d'agents antimicrobiens, de vaccins et le contrôle des conditions d'élevage sont les principaux moyens de contrôles offerts jusqu'à maintenant dans la production porcine. La colonisation intestinale est la première phase du processus dans lequel une souche de *S. Typhimurium* peut engendrer une infection systémique. Une protection contre la colonisation devrait diminuer la propagation des salmonelles aux organes internes impliqués dans les septicémies.

#### **2.13.1 Vaccins**

Les vaccins habituellement utilisés contre les maladies d'origine bactériennes chez le porc contiennent des microorganismes tués, des composantes microbiennes purifiées ou des protéines recombinantes. Le vaccin idéal contre *S. Typhimurium* chez le porc devrait prévenir : (i) la colonisation; (ii) l'excrétion de *Salmonella* dans l'environnement; (iii) le développement d'animaux porteurs; (iv) les formes cliniques de salmonellose et promouvoir l'élimination de la bactérie (Haesebrouck et coll., 2004). De plus, la formulation d'un vaccin monodose faciliterait son administration dans les élevages. La problématique de protection contre différents sérovars de *Salmonella* par un seul vaccin n'est toujours pas résolue.

##### **2.13.1.1 Vaccins tués**

Les vaccins tués suscitent peu d'intérêt au niveau du contrôle des infections bactériennes intestinales (Liu et coll., 2001). Leur efficacité est controversée et les études menées à ce sujet sont difficiles à comparer dû à la grande variété d'adjuvants, de méthodes d'inactivation et de modèles d'infections expérimentales. Barrow et Wallis (2000) soulignent trois problèmes majeurs associés aux vaccins tués. Premièrement, les antigènes exprimés en surface sont souvent des protéines induites lors de la culture *in vitro* et ne reflètent pas les protéines exprimées *in vivo*. Deuxièmement, les vaccins tués stimulent rarement l'immunité cellulaire s'ils ne sont pas couplés à un adjuvant (Mastroeni

et coll., 2000). Troisièmement, ils échouent habituellement pour induire une réponse IgA adéquate alors que ces derniers sont d'importants protecteurs de la membrane mucoale. D'un point de vue pratique, ce type de vaccination nécessite plusieurs doses pour maintenir un niveau et une durée d'immunité adéquate, ce qui est coûteux et problématique quant à la logistique de la vaccination des élevages (Liu et coll., 2001).

#### 2.13.1.2 Vaccins atténués

Les récents progrès quant à la connaissance du génome de *Salmonella* ont permis le développement de souches mutantes pour les gènes impliqués dans la survie et dans la pathogénèse. Ces gènes se subdivisent en deux catégories : les gènes de ménage et ceux impliqués dans la virulence. Les gènes de ménage incluent les gènes impliqués dans la biosynthèse des composantes structurales et ceux impliqués dans la synthèse de métabolites essentiels. Une mutation dans le gène *aroA* prévient la synthèse des acides aminés aromatiques, ce qui diminue la capacité de la bactérie à croître chez l'hôte. Les vaccins *S. Typhimurium aroA* induisent une bonne immunité cellulaire et humorale (Mastroeni et coll., 2000), réduisent la sévérité de la diarrhée et la souche *aroA* n'est pas excrétée dans les fèces (Lumsden et coll., 1991). Le vaccin atténué *S. Typhimurium* mutant pour les gènes *gyrA*, *cpxA*, et *rpoB* possède les mêmes effets (Roesler et coll., 2004). Les mutations au niveau des gènes de virulence, particulièrement ceux impliqués dans la résistance aux mécanismes immunitaires de l'hôte, sont aussi étudiées (Mastroeni et coll., 2000). Les vaccins atténués offrent un rendement immunitaire supérieur aux vaccins tués puisqu'ils induisent une meilleure immunité cellulaire et humorale (Clark et Gyles, 1993). La préparation peut être livrée oralement et son contenu peut stimuler une réponse mucoale à plusieurs sites (Mastroeni et coll., 2000). Cependant, le stockage de ces vaccins est souvent difficile puisque les multiples mutations affectent les composantes structurales et métaboliques, disposant la bactérie dans un état vulnérable à certaines conditions (Corbel, 1996). Chez les bovins et autres animaux d'élevage, l'emploi de souches de *Salmonella* atténuées comme vaccin est controversé puisque les organismes utilisés se retrouvent dans les fèces de l'animal. La virulence résiduelle de la bactérie est un problème pour l'animal et pour l'élevage, mais aussi pour le personnel traitant et les consommateurs de viande (Barrow et coll., 2001; Mastroeni et coll., 2000).

Le contrôle de *Salmonella* dans l'industrie porcine canadienne peut s'effectuer par l'administration du vaccin Enterisol SC-54, commercialisé par la compagnie Boehringer

Ingelheim, qui consiste en une souche atténuée de *S. Cholerasuis*. Il a été démontré que son administration intranasale réduit la colonisation bactérienne au niveau des organes internes (Roof et Doitchinoff, 1995) et augmente la concentration d'IgA sériques dans le petit intestin chez le porc (Letellier et coll., 2001). Cependant, tel que mentionné précédemment, le sérovar *Cholerasuis* a été éradiqué des élevages porcins québécois. L'utilisation d'une souche atténuée de *Cholerasuis* est délicate puisque la réversion possible de celle-ci peut avoir des conséquences importantes sur la santé des animaux et sur celle des consommateurs de viande.

### 2.13.2 Problématique relative à l'emploi des antibiotiques

Chez les animaux d'élevage, les antibiotiques sont utilisés à titre d'agents thérapeutiques, d'agents prophylactiques et de facteurs de croissance. L'utilisation importante de préparations de plusieurs antimicrobiens incorporés dans la nourriture ou administrés comme thérapie exercent une pression sélective importante sur les souches de *Salmonella* dans les élevages porcins. Les antibiotiques chez les animaux de boucherie sont aussi administrés de façon à augmenter la résistance des bactéries aux antibiotiques : dosage sous thérapeutiques et administration de masse et à long terme (Mølbak, 2004). Parmi les préparations les plus utilisées, on note la triméthoprimé combinée aux sulfonamides, souvent employée pour traiter les infections à *Salmonella* chez le porc. Cette combinaison est largement distribuée dans l'organisme et peut aussi agir au niveau intracellulaire afin d'éliminer les salmonelles parasitant les macrophages. Le rapport du Programme Intégré Canadien de surveillance de la Résistance aux Antibiotiques (PICRA) de l'année 2003 rapporte que 73% des isolats cliniques porcins de *Salmonella* prélevés en 2003 étaient résistants à au moins un antibiotique alors que 2% des isolats étaient résistants à des antibiotiques de catégorie I (importance très élevée en médecine humaine). À l'abattoir, 49% des isolats de *Salmonella* étaient résistants à au moins un des antibiotiques testés. En plus d'accroître l'antibiorésistance, l'utilisation d'antibiotiques altère la flore microbienne intestinale et facilite la réplication des salmonelles chez les mammifères (Schwartz, 1999). Un nombre croissant de cas d'infections humaines à des souches de *Salmonella* multirésistantes où le traitement par antibiotiques est problématique est publié dans la littérature (Mølbak, 2004). Parmi celles-ci, on note la souche *S. Typhimurium* DT104 qui sévit depuis le début des années 90 (Baggesen et coll., 1999) et qui est résistante à l'ampicilline, au chloramphénicol, à la streptomycine, aux sulfonamides et à la tétracycline.

## **2.14 Véhicules de livraison membranaires**

### **2.14.1 Caractéristiques générales**

L'utilisation de vaccins visant à contrôler les infections bactériennes mucoales n'a donné jusqu'à maintenant aucun résultat significatif. De nouvelles stratégies d'immunisation sont requises et devraient privilégier l'administration par voie orale. Celle-ci stimule l'immunité mucoale aux sites qui sont habituellement infectés par les agents pathogènes et peut, tout comme les vaccins intranasaux, éliciter à la fois des réponses systémiques et mucoales protectrices. Une approche prometteuse dans le domaine des vaccins oraux consiste en la livraison de protéines antigéniques par des microsphères polymériques. Ce mode d'immunisation augmente l'immunogénicité et la protection des antigènes (Cox et Taubman, 1984), libère l'antigène de façon contrôlée, prédéterminée et continue ou pulsatile (Coombes et coll., 1999; Aguado et Lambert, 1992). L'encapsulation d'antigènes permet de protéger l'antigène contre les pH acides ou basiques, les protéases et les enzymes contenues dans les sécrétions du tractus digestif et favorise la présentation antigénique aux cellules M des plaques de Peyer. De cette façon, la rétention et la présentation des antigènes sont optimisées, diminuant ainsi le nombre de doses requises pour stimuler le système immunitaire (Liu et coll., 2001).

### **2.14.2 Microsphères d'alginate**

L'alginate est un polymère soluble dans l'eau et qui est constitué d'un sel sodique d'acide alginique, un glyuronan linéaire. Les conditions d'encapsulation des antigènes n'altèrent habituellement pas l'intégrité antigénique puisque sa préparation ne nécessite aucun solvant organique (Periwal et coll., 1997). Son coût est relativement bas. De plus, il est non toxique, biocompatible et facile à préparer (Singh et O'Hagan, 1998). Les microsphères sont hydrophiles et leur association avec les plaques de Peyer est moins efficace que celle des microsphères d'acide poly (DL-lactide co-glycolide) (PLGA) (Borwesock et coll., 1994). Les microsphères d'alginate sont inefficaces pour induire une production d'IgG ou d'IgA ou pour stimuler une réponse immunitaire cellulaire (Mutwiri et coll., 2002). Elles semblent plus efficaces lorsque administrées par voie intranasale (Rebelatto et coll., 2001). Des antigènes encapsulés dans des microsphères d'alginate de 10 µm ou moins ont été étudiés dans l'induction de l'immunité chez les bovins (Bowersock et coll., 1999), les rongeurs (Kidane et coll., 2001) et les poissons (Joosten et coll., 1997) avec plus ou moins de succès.

### 2.14.3 Liposomes

Les liposomes sont constitués d'une double couche de phospholipides. Leur préparation est simple, mais l'encapsulation d'antigènes protéiques nécessite une optimisation complexe. Leur effet adjuvant est habituellement faible. Les liposomes sont dégradés rapidement par les sels biliaires et d'autres composantes de l'environnement luminal gastrointestinal, ce qui les rend inapte à la livraison orale. Ce problème peut être surmonté par l'utilisation de liposomes polymérisés où les molécules de phospholipides de la double couche sont réticulées par des liens covalents (Chen et Langer, 1998). Ces liposomes sont stables *in vitro* (Okada et coll., 1995) et *in vivo* (Chen et coll., 1996) et sont dégradés par les macrophages afin de permettre la présentation antigénique (Chen et coll., 1996). Les liposomes non modifiés ciblent les cellules M des rongeurs (Childers et coll., 1990), tandis que cette association chez les souris est faible (Chen et coll., 1996; Chen et Langer, 1997). L'addition de mannose aux liposomes est présentement à l'étude afin de cibler les récepteurs de mannose à la surface des cellules dendritiques (Clark et coll., 2001).

### 2.14.4 Microsphères de poly-ε caprolactone

Le poly-ε caprolactone (PCL) est un polyester aliphatique synthétique qui convient à la livraison contrôlée à cause de sa perméabilité et sa non-toxicité (Murphy, 1997). Sa polymérisation est influencée par des mécanismes anioniques et cationiques. Sa combinaison avec le PLGA permet l'optimisation de la vitesse de libération des molécules encapsulées (Chang et coll., 1986). La dégradation du PCL est beaucoup plus lente que celle du PLGA et convient davantage aux formulations nécessitant une libération pour une période d'un an ou plus (Murphy, 1997). Contrairement au PLGA, la dégradation du PCL ne génère pas de micro environnement acide (Jameela et coll., 1997). Les microsphères de PCL peuvent être préparées par émulsion ou évaporation de solvant en utilisant le dichlorométhane (DCM) comme solubilisant et l'alcool polyvinyle (PVA) comme surfactant. La fabrication de microsphères constituées de PCL et de PLGA a aussi été étudiée et leur phagocytose par les macrophages est significative (Murillo et coll., 2002).



## **2.14.5 Microsphères de polymères lactides et glycolides**

### **2.14.5.1 Composition**

Le PLGA est un composé polyester aliphatique constitué de un ou plusieurs monomères d'acides hydroxy, soit les acides D-lactiques et L-lactiques et d'acides glycoliques. Ce matériau de libération contrôlé peut réguler la livraison de peptides et de protéines pour une période de un à quatre mois, ce qui représente une alternative intéressante pour un animal d'élevage comme le porc où la période de production est de 5 à 6 mois (Jiang et coll., 2005).

### **2.14.5.2 Historique d'utilisation**

Les polymères lactides utilisés en vaccinologie sont l'homopolymère de poly (L-lactide) (PLA) et le copolymère de PLGA. Le PLGA est utilisé chez les humains comme matériel de suture et aussi comme système de livraison contrôlée. Des médicaments utilisés dans le traitement du cancer de la prostate tels que Lupron Depot® (TAP Pharmaceutical Products) et Zoladex® (Zeneca) sont licenciés en Europe et aux États-Unis (Singh et coll., 1997a). Les molécules de PLGA sont biodégradables et biocompatibles (Singh et coll., 1997a). Des études de pharmacotoxicité ont établi que les microsphères de PLGA ne sont ni toxiques, ni tératogènes et ni embryotoxiques chez les rongeurs (Chaudhury et coll., 1996; Chandrasekaran et Chaudhury, 1996).

### **2.14.5.3 Formulation de la préparation de microsphères par évaporation de solvant**

Les méthodes de préparation de microsphères varient essentiellement selon la matrice utilisée et l'antigène à encapsuler. La présente partie vise à décrire la principale méthode utilisée pour les microsphères de PLGA, soit l'évaporation de solvant, et les paramètres influençant les caractéristiques significatives en ce qui concerne la vaccinologie.

#### **2.14.5.3.1 Émulsion primaire w/o**

La première étape de cette méthode consiste à former une première émulsion composée d'une phase aqueuse, la solution antigénique, et d'une phase organique, la

solution polymérique. L'émulsion primaire est contenue dans un solvant organique qui sera ultérieurement extrait de l'émulsion. Le choix du solvant importe puisqu'il affecte différentes caractéristiques des microparticules et peut induire d'importants changements quant à l'intégrité de l'antigène. Le DCM est favorisé par rapport à l'acétate d'éthyle, bien que ce dernier soit moins toxique (Singh et O'Hagan, 1998). Cependant, le PLGA est plus soluble dans le DCM et le point d'ébullition du DCM est moins élevé, ce qui facilite son évaporation (Singh et O'Hagan, 1998). L'évaporation trop rapide de l'acétate d'éthyle rend la reproductibilité problématique (Cleland et coll., 1994). La taille finale des microsphères dépend en partie de la concentration de polymère contenue dans la première émulsion. Plus la concentration initiale de polymère est élevée, plus la taille des microsphères sera importante. A titre d'exemple, une microsphère de PLG plus petite que 5 $\mu$ m nécessite une concentration initiale de PLG de 2 à 5% (Singh et O'Hagan, 1998). La sonication ou l'homogénéisation de la solution polymérique avec la solution antigénique aqueuse formera l'émulsion primaire, consistant en une suspension de très fines microparticules. Selon la nature de l'antigène utilisé, l'ajout d'agents stabilisants lors de cette étape peut être requis afin d'augmenter la stabilité de l'émulsion, d'aider à la rétention des antigènes dans les microcapsules et de prévenir la coalescence des particules en un agrégat. Cependant, dans la plupart des cas, la présence de protéines est suffisante pour stabiliser l'émulsion (Raghuvanshi et coll., 1993). Les forces de cisaillement générées durant l'émulsion primaire w/o sont responsables de la présence de protéines à la surface des microsphères (Takahata et coll., 1998).

#### 2.14.5.3.2 Émulsion secondaire w/o/w

A cette première émulsion est incorporé un large volume de solution en phase aqueuse. La solution est homogénéisée ou soniquée, formant une émulsion secondaire w/o/w. Celle-ci nécessite absolument l'emploi d'un stabilisant qui sera choisi en fonction de la taille des microsphères, de la porosité désirée et du type de solvant utilisé initialement. Parmi les plus utilisés, on compte le PVA, le polyvinyle de pyrrolidone et la cellulose de méthyle (Singh et O'Hagan, 1998). Le PVA est le surfactant polymérique le plus utilisé à cause de sa non-toxicité. Cependant, il se lie à la structure du polymère, reste à la surface des particules et est difficile à éliminer (Carrio et coll., 1991 ; McGee et coll., 1997). Une concentration insuffisante de stabilisant, de quelque nature qu'il soit, donne lieu à une formulation où la taille des microsphères est irrégulière et occasionne une diminution du chargement antigénique.

#### 2.14.5.3.3 Élimination du solvant organique

Le solvant organique doit être extrait de la solution w/o/w afin de permettre la formation de microparticules solides. Ceci peut être accompli par évaporation ou par extraction du solvant (Singh et coll., 1997b; Alonso et coll., 1994). L'évaporation graduelle du solvant par agitation permet l'obtention d'une préparation finale est uniforme, non poreuse et onctueuse. La méthode d'extraction du solvant se fait par l'incorporation de la solution w/o/w dans un excès de solution aqueuse. Les gouttelettes de polymères durcissent rapidement pour former les microparticules. Cette méthode est rapide, mais la surface des microsphères est poreuse et fissurée, pouvant conduire à une libération trop rapide des antigènes encapsulés (Singh et O'Hagan, 1998).

#### 2.14.5.3.4 Récupération des microsphères

Après l'évaporation du solvant, les microsphères sont récupérées par centrifugation et l'excès d'eau est retiré par vacuum, par exposition à l'azote ou par lyophilisation. Cette dernière méthode réduit les pertes de microsphères, mais l'intégrité de certaines protéines peut être compromise (Jeffrey et coll., 1991).

#### 2.14.5.3.5 Caractérisation des microsphères et de l'antigène encapsulé

L'évaluation des microsphères obtenues peut être effectuée par plusieurs méthodes: diffractométrie au laser (estimation de la taille), microscopie électronique à balayage (évaluation de la surface), quantification du solvant et des stabilisants résiduels, stabilité de stockage et vitesse de libération des antigènes (O'Hagan et coll., 1995a). L'intégrité antigénique peut être déterminée *in vivo* et *in vitro* par SDS-PAGE, immunobuvardage de type Western et essais d'association aux récepteurs (Singh et O'Hagan, 1998). L'évaluation *in vitro* est utile pour définir les conditions optimales d'encapsulation. L'évaluation *in vivo* permet de mieux définir la formulation et la capacité des antigènes encapsulés à induire une réponse immunitaire.

#### 2.14.5.4 Cinétique de dégradation et de relargage

Le choix de la matrice est important puisque son métabolisme *in vivo* et sa dégradation spécifique permettent la libération des antigènes. La popularité du PLGA comme véhicule vaccinal est attribuée en partie à sa versatilité cinétique. Contrairement

aux autres matériaux, la dégradation des polymères lactides est solidement documentée. Ils sont dégradés principalement par clivage non-hydrolytique pour former les acides lactiques et glycoliques, des composés non toxiques (Coombes et coll., 1999). La vitesse d'hydrolyse des liens esters dépend du poids moléculaire des composantes des microsphères, la surface de la particule et du ratio lactide : glycolide (Morris et coll., 1994). Certains antigènes contenus dans les microsphères de PLGA peuvent être dégradés rapidement dû à l'hydrolyse rapide du véhicule de livraison et à la production simultanée d'acides à l'intérieur de la particule (Lavelle et coll., 1999). Il est cependant difficile d'étudier l'intégrité des protéines encapsulées puisque leur extraction des microsphères requiert des techniques dénaturantes.

Les protéines encapsulées atteignent l'environnement extérieur par diffusion à travers les pores de la matrice et par la dégradation de la microparticule (Morris et coll., 1994). La dégradation de la matrice, ou la libération des antigènes, dépend de la taille et du matériel qui constitue la matrice. Il existe deux modes de livraison d'antigènes encapsulés : continu et discontinu. Le mode continu se caractérise par la libération progressive de l'antigène sur une période de temps connue. Le mode discontinu se définit par la libération rythmée de l'antigène. Ce dernier est contenu dans des microsphères de différentes tailles et différentes compositions (Aguado et Lambert, 1992). Le patron de relargage continu comporte à son tour deux phases principales. La première consiste en une libération rapide de 60% des antigènes encapsulés et des protéines en surface, nécessaire pour stimuler une réponse immunitaire primaire importante. Cette phase est suivie par une libération plutôt lente des protéines encapsulées (Coombes et coll., 1999). Les composés de poids moléculaires moyens et élevés ainsi qu'un faible chargement protéique favorisent une libération discontinue, tandis que les composés de faible poids moléculaires et un chargement protéique important favorisent une libération continue (Jiang et coll., 2005). De plus, la période réfractaire dans les formulations à libération discontinue peut être contrôlée en paramétrant le ratio d'acides lactiques et glycoliques. Un mélange de microsphères de tailles et compositions différentes permet une libération d'antigènes à différents temps prédéterminés (Lavelle et coll., 1999; Singh et coll., 1997b).

#### 2.14.5.5 Intégrité des antigènes encapsulés

La stabilité des antigènes protéiques joue un rôle important dans la qualité et la magnitude de la réponse immunitaire des vaccins monodoses puisqu'il est possible que

des protéines dégradées ne puissent éliciter une réponse immunitaire protectrice (Jiang et coll., 2005).

#### 2.14.5.5.1 Mécanismes de dénaturation protéique

La nature physico-chimique des antigènes protéiques est habituellement complexe, ce qui complique davantage l'analyse de leur stabilité que celle des drogues de faible poids moléculaires ou des molécules organiques. L'instabilité chimique des protéines, encapsulées ou non, implique la formation ou la scission de liens donnant lieu à une nouvelle entité chimique. L'hydrolyse, la déamidation, la racémisation et l'oxydation sont des mécanismes de dégradation communs associés à l'encapsulation (Jiang et coll., 2005; Fu et coll., 2000). L'instabilité physique réfère aux changements apportés dans les structures secondaires, tertiaires et quaternaires des protéines et inclue la dénaturation, l'agrégation et l'adsorption. Les processus chimiques et physiques peuvent être étroitement reliés puisque le changement de conformation peut accélérer l'instabilité chimique et vice-versa. Le changement de conformation, l'agrégation, l'hydrolyse, l'oxydation et la déamidation sont les voies de dégradation les plus communes (Jiang et coll., 2005).

#### 2.14.5.5.2 Dommages dû à l'acidité

La dégradation non enzymatique du PLGA a lieu en 2 phases. La première implique la scission hydrolytique des liens esters, générant les acides monomériques lactiques et glycoliques, non toxiques, qui seront éliminés par le cycle de Krebs (Tamber et coll., 2005). Lors de la deuxième phase, la masse de la microsphère diminue. La vitesse de la scission polymérique est autocatalysée par les produits de dégradation acides (Fu et coll., 2000). Des études ont démontré, par l'emploi de différentes méthodes expérimentales, la présence d'un environnement acide à l'intérieur des microsphères (Vert et coll., 1991; Goepferich, 1996; Uchida et coll., 1996) dont le pH se situe habituellement en bas de 5 (Shenderova et coll., 1998; Li et Schwendeman, 2005). Le centre des microsphères se dégrade plus rapidement que la surface à cause de l'accumulation de produits acides et de la diffusion restreinte de ces produits. Les microsphères de petite taille ont un pH plus neutre que les microsphères de grande taille lors d'incubation en solution saline. Ceci est dû au trajet de diffusion plus court pour les produits de dégradation qui autocatalysent la dégradation hydrolytique de la matrice (Li et Schwendeman, 2005). L'acidification des polymères par hydrolyse peut être un problème

quant à la stabilité de l'antigène encapsulé lorsque les microparticules sont stockées (Corbel, 1996). L'environnement acide endommage les protéines par dénaturation, agrégation, fragmentation et par association avec la surface interne du polymère (Lavelle et coll., 1999). Certains antigènes ne démontrent pas de sensibilité au microenvironnement acide, comme la sous-unité B de la toxine cholérique (O'Hagan et coll., 1995b).

#### 2.14.5.5.3 Utilisation d'excipients

Les excipients dotés d'activités interfaciales, comme l'albumine sérique bovine (BSA), ont été utilisés comme stabilisants (Tamber et coll., 2005). La récupération de RNase d'un système w/o est maximisée après addition d'une concentration d'albumine sérique humaine qui excède celle de la RNase (Sah, 1999). Ceci est imputé à la plus grande vitesse de transfert de l'albumine à l'interface instable w/o, minimisant l'adsorption et l'agrégation de la protéine à cet interface instable. Des résultats similaires ont été obtenus avec la BSA (Johansen et coll., 1999). La gélatine de type A peut être utilisée comme excipient à la place des albumines sériques, puisque celles-ci peuvent induire une réponse immunitaire non désirée (Chang et Gupta, 1996). L'ajout de stabilisants comme la gélatine est prometteur en ce sens qu'elle augmente la stabilité antigénique de la toxine tétanique contenue dans des microsphères (Chang et Gupta, 1996).

La neutralisation des acides libérés est possible par la co-incorporation d'hydroxyde de magnésium ou de magnésite. La coencapsulation d'ovalbumine avec le carbonate de magnésium augmente le pH à l'intérieur des microsphères (Li et Schwendeman, 2005). L'addition d'agents stabilisants (BSA, tréhalose, carbonate de calcium et  $\gamma$ -hydroxypropylcyclodextrine) lors de l'encapsulation de la toxine tétanique augmente la réponse humorale de souris BALB/c à la toxine (Audran et coll., 1998). D'autres études rapportent des réponses humorales significatives obtenues avec des microsphères sans stabilisant (Gupta et coll., 1997; Alonso et coll., 1994).

Les osmolytes, tels que les polyols, les carbohydrates et les acides aminés sont des stabilisants protéiques souvent utilisés dans les formulations parentérales (Pikal, 1991). Leur pouvoir stabilisant est attribuable au renforcement de la structure de l'eau, favorisant la forme compacte native et l'inhibition de la dénaturation protéique (Lee et Timasheff, 1981). Comme l'agrégation ou l'exclusion résulte principalement d'interactions hydrophobes et électrostatiques et de liens hydrogènes, la somme de ces interactions est

différente pour chaque antigène. Il est donc important d'examiner la nature individuelle des osmolytes par rapport à un antigène donné afin d'évaluer si la présence d'osmolyte a un effet stabilisant ou déstabilisant (Arakawa et coll., 1991).

#### 2.14.5.6 Efficacité immunitaire de la livraison par microsphères de PLGA

Beaucoup de vaccins encapsulés dans les microsphères de PLGA ont été évalués chez plusieurs espèces animales pour la protection contre un challenge. Les différences physiologiques des espèces animales étudiées doivent être considérées puisque la structure des plaques de Peyer varie entre les espèces, surtout au niveau du nombre de cellules M (Jepson et coll., 1995). Les variations entre les animaux d'une même espèce sont aussi prises en compte.

Plusieurs études ont été effectuées afin d'étudier la cinétique de dégradation et la capture des microsphères de PLGA. La capture des microsphères dépend de la dose, de la taille, de l'hydrophobicité, de la charge et de la composition polymérique des particules (Eldridge et coll., 1990; Jani et coll., 1992). Les microsphères de 10  $\mu\text{m}$  ou moins ont une activité d'adjuvant via leur capture par les macrophages et cellules dendritiques (Singh et O'Hagan, 1999). Les antigènes encapsulés dans des microsphères peuvent prolonger la présentation des macrophages et cellules dendritiques aux lymphocytes cytotoxiques neuf jours de plus que l'antigène soluble (Audran et coll., 2003). L'ingestion de microsphères par les macrophages permet aussi la procession des antigènes et leurs présentations aux cellules T auxiliaires (Coombes et coll., 1999). Des études rapportent le potentiel d'antigènes encapsulés à éliciter une réponse de lymphocytes T cytotoxiques (Nixon et coll., 1996 ; Partidos et coll., 1997).

Les vaccins livrés par microsphères sont reconnus pour induire une bonne réponse humorale (IgG et IgM systémiques et IgA mucosaux) et cellulaire, nécessaire pour lyser les cellules infectées et pour l'élimination des pathogènes intracellulaires (Liu et coll., 2001). La réponse humorale à un antigène encapsulé dans des microsphères de PLGA a lieu de deux à trois semaines après la vaccination et ce niveau reste stable et haut six mois après vaccination (Liu et coll., 2001). Le passage de microparticules des ganglions mésentériques jusqu'à la rate permet d'établir une réponse immunitaire systémique contre l'antigène qu'elles transportent (Fattal et coll., 2002). Les microsphères ayant un diamètre de 5  $\mu\text{m}$  ou moins peuvent, à partir des macrophages environnant les plaques de Peyer, rejoindre les ganglions mésentériques, tandis que les microsphères de

5-10  $\mu\text{m}$  restent dans les plaques de Peyer et agissent comme système de libération d'antigènes (Tabata et coll., 1996; Eldridge et coll., 1991). L'adjuvantité des microsphères de PLGA est comparable à celle obtenue avec l'adjuvant de Freund (O'Hagan et coll., 1991 ; Eldridge et coll., 1991). Malgré la biocompatibilité du PLGA, la faible réponse inflammatoire produite lors d'essais d'injection peut être à l'origine des propriétés adjuvantes du PLGA (Gupta et coll., 1997).

Reddin et coll. (1998) ont démontré le potentiel immunoprotecteur d'un vaccin de PLGA chez des souris vaccinées oralement par l'antigène F1 de *Yersinia pestis* encapsulé dans des microsphères de PLGA. La phosphorylcholine, un antigène commun de *S. Typhimurium* et d'autres bactéries, a aussi offert une protection suite à un challenge lorsque encapsulée dans des microsphères de PLGA et administrée oralement (Allaoui-Attarki et coll., 1997). D'un point de vue clinique, l'immunité induite par la vaccination de microsphères contenant des souches de *S. Enteritidis* mortes réduit l'excrétion de salmonelles dans les matières fécales de volaille. Les poulets vaccinés excrètent trois fois moins de bactéries que les poulets non vaccinés. De plus, les poulets immunisés montrent deux fois moins de colonisation dans les organes internes que les poulets contrôles (Liu et coll., 2001). Pour le moment, aucune étude n'a rapporté l'induction d'une réponse immunitaire protectrice chez les humains.

#### 2.14.5.7 Adhérence à la muqueuse intestinale et aux cellules M des plaques de Peyer

Les antigènes particuliers sont des immunogènes mucosaux plus efficaces que les antigènes solubles puisqu'ils sont aisément capturés par les plaques de Peyer (Eldridge et coll., 1991). L'espèce vaccinée est un facteur à considérer dans l'absorption des microsphères. Certaines microsphères polymériques se comportent différemment selon l'espèce dans laquelle elles sont administrées (Pappo et coll., 1989). Les microsphères polymériques ont la capacité d'adhérer fortement à la muqueuse intestinale. La livraison de ces microsphères par voie orale diminue donc leur biodisponibilité puisque leur adhérence augmente le temps de résidence (Akiyama et coll., 1995). Les plaques de Peyer semblent être le site d'attachement prédominant des microparticules même lorsqu'elles ne sont pas ciblées. La transcytose des microsphères au niveau des plaques de Peyer est limitée aux microsphères de 1 à 10  $\mu\text{m}$  (Eldridge et coll., 1990). Les microsphères de 1 à 5  $\mu\text{m}$  peuvent migrer vers d'autres tissus lymphoïdes par les voies lymphatiques conventionnelles et seraient responsables de la réponse humorale systémique. Les microsphères de plus de 5  $\mu\text{m}$  ont tendance à demeurer dans les



plaques de Peyer et seraient probablement responsables de l'induction d'une réponse humorale mucoale puisqu'elles séjournent dans les sites inducteurs d'IgA des plaques de Peyer (Eldridge et coll., 1990). Par un modèle *ex vivo*, l'adhérence spécifique de microsphères de PLGA de 1 à 10  $\mu\text{m}$  aux cellules M chez le porc a été confirmée. Les microsphères sont transloquées par les cellules M et transportées à la région du dôme des plaques de Peyer. Les auteurs ont aussi observé le transport des particules dans les invaginations basolatérales des cellules M et leur migration subséquente dans les régions folliculaires, où elles s'associent avec les macrophages et les vaisseaux lymphatiques (Torché et coll., 2000). Bien que la taille soit un paramètre important dans la capture des particules, d'autres caractéristiques sont à considérer, comme les propriétés physicochimiques puisqu'elles influencent les interactions avec l'environnement (Torché et coll., 2000).

## **2.15 Bioadhésines**

### **2.15.1 Principes généraux**

Les sécrétions intestinales peuvent diluer et entraîner les microsphères à l'extérieur de l'intestin, voire de l'organisme (Clark et coll., 2000a). La livraison mucoale de microsphères peut être optimisée par l'utilisation de bioadhésines pouvant s'associer à des composantes de la surface intestinale. La conjugaison de bioadhésines permet d'augmenter le temps de résidence des microsphères en un endroit donné. En plus de se lier efficacement à leurs cibles, les bioadhésines doivent être stables dans le tractus digestif, non immunogènes, non toxiques et compatibles avec les facteurs présents dans le lumen intestinal comme la flore intestinale et les digesta. Les bioadhésines peuvent se lier aux mucoadhésines ou à la surface apicale de cellules intestinales. La première option peut s'avérer moins efficace puisque la couche de mucus intestinal est continuellement remplacée, éliminant ainsi les microsphères (Lehr et coll., 1991). L'interaction avec les cellules épithéliales est plus intéressante, puisqu'elles sont physiquement plus stables et peuvent endocyter les particules afin qu'elles traversent la barrière intestinale (Lehr, 1994).

### **2.15.2 Lectines**

Les bioadhésines les plus étudiées jusqu'à présent sont les lectines, groupe de protéines et de glycoprotéines pouvant se lier de façon réversible à des résidus de carbohydrates de glycoconjugués complexes (Sharon, 1993). La spécificité tissulaire des

carbohydrates permet de cibler les microparticules aux cellules M, aux cellules carcinomes et leucémiques et aux cellules rénales (Clark et coll., 2000a). Les cellules épithéliales du tractus intestinal sont recouvertes de glycocalyx, composé de glycoconjugués liés à la membrane épithéliale. L'expression des différents glycoconjugués dépend de l'espèce animale et aussi de l'endroit où le glycocalyx est prélevé dans le tractus intestinal. Ainsi, les glycoconjugués peuvent être utilisés comme cible spécifique de vaccins puisque le glycocalyx des cellules M est différent de celui trouvé sur les entérocytes (Jepson et coll., 1996; Clark et coll., 2000b). La lectine UEA-1 s'associe avec les résidus de  $\alpha$ -L-fucose retrouvés sur la membrane apicale des cellules M de souris. Des microsphères de polystyrène enrobées de UEA-1 s'associent aux cellules M et sont endocytées efficacement (Foster et coll., 1998). La lectine de la tomate, est, contrairement à la plupart des lectines, non-toxique et ne se dégrade pas dans l'appareil gastro-intestinal lors d'administration orale. Cette lectine a la capacité de s'associer avec les résidus de N-acetylglucosamine présents chez les entérocytes de porc *in vitro* et des microsphères enrobées ont été étudiées en vue de tirer profit de cette liaison (Lehr et coll., 1992). Cependant, la lectine de la tomate est immunogène et induit la production d'IgG et d'IgA, limitant son utilisation comme bioadhésine intestinale (Naisbett et Woodley, 1995). Le caractère associatif des lectines semble être hétérogène et peut varier entre les cellules M d'un même individu (Jepson et coll., 1996). L'immunogénicité de UEA-1 a été évaluée chez la souris. Son administration orale induit des niveaux d'IgA comparables aux contrôles dans la salive et les sécrétions nasales, tout comme les lectines PHA et "wheat germ agglutinin" (WGA) (Lavelle et coll., 2000).

### 2.15.3 Immunoglobulines

En étant spécifiques à un antigène tissulaire, les immunoglobulines permettent de mieux cibler la microsphère vers le tissu d'intérêt. Les IgA et IgG adhèrent de façon spécifique à la membrane apicale des cellules M. L'adhérence sélective d'IgA monoclonaux aux cellules M pourrait être mise à profit en vue de cibler des microparticules enrobées d'IgA à ces cellules (Weltzin et coll., 1989). La présence d'IgA sur la surface de liposomes et de billes de latex augmente l'association des liposomes aux plaques de Peyer (Zhou et coll., 1995; Porta et coll., 1992). Des microsphères de polystyrènes enrobées avec des anticorps monoclonaux IgM spécifiques aux épitopes membranaires des cellules M de lapin sont internalisées trois fois plus efficacement que des microsphères enrobées avec des anticorps non spécifiques (Pappo et coll., 1991). Cependant, l'administration orale des microparticules enrobées d'immunoglobulines est

problématique puisque ces dernières sont prédisposées à une importante dégradation lors de leur passage à travers le tractus gastro-intestinal.

**Chapitre 3.**

**Development of a subunitary vaccine against asymptomatic  
*Salmonella* infections in swine**

Article soumis pour publication dans la revue

Canadian Journal of Veterinary Research

Development of a subunitary vaccine against asymptomatic *Salmonella* infections in swine

Amélie K. Desautels<sup>1</sup>, Ann Letellier<sup>1</sup>, Julie Brassard<sup>1</sup>, Robert Emery Prud'homme<sup>2</sup>, Carole Fraschini<sup>2</sup>, Sylvain Quessy<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc, Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

<sup>2</sup>Département de chimie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

Address for correspondence and reprint request to Dr S. Quessy, tel.: 450 773-8521 X8242, fax: 450-778-8113, [REDACTED]

**Keywords:** *Salmonella* Typhimurium; Swine; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Poly (DL-lactic-co-glycolic) acid microspheres; Vaccine

## Abstract

Our laboratory has previously demonstrated the immunogenicity of *Salmonella* Typhimurium glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in experimentally and naturally infected pigs. This study aimed at initiating the formulation of a GAPDH vaccine for further evaluation of its immunoprotective potential by experimental infectious challenge in swine. Observation of GAPDH enzymatic activity on whole *S. Typhimurium* bacteria suggests an extracytosolic location for this cytosolic housekeeping protein. GAPDH coding gene *gapA* was cloned and sequenced. *gapA* consists of an open reading frame of 996 nucleotides and encodes a rather hydrophilic 331 amino acids polypeptide with a deduced molecular weight of 35586 Da. The protein contains no transmembrane domains and shows a high degree of similarity with GAPDH amino acid sequence of *S. Typhi* and enterohemorrhagic *E.coli* O157:H7 among others. The protein was overexpressed as a (His)<sub>6</sub> fusion protein in M15[pREP4] by inserting coding sequence in pQE-30 vector and purified by metal affinity chromatography. (His)<sub>6</sub>GAPDH was coencapsulated with BSA in PLGA microspheres by a double emulsion solvent evaporation technique. BSA acts as an excipient and its presence in aqueous phase was found necessary for (His)<sub>6</sub>GAPDH encapsulation. Incorporation of proteins was evaluated by dissolution of microspheres in organic solvent and their recovery in aqueous phase. Both proteins were successfully coencapsulated in PLGA microspheres. We have established a protocol for coencapsulation of (His)<sub>6</sub>GAPDH, a newly identified immunogenic surface protein of *S. Typhimurium*.

## Introduction

A substantial number of toxo-infections are caused by non-typhoidal *Salmonella* worldwide. In 1995, more than 1.3 billion cases of clinical infections were reported, whereas 3 millions patients died of salmonellosis (Pang et al., 1995). Most cases are foodborne and many food products incorrectly pasteurized are potential *Salmonella* sources (Altekruse et al., 1997). Pork meats account for 11% of salmonellosis cases (Bryan, 1988). Among 2500 *Salmonella* serovars, Typhimurium is the most frequently isolated from pigs in Canada (Quessy et al., 2001). Most common outcome of *Salmonella* spp. infection in swine is asymptomatic carriage and accidental contamination of meat during the slaughter process may expose humans to infection. However, humans can become clinically ill from almost all serotypes, *S. Typhimurium* being one of the most prevalent. Because carrier pigs without clinical signs shed significant number of *Salmonella* in feces up to 28 weeks after exposure (Wood and Rose, 1992), they are considered as the main contamination source for healthy animals and consumers. Reduction of carriage would thus be beneficial to decrease exposure. Organs involved in pig's asymptomatic infection include tonsils of the soft palate, ileon Peyer's patches, cæcum, colon and adjacent lymph nodes (Wood and Rose, 1992; Côté et al., 2004). Since *Salmonella* gains entrance in host through an orofecal route of exposure, mucosal immune effectors play a key role in controlling infection. Secreted IgAs can prevent primary stage infection (Clarke and Gyles, 1993; Singh et al., 1996) even in the absence of other immune mechanisms (Michetti et al., 1992). They restrain *Salmonella* motility by association with surface epitopes (Lamm, 1997), block of the microbial sites mediating attachment to epithelia by steric hindrance (Kraehenbuhl and Neutra, 1992) and eliminate antigen by immune exclusion (van Egmond et al., 2001). Emerging antibiotic resistant strains of *Salmonella*, such as multi resistant strains of *S. Typhimurium* DT104, is of concern considering that 2% of pig clinical isolates are resistant to antimicrobials such as ceftiofur (CIPARS, 2005). Increasing antibioresistance in zoonotic pathogens raises concern about massive antibiotic administration. While killed vaccines are poor inducers of mucosal immunity and logistically inappropriate for mass vaccination, manipulation of live attenuated vaccines is controversial due to possible residual virulence and survival in the final product (Barrow et al., 2001). New prophylaxis methods are thus needed in order to reduce carriage of *Salmonella* in swine.

Oral administration of proteinaceous antigens may induce efficient stimulation of mucosal immune system (Muir et al., 1994). However, protection of orally delivered

antigens from hostile gastrointestinal environment is needed and this is achievable through its encapsulation in poly (DL-lactic-co-glycolic acid; PLGA) microspheres, a copolymer having a long history as safe material used in drug preparation and implants (Singh et al., 1997). PLGA microspheres have adjuvant effects because they are readily phagocytosed by macrophages and dendritic cells (Singh and O'Hagan, 1999). Moreover, they can induce humoral response lasting up to 6 months after vaccination (Liu et al., 2001). Microspheres of 1 to 10  $\mu\text{m}$  are good inducers of mucosal immune response since M cell transport of microspheres to adjacent immune centers is size limited (Eldridge et al., 1991). Specific adherence of 1 to 10  $\mu\text{m}$  microspheres to pigs Peyer's patches was demonstrated in an *ex vivo* model with subsequent migration of microspheres to follicular regions (Torché et al., 2000).

We have recently identified a 37 kDa immunogenic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expressed *in vivo* and *in vitro* at all steps of infection in *S. Typhimurium* (Corriveau et al., 2002). GAPDH is a glycolytic enzyme catalyzing the oxidative phosphorylation of glyceraldehyde-3-phosphate to 1,3-biphosphoglycerate in the presence of cofactor nicotinamide adenine (NAD) and of an inorganic phosphate molecule. An increasing number of reports of immunogenic GAPDH from bacterial and parasitic species are published. In trematode *Schistosoma mansoni*, epitopic determinant coupled to ovalbumin is partly responsible for resistance to challenge in mice (Argiro et al., 2000). Immunization with DNA vaccine encoding GAPDH of facultative intracellular bacteria *Brucella abortus* decreases spleen bacterial load of challenged mice (Rosinha et al., 2002). Intraperitoneal administration of purified or recombinant surface GAPDH of gram negative *Edwardsiella tarda* induces humoral protective response in Japanese flounders from disease and increases their survival rate (Liu et al., 2005). The purpose of this study is to clone and purify *S. Typhimurium* GAPDH for basic characterization and encapsulation of the recombinant protein in PLGA microspheres for further vaccine studies.



## Material and methods

### Bacterial strains, plasmids and culture conditions

Chromosomal DNA used in this study was derived from *S. Typhimurium* DT108 B1 which was isolated from a septicemic swine by our laboratory. B1 strain was routinely cultured on trypticase soy supplemented with 5% sheep blood and Luria Bertani (LB) broth without agitation at 37°C. The pCR2.1 vector has 3'T overhangs and was maintained in INV $\alpha$ F' competent cells, supplied from a TA cloning kit (Invitrogen, Burlington, Ontario). Transformed *E. coli* INV $\alpha$ F' was cultured in LB broth or agar containing ampicillin (100  $\mu$ g/mL) and kanamycin (50  $\mu$ g/mL) at 37°C. The plasmid pQE-30 was obtained from the QIAexpressionist (Qiagen, Mississauga, Ontario) and used for overexpression of Typhimurium B1 GAPDH in competent *E. coli* M15[pREP4]. pREP4 plasmid regulates protein expression by production of high level of lac repressor protein. The vector permitted overexpression of *S. Typhimurium* B1 GAPDH and was maintained in host strain by growing on LB broth or agar supplemented with ampicilline (100  $\mu$ g/mL) and kanamycin (25  $\mu$ g/mL) at 37°C.

### Determination of GAPDH enzymatic activity on whole Typhimurium B1 cells

Surface epitopes are usually needed in order to achieve adequate protection against bacterial infection (Michetti et al., 1992). It is possible to assess the GAPDH activity spectrophotometrically since the reduction of NAD cofactor during GAPDH catalyzed oxidative phosphorylation can be measured at a wavelength of 340 nm (OD<sub>340</sub>) (Ferdinand, 1964). Evaluation of enzymatic activity on whole growing bacteria can be exploited as a mean to determine the presence of surface GAPDH (Pancholi and Fischetti, 1992; Gil-Navarro et al., 1997). Determination of GAPDH activity at *S. Typhimurium* B1 surface was performed according to methods previously described by Brassard et al. (2004) and Villamón et al. (2003). Briefly, the 1 mL reaction mixture consisted of 50  $\mu$ l of B1 bacterial culture in mid logarithmic phase ( $A_{600}$ =0.640), 100  $\mu$ l of 10 mM NAD<sup>+</sup> (Sigma Chemical, Oakville, Ontario), 7  $\mu$ l of 50 mg/mL DL-glyceraldehyde-3-phosphate (G-3-P) (Sigma) and 734  $\mu$ l of assay buffer (40 mM triethanolamine, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 mM EDTA, 20 mM 2-mercaptoethanol and 0.1% (v/v) Tween 20, pH 8.6). Negative control assays were done in the absence of substrate G-3-P. Optical density

was measured at 340 nm ( $OD_{340}$ ) for 20 minutes at every 20 seconds interval using a Novaspec II spectrophotometer (Pharmacia).

### **PCR amplification and sequencing of *gapA***

*S. Typhimurium* B1 chromosomal DNA was isolated using the DNeasy Tissue Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Primers were designed on the basis of the previously reported nucleotide sequence of *gapA* gene of *S. Typhimurium* LT2. The oligonucleotides used for GAPDH gene amplification were GAPF and GAPR1 and had the following sequences: GAPF 5'- ATG ACT ATC AAA GTA GGT ATC AAC G-3' and GAPR1 5'-TTA TTT GGA GAT GTG AGC AAT CAG G-3'. PCR reaction was done according to Brassard et al. (2004). Amplifications were carried out according to the following schedule using *Taq* polymerase (Invitrogen, Burlington, Ontario): 94°C for 1 min; 94°C for 1 min, 45°C for 45 s and 72°C for 1 min (35 cycles) and 72°C for 5 min. Amplicons were analyzed with 1 kb DNA ladder (Invitrogen) by 2% agarose gel electrophoresis. The PCR fragment was extracted from gel and purified using the QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen) and ligated in pCR2.1 overnight at 14°C using T4 DNA ligase (Invitrogen). Correct insertion of PCR fragment in pCR2.1 was assessed by 2% agarose gel migration of EcoRI digested plasmid. Plasmid DNA containing *gapA* was purified from transformed INV $\alpha$ F' cells by QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen) and the cloned fragment was sequenced using M13 universal primers at the Sheldon Biotechnology Center (McGill University, Montréal, Québec).

### **Production of recombinant GAPDH**

GAPDH was overproduced in M15 cells using the pQE-30 bacterial expression vector. To do so, *gapA* was amplified using primers containing recognition sequences of restriction enzymes BamHI and Sall respectively. GAPFBAM primer sequence was 5'-CGC CGC GGA TCC ACT ATC AAA GTA GGT ATC AAC-3' and GAPRSAL primer sequence was 5'-GGC GCC GAA TTC GTC GAC TTA TTT GGA GAT GTG AGC AAT-3'. Added restriction sites are underlined. The start codon of GAPFBAM primer was removed since an ATG triplet is found in N-terminal of pQE-30. The PCR product was inserted in pCR2.1 as mentioned above. The generated pCR2.1 plasmid containing *gapA* was digested by BamHI and Sall restriction enzymes (Invitrogen) and the product of digestion was ligated into BamHI-Sall digested pQE-30 by T4 DNA ligase (Invitrogen) overnight at 14°C. The ligation mixture was then introduced in M15[pREP4] chemically competent

cells by heat shock and cells were transformed in Psi broth (LB medium, 4 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM KCl). Transformed *E. coli* was grown on selective medium and successful clones were selected by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot assay using the NiNTA conjugate (Qiagen).

### **Purification of (His)<sub>6</sub>GAPDH**

Purification of (His)<sub>6</sub>GAPDH was performed under native conditions. 100 mL of prewarmed selective media were inoculated with a previously grown 10 mL culture of pQE-30::*gapA* transformed M15[pREP4] cells. Recombinant protein overexpression was induced by addition of 1mM isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) in the medium when optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) has reached a value of 0.6. The cells were allowed to grow for an additional 5 hours at 37°C with agitation at 150 rpm and were then harvested by centrifugation (4000 g, 20 min). Pelleted cells were stored overnight at -20°C and were resuspended in lysis buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0). Lysozyme was added at a final concentration of 1 mg/mL and incubated on ice for 30 min. Cells were further disrupted by six 10s bursts of 100 W sonication and 10s pause each time with cooling on ice. Disrupted cell extract was centrifuged (10000 g, 30 min) at 4°C. The sonication supernatant was incubated with 50% nickel-nitriloacetic acid (Ni-NTA) slurry (Qiagen) overnight at 4°C to permit binding of the (His)<sub>6</sub>GAPDH to Ni-NTA resin by the mean of histidine residues strain of recombinant protein. The mixture was washed twice with buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0) and recombinant protein was eluted in 4 fractions of 750 μl in elution buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0). Fractions were pooled and desalted using the 10K MacroSep Centrifugation Device (Pall, Ann Harbour, Michigan, USA) in sterile deionized water or sterile 20 mM Tris, pH 7.2. Protein concentration was determined using the Bradford protein assay (Bio-Rad, Mississauga, Ontario).

### **(His)<sub>6</sub>GAPDH encapsulation in PLGA microspheres**

Small scale protein encapsulation was performed by double emulsion/evaporation technique (Singh and O'Hagan, 1998) at room temperature. Organic phase consisted of 250 mg of 65:35 PLGA (Sigma) dissolved in 5 mL dichloromethane (Sigma) by low heating and stirring. Aqueous phase was composed of 160 mg lyophilised (His)<sub>6</sub>GAPDH and 500 mg BSA (Sigma) dissolved in 3.5 mL of sterile deionized water and filtered. Protective effects of BSA during microencapsulation have been previously demonstrated

(Tamber et al., 2005). Primary emulsification of both phases was performed by sonication at 50W (Sonics Material Inc, Danbury, Connecticut, USA). The first w/o emulsion was poured into the outer aqueous phase composed of 25 mL of cold 2.5% (w/v) polyvinyl alcohol (PVA) (Sigma) dissolved in sterile deionized water. This preparation was emulsified by homogenisation (2500 rpm, 4 min) (PT3100, Polytron, Norcross, Georgia, USA). The w/o/w emulsion underwent mechanical stirring in chemical hood for 5 hrs in order to evaporate dichloromethane and allow microspheres hardening. Microspheres were recovered by centrifugation (10000g, 20 min), washed three times with sterile deionized water, frozen overnight and lyophilized. Microsphere formulation was observed by scanning electron microscopy (SEM).

### **Assessment of protein loading**

The loading of microspheres was determined by dissolution in dichloromethane and extraction of protein in water (Eldridge et al., 1991). Briefly, 275 mg of lyophilized microspheres were dissolved in a glass vial containing 5 mL of dichloromethane. 5 mL of water was added and the vial was shaken in order to recover released hydrophilic proteins in aqueous phase which was finally lyophilized. This process was repeated four times. Lyophilized proteins were resuspended in 400  $\mu$ l of water prior to SDS-PAGE and Western Blot for a 10X concentration factor.

### **Web-based databases and sequence analysis**

The DNA sequence of the *S. Typhimurium* LT2 *gapA* gene is available in the GenBank database under accession no. AE006468. Nucleotide and amino acid sequence homologies were sought using BLAST database. Hydrophobicity profile of the deduced amino acid sequence was evaluated using Kyte-Doolittle with a window of 19 (Kyte and Doolittle, 1982).

## Results

### Determination of GAPDH activity on *S. Typhimurium* cells

In order to determine the presence of active GAPDH in *Typhimurium* B1 cell wall, an enzymatic assay was done on mid logarithmic phase intact *S. Typhimurium* cells. GAPDH exposed at cell surface can catalyze oxidative phosphorylation and hence, generation of NADH should be observed in whole cell culture (Villamón et coll., 2003). Increasing enzymatic activity was detected over time (Figure 1), indicating that GAPDH catalytic sites and NAD binding domains are probably exposed at cell surface. Cells did not catalyze NAD reduction in the absence of G3-P. We ensured that enzymatic activity was not attributable to secreted or released from damaged cell by performing an enzymatic assay on culture supernatants. Since no NAD reduction was found in this situation (data not shown), it was assumed that GAPDH was not secreted nor released from cells.

### Sequencing of *gapA* and sequence similarity analysis

The gene encoding GAPDH was amplified with primers GAPFBAM and GAPRSAL using genomic DNA from *S. Typhimurium* B1 as a template. Fresh amplicon was cloned in pCR2.1 and its nucleotide sequence was determined. The coding sequence is composed of 996 nucleotides and has a G+C percentage of 50.90. The nucleotide sequence of *S. Typhimurium* B1 GAPDH shares 100% sequence homologies with *gapA* of *S. Typhimurium* LT2, 99% with *gapA* of *S. Paratyphi*, *S. Typhi* and *S. Cholerasuis*, 96% with *gapA* of various *E. coli* strains, including enterohemorrhagic O157:H7 strain and 90% with *K. pneumoniae gapA*. Other organisms GAPDH encoding genes similar to B1 *gapA* includes *C. freundii* (91% homology) and *K. oxytaca* (91% homology). The open reading frame predicts a 331-amino acid translation product with an estimated molecular mass of 35586.42 Da and a calculated isoelectric point (pI) of 6.81. A hydrophobicity plot of the predicted amino acid sequence was generated using a Kyte-Doolittle plot with a window of 19 (Doolittle and Kyte, 1982) and revealed neither transmembrane domains nor N-terminal signal sequence (Figure 2). Translated nucleotide sequence displayed amino acid sequence homologies with the species described above. Moreover, it has 84% identity with immunoprotective GAPDH of *E. tarda*.

### **Purification of (His)<sub>6</sub>GAPDH**

GAPDH was amplified by GAPFBAM and GAPRSAL and the fresh PCR product was subcloned in pCR2.1. By enzymatic digestion, the GAPDH fragment was inserted in an unidirectional manner in the multicloning site of digested pQE-30 vector. The construct was used to transform recipient M15[pREP4]. The six consecutive histidine residues in N-terminal of recombinant protein have a strong affinity for Ni-NTA and it was possible to purify soluble (His)<sub>6</sub>GAPDH by chromatography. Regulation of expression of (His)<sub>6</sub>GAPDH was done by the lac repressor protein encoded on the pREP4 plasmid. Expression of (His)<sub>6</sub>GAPDH was triggered by addition of IPTG which inactivates the lac repressors, permitting protein translation (Figure 3). Typical yield of the purification procedure was 8 mg/mL as determined by Bradford protein assay (Bio-Rad).

### **Formulation of GAPDH loaded PLGA microspheres**

Entrapment of recombinant GAPDH in PLGA microspheres was carried out through a double emulsion solvent evaporation protocol developed in our laboratory. This technique is characterized by the dissolution of the PLGA polymer in an organic solvent and its emulsification with an aqueous solution to generate the first emulsion. The latter is homogenized in an aqueous phase containing a surfactant followed by evaporation of the organic phase. Microspheres are collected and lyophilized. Morphology of lyophilized microspheres is studied by SEM. This method yields spherical microspheres with smooth and uniform surface as seen in figure 4. The mean particle diameter ranges from 1 to 10  $\mu\text{m}$ .

### **Assessment of protein loading**

In order to evaluate protein encapsulation efficiency of our double emulsion solvent method and ensure GAPDH encapsulation in PLGA microspheres, an *in vitro* dissolution assay was performed. Since PLGA is soluble in organic solvent, formulated microspheres were dissolved in dichloromethane and proteins were recovered in an aqueous phase followed by concentration. Fractions were resuspended in sterile deionized water and analyzed by SDS-PAGE. As shown in figure 5, BSA and GAPDH were recovered from aqueous phase in the four subsequent microspheres solutions, confirming encapsulation of GAPDH and BSA in PLGA microspheres.

## Discussion

In an attempt to study protein profile of different strains of *S. Typhimurium* grown under different conditions *in vivo* and *in vitro*, we have identified a 37 kDa protein by SDS-PAGE and immunoblot which is present at all stages of infection (Corriveau et al., 2002). N-terminal sequencing identified this protein as a GAPDH. We also studied serum from pigs with or without clinical signs sampled from a contaminated herd. All serum reacted with GAPDH by dot blot and Western immunoblot (unpublished results). GAPDH is also immunogenic in pigs with high and low seroconversion to *Salmonella* (unpublished results). Its immunogenicity in healthy-looking and convalescent swine from septicemia makes it a potential antigen candidate for prevention of asymptomatic *Salmonella* infection. However, its immunoprotective potential should be evaluated further in a mucosal vaccine model.

Presence of GAPDH at surface of bacteria, parasites and fungus is increasingly reported. Bacterial surface GAPDH have been observed mostly in Gram positive species and particularly in *Streptococcus* species (Pancholi and Fischetti, 1992; Brassad et al., 2004). To our knowledge, the observation of surface GAPDH in gram negative bacteria is restricted to *A. hydrophila* (Villamón et al., 2003) and *E. tarda* (Kawai et al., 2004). The observation of enzymatic activity on intact *S. Typhimurium* B1 cells indicates the tetrameric structure of surface GAPDH, since it is essential for the enzyme to be active (Walker et al., 1980). Partial or complete exposition of the enzyme to extracellular milieu renders GAPDH an accessible target for immunoglobulins.

The multifunctionality of surface GAPDH suggests its implications in virulence in few species. Binding of surface GAPDH to host proteins or tissues was studied in many bacterial and fungal species *in vitro* (Pancholi and Fischetti, 1992; Gozalbo et al., 1998). Adhesion of GAPDH with plasminogen and plasmin is probably part of the mechanisms contributing to invasiveness (Jobin et al., 2004). In enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), GAPDH and four other proteins are exclusively secreted when bacteria is in contact with HeLa cells. Those five proteins seem to be regulated by conditions known to control other virulence factors (Kenny and Finlay, 1995). Hence, GAPDH of EPEC and EHEC may be secreted at cell surface by a type III secretion system mechanism (Kenny and Finlay, 1995). No GAPDH cells surface targeting mechanisms have been identified until now to explain surface localization of a usually cytosolic enzyme. Transmembrane localisation of extracellular GAPDH is

questionable since study of amino acid sequence of GAPDH by Kyte-Doolittle hydrophathy plot revealed no transmembrane domains. Hydrophobic regions of our protein are more likely to be internal section of proteins gathered in core regions rather than transmembrane regions. Those regions could permit GAPDH-protein interaction at cell surface by hydrophobic binding. Further studies should be done to assess the exact location of GAPDH at surface in order to better understand its role in virulence.

Cloning of coding sequence in pQE-30 vector permitted its purification because of the hexahistidyl string added at the N-terminal end of the protein. Predicted amino acid sequence of *S. Typhimurium* encoded GAPDH shows significant similarity with GAPDH of *Salmonella* serovars Typhimurium, Typhi, Cholerasuis and with *E. coli*. High sequence homology with GAPDH of *E. coli* and *K.pneumoniae* is not surprising since *gapA* genes of all three species are derived from a common ancestral gene (Nelson et al., 1991).

Encapsulation of (His)<sub>6</sub>GAPDH in PLGA microspheres was done through a solvent evaporation protocol, a commonly used microencapsulation technique (Tamber et al., 2005). This method leads to the preparation of reproducible, non porous and uniform microspheres (Singh and O'Hagan, 1998). Possible protein damage during microencapsulation by double emulsion method have been extensively reviewed elsewhere (Tamber et al., 2005). Coincorporation of GAPDH with BSA was necessary in our assays. BSA acts as an interfacial excipient because it is transferred more rapidly to the instable w/o interface, and hence decreases (His)<sub>6</sub>GAPDH adsorption and aggregation (Tamber et al., 2005). Encapsulation of GAPDH without excipient was unsuccessful while co encapsulation with gelatin A as an excipient (Chang et Gupta, 1996) did not allow BSA protective effects on (His)<sub>6</sub>GAPDH incorporation.

We studied proteins encapsulation by dissolution of microspheres in methylene chloride. However, this assay does not provide an exact measure of antigen release *in vivo*. In our case, its usage was limited to evaluate protein encapsulation. After extraction from microspheres, (His)<sub>6</sub>GAPDH has lost enzymatic activity. We also observed by Western blot that hyperimmune rabbit serum still recognised the protein (unpublished results). Since SDS-PAGE was carried out under denaturant conditions, this suggests that some GAPDH epitopes are not conformation-dependant.



We have identified GAPDH as an enzymatically active extracytosolic protein in a *S. Typhimurium* strain. This protein is immunogenic in pigs and its immunoprotective potential should be evaluated by mean of vaccinal trials in pigs.

## **Acknowledgements**

We are grateful to Louise Lessard for helpful discussions, advices and technical assistance. This project was financially supported by Valorisation Recherche Québec and by the Fédération des producteurs de porcs du Québec.

## References

Altekruse SF, Cohen ML, Swerdlow DL. Emerging foodborne diseases. *Emerg Infect Dis* 1997; 3:285-93.

Argiro L, Henri S, Dessein H, Kouriba B, Dessein AJ, Bourgois A. Induction of a protection against *S. mansoni* with a MAP containing epitopes of Sm37-GAPDH and Sm10-DLC. Effect of coadsorption with GM-CSF on alum. *Vaccine* 2000; 18:2033-8.

Barrow, P.A. & Wallis, T.S. (2000). Vaccination of food animals. In C. Wray & A. Wray (Eds.), *Salmonella* in Domestic Animals (pp. 323-339). Wallingford: CABI Publishing.

Barrow PA, Page K, Lovell MA. The virulence for gnotobiotic pigs of live attenuated vaccine strains of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis. *Vaccine* 2001; 19 :3432-6.

Brassard J, Gottschalk M, Quessy S. Cloning and purification of the *Streptococcus suis* serotype 2 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its involvement as an adhesin. *Vet Microbiol* 2004; 102: 87-94.

Bryan, F.L. Risks associated with vehicles of foodborne pathogens and toxins. *J Food Prot* 1988; 51:498-508.

Chang AC, Gupta RK. Stabilization of tetanus toxoid in poly(DL-lactic-co-glycolic acid) microspheres for the controlled release of antigen. *J Pharm Sci* 1996; 85:123-132.

Clarke RC, Gyles CL. *Salmonella*. In: Gyles CL and Thoen CO, eds. Pathogenesis of bacterial infections in animals, 2nd edition. Ames: Iowa State University Press, 1993: 133-153.

Corriveau J, Lessard L, Quessy S. Étude de l'adhésion et de l'invasion de lignées cellulaires intestinales par des souches de *Salmonella* Typhimurium isolées de porcs affectés de salmonellose. Colloque International Francophone de Bactériologie Vétérinaire 2002, 37-38.

Eldridge JH, Staas JK, Meulbroek JA, Tice TR, Gilley RM. Biodegradable and biocompatible poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres as an adjuvant for staphylococcal enterotoxin B toxoid which enhances the level of toxin-neutralizing antibodies. *Infect Immun* 1991; 59: 2978-2986.

Eldridge JH, Hammond CJ, Meulbroek JA, Staas JK, Gilley RM, Tice TR. Controlled vaccine release in the gut-associated lymphoid tissues. I. Orally administered biodegradable microspheres target the Peyer's patches. *J Controlled Release* 1991; 11:205-214.

Ferdinand W. The isolation and specific activity of rabbit-muscle glyceraldehyde phosphate dehydrogenase. *Biochem J* 1964; 92:578-585.

Gil-Navarro I, Gil ML, Casanova M, O'Connor JE, Martinez JP, Gozalbo D. The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is a surface antigen. *J Bacteriol* 1997; 179:4992-9.

Gozalbo D, Gil-Navarro I, Azorin I, Renau-Piqueras J, Martinez JP, Gil ML. The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein. *Infect Immun* 1998; 66:2052-2059.

Health Canada. Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (PICRA/CIPARS). Ottawa, 2004. Available at [www.hc-sc.gc.ca/pphb-dgsp/cipars-picra/index.html](http://www.hc-sc.gc.ca/pphb-dgsp/cipars-picra/index.html)

Jobin MC, Brassard J, Quessy S, Gottschalk M, Grenier D. Acquisition of host plasmin activity by the Swine pathogen *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* 2004; 72 : 606-10.

Kawai K, Liu Y, Ohnishi K, Oshima S. A conserved 37 kDa outer membrane protein of *Edwardsiella tarda* is an effective vaccine candidate. *Vaccine* 2004; 22: 3411-3418.

Kenny B, Finlay BB. Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:7991-5.

Kraehenbuhl JP, Neutra MR. Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol Rev* 1992; 72:853-79.

Lamm ME. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu Rev Microbiol* 1997; 51: 311-340.

Liu W, Yang Y, Chung N, Kwang J. Induction of humoral immune response and protective immunity in chickens against *Salmonella enteritidis* after a single dose of killed bacterium-loaded microsphere. *Av Dis* 2001; 45:797-806.

Liu Y, Oshima S, Kurohara K, Ohnishi K, Kawai K. Vaccine Efficacy of recombinant GAPDH of *Edwardsiella tarda* against Edwardsiellosis. *Microbiol Immunol* 2005; 49: 605-612.

Muir Wm, Husband AJ, Gipps EM, Bradley MP. Induction of specific IgA responses in rats after oral vaccination with biodegradable microspheres containing a recombinant protein. *Immunol Lett* 1994; 42:203-207.

Michetti P, Mahan MJ, Slauch JM, Mekalanos JJ, Neutra MR. Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 1992; 60:1786-92.

Nelson K, Whittam TS, Selander RK. Nucleotide polymorphism and evolution in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (*gapA*) in natural populations of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6667-6671.

Pancholi V, Fischetti VA. A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J Exp Med* 1992; 176:415-426.

Pang T, Bhutta ZA, Finlay BB, Altwegg M. Typhoid fever and other salmonellosis: a continuing challenge. *Trends Microbiol* 1995; 3:253-255.

Quessy S, Bélanger D, Letellier A. Épidémiologie et contrôle des infections à *Salmonella* chez le porc. *Méd Vet Québec* 2001; 31: 30-31.

Rosinha GM, Myioshi A, Azevedo V, Splitter GA, Oliveira SC. Molecular and immunological characterisation of recombinant *Brucella abortus* glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase, a T- and B-cell reactive protein that induces partial protection when co-administered with an interleukin-12-expressing plasmid in a DNA vaccine formulation. *J Med Microbiol* 2002; 51 : 661-71.

Singh M, O'Hagan D. The preparation and characterization of polymeric antigen delivery systems for oral administration. *Adv Drug Deliv Rev* 1998; 34:285-304.

Singh SP, Williams YU, Benjamin WH, Klebba PE, Boyd D. Immunoprotection by monoclonal antibodies to the porins and lipopolysaccharide of *Salmonella typhimurium*. *Microb Pathog* 1996; 21:249-63.

Singh M, Li XM, Wang H, McGee JP, Zamb T, Koff W, Wang CY, O'Hagan DT. Immunogenicity and protection in small-animal models with controlled-release tetanus toxoid microparticles as a single-dose vaccine. *Infect Immun* 1997; 65:1716-1721.

Singh M, O'Hagan D. Advances in vaccine adjuvants. *Nat Biotechnol* 1999; 17:1075-81.

Tamber H, Johansen P, Merkle HP, Gander B. 2005. Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 57:357-76.

Torche AM, Jouan H, Le Corre P, Albina E, Primault R, Jestin A, Le Verge R. Ex vivo and in situ PLGA microspheres uptake by pig ileal Peyer's patch segment. *Int J Pharm* 2000; 201:15-27.

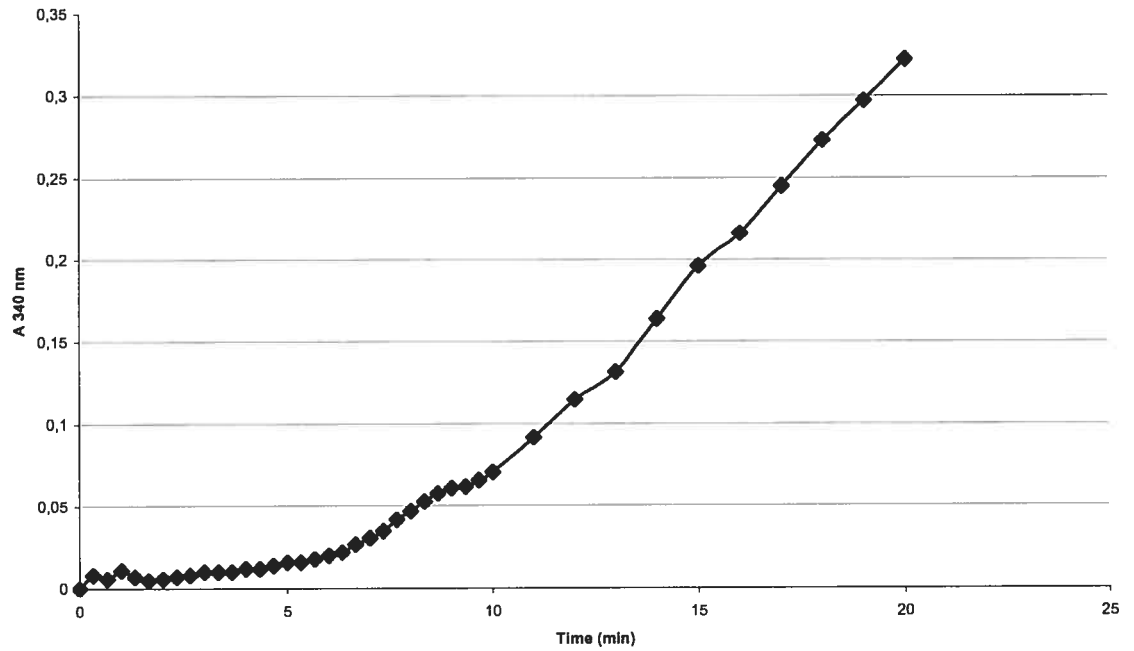
van Egmond M, Damen CA, van Sriel AB, Vidarsson G, van Garderen E, van de Winkel JG. IgA and the IgA Fc receptor. *Trends Immunol* 2001; 22:205-11.

Villamon E, Villalba V, Nogueras MM, Tomas JM, Gozalbo D, Gil ML. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, a glycolytic enzyme present in the periplasm of *Aeromonas hydrophila*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2003; 84:31-8.

Walker JE, Wonacott AJ, Harris JI. Heat stability of a tetrameric enzyme, D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Eur J Biochem* 1980; 108: 581-586.

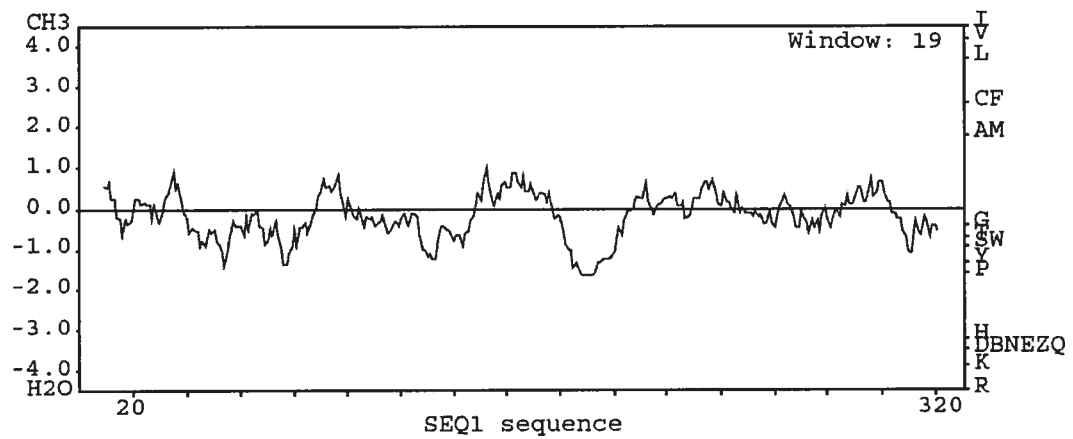
Wood RL, Rose R. Populations of *Salmonella typhimurium* in internal organs of experimentally infected carrier swine. Am J Vet Res 1992; 53:653-658.

**Figure 1.** GAPDH activity measured on whole *Salmonella* Typhimurium B1 in mid-logarithmic growth phase. Enzymatic activity was reported by observation of NAD reduction at OD<sub>340</sub>. Time is on the x-axis and OD<sub>340</sub> is on the y axis.

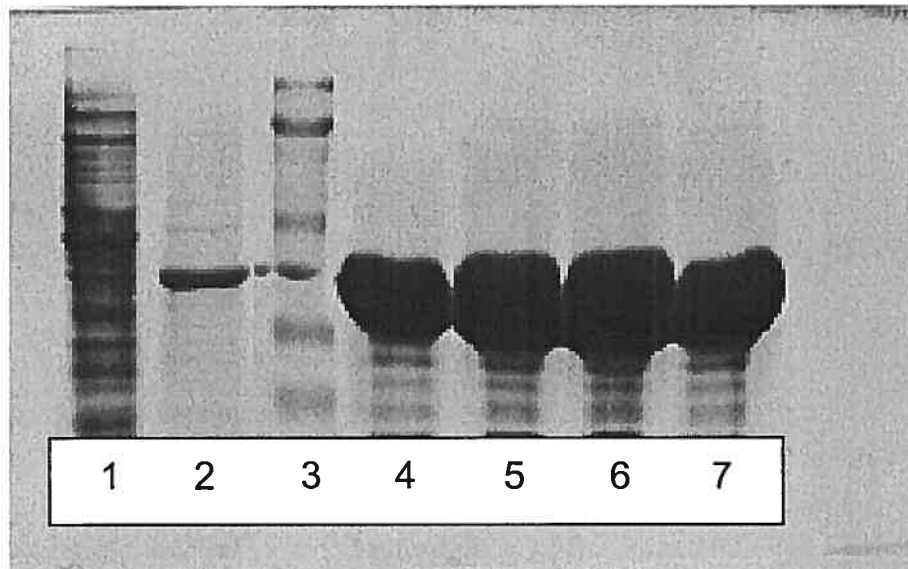




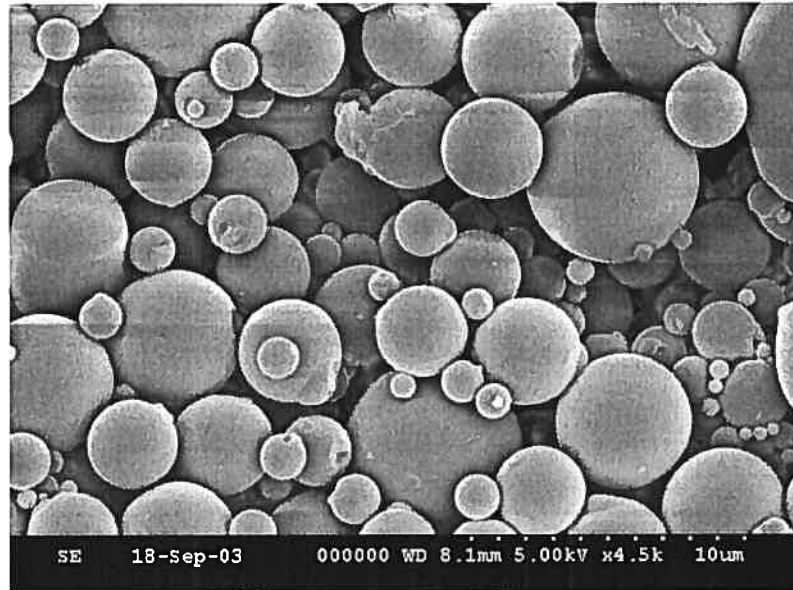
**Figure 2.** Hydrophobicity profile for *gapA* encoded GAPDH in *Salmonella* Typhimurium B1. Analysis was made according to Kyte and Doolittle (1982). The hydrophobicity value of each amino acid is plotted against its relative position in the polypeptide chain, starting from N-terminal. Large positive numbers indicate the most hydrophobic regions and negative numbers the least hydrophobic regions.



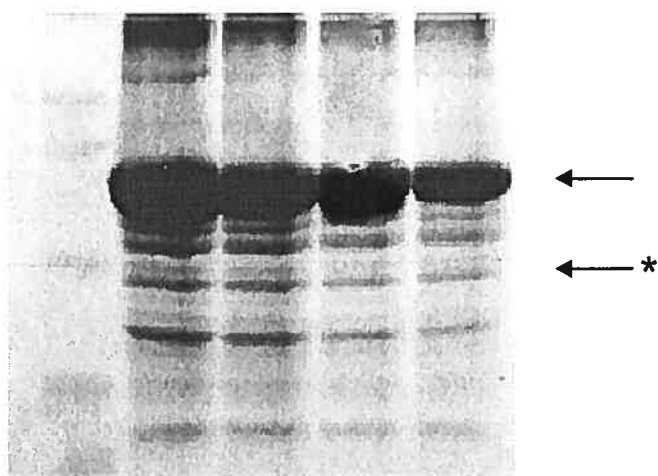
**Figure 3.** Purification of (His)<sub>6</sub>GAPDH from pQE-30::*gapA* transformed M15[pREP4] cells under native conditions using Ni-NTA agarose. Proteins of the 10% polyacrylamide SDS-PAGE are stained with Coomassie brilliant blue. Lane 1: flow-through. Lane 2: Pooled 20mM imidazole wash. Lane 3: Low molecular weight standard (Bio-Rad). Lane 4,5,6 and 7: Four subsequent elutions in 750  $\mu$ l 250 mM imidazole after metal affinity chromatography.



**Figure 4.** Scanning electron micrograph of 65:35 PLGA microspheres generated by double emulsion solvent evaporation method.



**Figure 5.** SDS PAGE results of extracted GAPDH and BSA by dichloromethane dissolution of the PLGA microspheres. Lane 1, molecular weigh marker; Lane 2, first dissolution profile; Lane 3, second dissolution profile; Lane 4, third dissolution profile; Lane 5, fourth dissolution profile. Arrow identifies 66 kDa BSA and arrow with asterisk denotes the presence of 35 kDa GAPDH.



**Chapitre 4.**  
**DISCUSSION GÉNÉRALE**

L'issue la plus fréquente d'une contamination par *Salmonella* chez le porc est l'infection asymptomatique. L'excrétion fécale de *Salmonella* et sa présence au niveau des organes internes du porteur silencieux facilitent la transmission de la bactérie aux animaux sains, de la ferme jusqu'à l'abattoir. La capacité d'adaptation de *Salmonella* à différents stress environnementaux optimise sa survie dans le milieu et son ubiquité parmi les vecteurs de contamination augmente les chances de transmission. L'infection de l'homme par *Salmonella* est problématique puisqu'elle provoque habituellement des signes cliniques, quel que soit le sérotype. Puisque les vaccins actuellement disponibles sur le marché sont d'efficacité mitigée, les moyens de contrôle et de prévention utilisés au niveau des élevages industriels privilégient l'administration d'agents antimicrobiens. L'augmentation de l'antibiorésistance chez plusieurs souches de *Salmonella* et la résistance à des antibiotiques d'importance élevée en médecine humaine constituent une menace pour la santé publique. Une nouvelle stratégie de vaccination contre les infections à *Salmonella* devrait favoriser l'administration mucosale afin d'éliciter une réponse immunitaire pertinente. L'encapsulation d'un antigène de *Salmonella* dans un véhicule polymérique le protégerait des effecteurs du système immunitaire innée et permettrait le ciblage des centres immunitaires intestinaux afin d'induire une réponse humorale efficace contre les infections cliniques et sous-cliniques chez le porc. L'objectif du présent projet est de déterminer les paramètres relatifs à la mise au point d'un tel vaccin.

#### **4.1 Choix de l'antigène vaccinal**

L'étude des sérum prélevés chez des porcs avec signes cliniques, septicémiques ou convalescents a révélé l'immunogénicité de la GAPDH de *S. Typhimurium* (Corriveau et coll., 2002). La séroconversion à cette protéine chez les porcs avec ou sans symptômes dans des élevages contaminés en fait une candidate de choix afin de contrer les infections cliniques et asymptomatiques. Cependant, l'immunogénicité d'une protéine n'implique pas nécessairement le potentiel immunoprotecteur. Bien que l'exposition à *Salmonella* induise une réponse humorale importante face à un grand nombre d'antigènes comme les LPS et les porines, leur administration chez l'animal ne confère pas de protection significative contre l'infection (Mastroeni et coll., 2000). L'évaluation du potentiel protecteur de la GAPDH sera possible par son administration par voie nasale ou orale afin d'éliciter le système immunitaire mucosal.

## 4.2 Évaluation de la présence de GAPDH extracytosolique

La localisation à la surface bactérienne est très souvent nécessaire à l'induction d'une protection efficace. C'est pourquoi nous avons voulu déterminer si la GAPDH était présente à l'extérieur du protoplasme.

De nombreuses méthodes mises au point pour évaluer la présence de GAPDH en surface de cellules sont relatées dans la littérature : étude des fractions cellulaires par immunobuvardage (Bergmann et coll., 2004 ; Seifert et coll., 2003) ou SDS-PAGE (Pancholi et Fischetti, 1992 ; Modun et Williams, 1999 ; Kawai et coll., 2004), radioimmunoprécipitation (Alvarez et al., 2003), immunofluorescence indirecte sur cellules entières (Gil-Navarro et coll., 1997) et évaluation de l'activité enzymatique sur les fractions cellulaires ou sur des bactéries entières (Villamón et coll., 2003). La présence de GAPDH extracytosolique chez *S. Typhimurium* B1 en milieu de phase exponentielle a été évaluée et confirmée par le test d'activité enzymatique de surface puisque celui-ci est rapide et ne nécessite aucun équipement ou réactifs dispendieux. L'activité enzymatique observée est imputable à une GAPDH associée à la surface puisque aucune activité enzymatique n'est observée dans le surnageant de culture. Des résultats préliminaires indiquent que la GAPDH de *S. Typhimurium* B1 est située dans le périplasma (résultats non publiés) et sont en accord avec les observations de Villamón et coll. (2003) qui rapportent que l'expression de la GAPDH de *A. hydrophila* est exclusive au cytoplasme et au périplasma. Ces résultats doivent cependant être interprétés avec prudence puisque certaines protéines périplasmiques associées à la membrane externe sont libérées lors des méthodes d'extraction des protéines solubles du périplasma. Des études d'immunomicroscopie électronique pourraient confirmer la position exacte de la GAPDH chez *S. Typhimurium*. Plusieurs aspects méritent d'être investigués afin de mieux caractériser la GAPDH de surface : sa présence à la surface d'autres souches de *Salmonella* et la variation ou la constance de son expression selon la phase de croissance et selon les facteurs environnementaux. Par exemple, la sécrétion de GAPDH par *Streptococcus gordonii* dépend du pH de l'environnement (Nelson et coll., 2001).

## 4.3 Homologies de séquence

Le gène *gapA* a été amplifié par réaction en chaîne par polymérase (PCR) tel que décrit par Brassard et coll. (2004). Les amorces utilisées ont été créées à partir de la

séquence *gapA* de *S. Typhimurium* LT2 disponible sur GenBank (McClelland et coll., 2001). La *Taq* polymérase possède la particularité d'ajouter un résidu de déoxyadénine aux extrémités 3' des fragments amplifiés. Le vecteur pCR2.1 linéarisé contient aussi un résidu de déoxythymine en 3'. La complémentarité des deux bases azotées permet une ligation plus efficace de l'insert dans le vecteur. Cependant, la *Taq* polymérase n'a pas d'activité exonucléase. L'utilisation d'une polymérase avec activité de relecture serait plus appropriée dans le cas de réaction PCR générant un fragment destiné à être cloné. Cependant, comme la séquence *gapA* de *S. Typhimurium* LT2 était disponible et que ce gène est bien conservé (Nelson et coll., 1991), l'alignement des deux séquences nous a permis d'établir que le gène *gapA* de *S. Typhimurium* B1 était identique au gène de *S. Typhimurium* LT2.

Chez la souche *S. Typhimurium* B1, le gène codant *gapA* de 996 bp et la séquence traduite de 332 acides aminés démontrent une forte homologie avec les gènes *gapA* et la protéine GAPDH de *E. coli* et *Klebsiella pneumoniae*. Bien que le gène codant des trois espèces soit dérivé du même gène ancestral, la diversité allélique au niveau du locus *gapA* est plus importante chez *Salmonella* que chez *E. coli* (Nelson et coll., 1991). Néanmoins, la GAPDH est une protéine bien conservée chez les procaryotes et les eucaryotes. Peu de remplacements en acides aminés sont effectués au niveau de cette protéine de ménage essentielle à la voie glycolytique (Nelson et coll., 1991).

#### 4.4 Purification de la (His)<sub>6</sub>GAPDH

La purification à grande échelle de la GAPDH a été rendue possible par le clonage du gène codant dans le vecteur d'expression pQE-30. Le gène *gapA* de *S. Typhimurium* B1 a été amplifié et cloné dans le vecteur pCR2.1. Le gène a ensuite été excisé du vecteur par digestion enzymatique et inséré dans le vecteur pQE-30 par une réaction de ligation standard. Le clonage préalable du gène codant dans le vecteur pCR2.1 permet la stabilisation de l'amplicon afin d'optimiser la digestion enzymatique et la ligation subséquente dans le vecteur d'expression. Le vecteur pQE-30 est linéarisé par les mêmes enzymes de restriction, ce qui augmente les probabilités d'insertion unidirectionnelle du fragment dans le vecteur. L'insertion de *gapA* a été confirmée par digestion enzymatique et par PCR. Les cellules compétentes M15[pREP4] ont été transformées et la surexpression de la protéine recombinante par IPTG a été évaluée par SDS-PAGE et par immunobuvardage de type Western en utilisant le conjugué Ni-NTA couplé à la peroxydase de raifort. La solubilité de la (His)<sub>6</sub>GAPDH permet sa purification



en conditions natives et celle-ci s'appuie sur l'affinité de la signature d'histidine au Ni-NTA. Le sonicat des cellules transformées est incubé avec une matrice d'agarose Ni-NTA. La protéine recombinante est éluée par l'ajout de 250 mM d'imidazole qui compétitionne pour les sites d'attachement sur la molécule de Ni-NTA. La présence de contaminants et la pureté de la protéine sont confirmés ou infirmés par migration des fractions sur gel SDS-PAGE. Par la suite, la protéine est désalée dans l'eau ou dans une solution Tris 20 mM (pH 7,2) et lyophilisée pour les essais ultérieurs d'encapsulation. L'activité enzymatique de la (His)<sub>6</sub>GAPDH a été évaluée et les processus de purification et de désalage ne semblent pas nuire à l'activité enzymatique. Il a été rapporté que la séquence hexa-histidine n'affecte pas l'activité enzymatique de la GAPDH chez *Streptococcus equisimilis* (Gase et coll., 1996).

#### **4.5 Mise au point d'un véhicule de livraison membranaire**

La mise au point d'un vaccin vétérinaire visant la prévention d'infections intestinales devrait miser sur une préparation monodose administrable par voie nasale ou orale, par le biais de l'eau ou des moulées, afin d'éliciter une réponse immunitaire mucoale efficace et limiter les contraintes logistiques. Comme il a été mentionné précédemment, l'encapsulation d'antigènes dans des microsphères polymériques facilite leur absorption aux cellules M des plaques de Peyer lorsque administrées oralement (Liu et coll., 2001).

Le PLGA est un ester polymérique d'acides lactiques  $\alpha$ -hydroxy et d'acides glycoliques. Son hydrolyse en solution aqueuse génère des produits monomériques de dégradation acides qui sont métabolisés par le cycle de l'acide citrique (Waeckerle-Men et Groettrup, 2005). Son potentiel en vaccinologie est réflété par le nombre grandissant d'études publiées à ce sujet. Sa disponibilité en formes amorphes et cristallines, en différents ratios monomériques, poids moléculaires et groupes terminaux multiplie les possibilités de formulations et les vitesses de dégradation et de relargage. La libération pulsatile ajustable de matériel encapsulé permet d'imiter les injections de sensibilisation et d'exaltation des mécanismes d'immunisation conventionnels. De plus, la structure chimique du PLGA permet le couplage covalent de molécules pour cibler le véhicule de livraison vers des tissus donnés. Cependant, la comparaison des nombreuses études à son sujet est compliquée par le manque de consistance dans la nomenclature et dans la description des paramètres relatifs à la formulation des microsphères.

L'encapsulation protéique dans les microsphères de PLGA a été effectuée par un protocole d'évaporation de solvant. Cette méthode est la plus documentée de la littérature et ne nécessite pas d'équipement sophistiqué (Tamber et coll., 2005). La méthode de séchage par dispersion requiert des conditions particulières et les microsphères produites sont de taille trop importante et sont donc plus appropriées pour l'administration parentérale (Johnson et coll., 1996). La mise au point du protocole d'évaporation de solvant est basée sur une méthode publiée (Rosas et coll., 2001) avec modifications et l'objectif principal de la formulation était l'obtention de microsphères de PLGA 1 à 10  $\mu\text{m}$  afin de mieux cibler les cellules M (Eldridge et coll., 1991).

L'hydrophobicité des microsphères de PLGA est déterminée principalement par le ratio lactide:glycolide du PLGA qui les composent et influe sur l'adhésion aux cellules phagocytaires, la vitesse de dégradation et l'encapsulation. Le PLGA utilisé était d'un ratio lactide:glycolide 65 :35 et d'un poids moléculaire de 40000 – 75000 Da. Ce ratio a été sélectionné parce qu'il constitue un compromis entre l'efficacité d'encapsulation et l'hydrophobicité, éléments importants à considérer dans la formulation et dans les essais *in vivo*. L'hydrophobicité est déterminée par la quantité relative en acide lactique et est attribuable au groupement méthyle qu'elle contient. Par stérance hindrique, le groupe  $-\text{CH}_3$  rend le lien ester moins accessible pour les molécules d'eau et complique la scission hydrolytique (Magre et Sam, 1997). Pour cette raison, l'acide lactique a une vitesse de dégradation beaucoup moins rapide que l'acide glycolique. Les polymères ayant un haut ratio d'acide lactique se dégradent donc plus lentement. L'hydrophobicité favorise la capture des microsphères par les cellules phagocytaires (Tabata et Ikada, 1988) et les cellules M (Torché et coll., 2000). Ces interactions sont d'importance cruciale dans l'utilisation des microsphères de PLGA en vaccinologie. L'hydrophobicité est un facteur majeur dans l'efficacité d'encapsulation. L'efficacité d'encapsulation est généralement plus grande avec les polymères hydrophiles (Walter et coll., 2001). Il a d'ailleurs été démontré que l'augmentation du ratio glycolide de PLGA augmente l'efficacité d'encapsulation (Johansen et coll., 1999). Ce phénomène pourrait être attribué aux liens hydrogènes et aux interactions polaires. La diminution de l'hydrophilicité du polymère cause une réduction des liaisons hydrogènes et des interactions polaires. En effet, les protéines exposent habituellement leurs domaines hydrophiles dans l'environnement aqueux, alors que les domaines hydrophobes s'aggrègent en un noyau. Les domaines hydrophiles peuvent alors interagir avec le polymère. Le groupement méthyle du lactate empêche les interactions entre la protéine et l'oxygène carbonyle du monomère lactide (Johansen et coll., 1999). Quant au poids moléculaire, il influence aussi

la vitesse de dégradation du polymère. Plus le poids moléculaire est élevé, moins la concentration en groupes carboxyles terminaux autocatalyseurs sera élevée. La dégradation sera donc moins rapide et la formation d'acides lactiques et glycoliques sera également amoindrie.

Les paramètres régissant la taille des microsphères sont nombreux mais parmi les plus importants, on note la concentration polymérique, les vitesses et durées d'émulsion et la concentration en surfactant (Singh et O'Hagan, 1998). La taille des microsphères a été définie principalement par la vitesse d'homogénéisation et par la puissance de la sonication. L'augmentation de la vitesse d'émulsion diminue la taille des microsphères à cause de la force de cisaillement (McGinity et O'Donnell, 1997). La concentration de la solution polymérique est proportionnelle à sa viscosité et peut diminuer l'efficacité des procédés d'émulsions. Cela peut expliquer une baisse d'efficacité du processus d'encapsulation (Baras et coll., 2000b).

Le protocole établi utilise le PVA à titre de surfactant dans la phase aqueuse externe. Le PVA est nécessaire à la stabilisation de la seconde émulsion puisqu'il est adsorbé à l'interface w/o et agit à titre de barrière stérique contre le solvant organique externe (Baras et coll., 2000a). Après la préparation des microsphères, le PVA est lié à la structure des microsphères et ne peut être éliminé (Scholes et coll., 1999). Cependant, l'absorption de ce polymère par le tractus gastrointestinal est faible. De plus, le PVA ne s'accumule pas dans le corps et n'est pas mutagène (DeMerlis et Schoneker, 2003). La grosseur des microsphères, leur intégrité et leur porosité ont été vérifiées par microscopie électronique à balayage. Les microsphères obtenues par ce protocole sont de forme sphérique de diamètre variant de 1 à 10  $\mu\text{m}$  et la surface n'est pas poreuse. La porosité et le craquage possible des microsphères sont expliqués par la dissipation trop rapide du solvant organique. Les méthodes d'extraction de solvant, où le DCM est extrait par l'ajout d'une phase aqueuse en excès, sont particulièrement enclines à la formation de microsphères craquées ou poreuses (Singh et O'Hagan, 1998). Le protocole que nous avons établi élimine le solvant organique par évaporation à pression et air ambiant, un processus qui est relativement long mais qui permet d'obtenir une surface intègre.

Les PLGA de différents ratios démontrent une bonne solubilité dans le DCM. La faible solubilité de ce solvant organique dans l'eau justifie son emploi dans les protocoles d'émulsion double puisqu'une émulsion est habituellement constituée de deux liquides immiscibles. Sa volatilité dans l'air ambiant facilite son extraction et la solidification des

microsphères (Sah, 2000). Sa carcinogénicité complique son usage routinier étant donné les réglementations strictes et les coûts importants quant à l'élimination des déchets. L'utilisation d'acétate d'éthyle semble prometteuse dans l'encapsulation protéique par émulsion double, même si ce produit est miscible dans l'eau. L'acétate d'éthyle a une dose létale de 5,62g/kg chez les rats contre 1,6g/kg pour le DCM (Cleland et coll., 1994). Pour des raisons environnementales et de sécurité quant à l'administration aux animaux, le remplacement du DCM par l'acétate d'éthyle se doit d'être fortement encouragé dans les protocoles d'émulsion double.

L'addition de sel dans la phase aqueuse interne a un effet immédiat sur la structure interne et externe des microsphères. Les microsphères sont poreuses, spongieuses et leur taille est irrégulière (Pistel et Kissel, 2000). Des essais de microencapsulation en tampon phosphate saline contenant 160 mM de NaCl ont généré des microsphères ponctuées de pores. C'est pour cette raison que la phase aqueuse interne était exempte de sels et que la solubilisation de la BSA et de la GAPDH s'effectuaient dans l'eau déionisée (résultats non publiés). Cependant, la plupart des protéines requièrent des tampons leur procurant une force ionique. La désalinisation de la solution protéique déstabilise la protéine et augmente son absorption au polymère et aux parois de la verrerie utilisée. La GAPDH était lyophilisée à partir d'une solution d'eau déionisée. Après le séchage à froid, la dissolution de la protéine dans l'eau était très difficile. Ce phénomène est peut être dû au manque de force ionique dans la solution de congélation. La GAPDH pourrait avoir subi un changement de conformation qui la prédispose à l'agrégation. Afin de prévenir la présence d'agrégats solides dans la phase aqueuse, cette dernière était filtrée.

Une importante concentration en sels dans la phase aqueuse externe peut contrer la formation exagérée de pores (Pistel et Kissel, 2000). La porosité des microparticules peut conduire à une libération antigénique en salve (Singh et O'Hagan, 1998). La libération trop rapide de la protéine encapsulée s'effectue par l'entremise des pores (McGinity et O'Donnell, 1997). La porosité des microsphères joue un rôle non négligeable quant au contrôle de l'acidité intraparticulaire. Dans les structures poreuses, les monomères générés durant la scission hydrolytique peuvent diffuser plus facilement dans le milieu et amenuiser l'acidification à l'intérieur de la microsphère. Les structures polymériques plus denses retiennent leurs produits de dégradation, donnant lieu à des microenvironnements acides (Fu et coll., 2000).

Des essais d'encapsulation protéique effectués avec la GAPDH en solution et lyophilisée n'ont pas permis l'incorporation de la protéine dans les microsphères de PLGA. Comme il a été mentionné précédemment, le processus d'émulsion double comporte plusieurs stress pour la protéine d'intérêt (Jiang et coll., 2005 ; Fu et coll., 2000). Parmi ceux-ci, on note la génération d'une interface entre la phase aqueuse et organique durant la première émulsification, soit la sonication. Cette interface est nuisible à la stabilité de la protéine puisqu'elle induit des changements conformationnels qui favorisent l'agrégation protéique et qui diminuent le contenu monomérique. Bien que le mode d'agrégation protéique ne soit pas connu à l'interface w/o, ce processus est irréversible (Sah, 1999). Il est connu que l'adsorption compétitive d'une protéine peut stabiliser une protéine d'intérêt en minimisant son agrégation à l'interface w/o (Sah, 1999). Les albumines sériques ont une activité interfaciale intéressante quant à la stabilisation de protéines lors de l'encapsulation par émulsion double (Tamber et coll., 2005).

La coencapsulation de BSA avec la GAPDH a contribué à l'incorporation de la GAPDH dans les microsphères. La BSA compétitionne avec la GAPDH pour l'interface w/o. La rapidité de transfert de la BSA restreint l'adsorption de la GAPDH et son agrégation à l'interface. L'administration d'un tel vaccin élicitera probablement une réponse immunitaire contre la GAPDH mais aussi contre la BSA, ce qui n'est pas nécessaire pour l'animal. Il serait intéressant d'évaluer l'effet protecteur de l'albumine sérique porcine. Ce choix profiterait de l'avortement clonal des cellules T réagissant aux antigènes du soi. Advenant que son incorporation à la phase aqueuse permette l'incorporation de la GAPDH, l'albumine de porc pourrait remplacer la BSA.

L'évaporation de solvant permet la solidification des microsphères. Selon les différentes méthodes publiées, une évaporation de 5 heures sous la hotte chimique est suffisante pour évaporer 5 mL de DCM (Rosas et coll., 2001 ; Nam et Park, 1999). Les microsphères sont récupérées par centrifugation puis lyophilisées. La lyophilisation est avantageuse en ce sens qu'elle peut s'effectuer dans des vials stériles. De plus, le séchage à froid contribue à éliminer le DCM résiduel, le cas échéant.

La confirmation de l'encapsulation s'effectue habituellement par la dissolution des microsphères. La méthode utilisée dépend du type de polymère constituant la matrice. Nous avons récupéré les protéines encapsulées par la dissolution des microsphères dans le DCM pour ensuite extraire la GAPDH et la BSA en phase aqueuse. Bien que cette méthode soit rapide et ne nécessite pas de réactif dispendieux, il a été observé qu'elle ne

permet pas l'obtention de résultats reproductibles lors de la comparaison de l'encapsulation protéique dans des microsphères contenant différents polymères et stabilisants (Gupta et coll., 1997). Cette méthode n'est pas optimale pour la récupération totale des protéines encapsulées puisqu'un maximum de 62% de protéines peuvent être récupérées lorsque 1 mg de protéine était encapsulé. Lors de la dissolution, la majorité des protéines se retrouvent à l'interface d'eau et de DCM (Lu et Park, 1995). Cette technique permet cependant une évaluation sommaire de l'encapsulation. Gupta et coll. (1997) suggèrent la dissolution des microsphères par hydrolyse acide ou basique, suivie d'une quantification protéique par la ninhydrine. Les paramètres de cette réaction varient en fonction de la formulation des microsphères.

La stérilisation du vaccin est une considération importante souvent omise dans les phases initiales de formulations à base de PLGA. La fabrication dans un milieu aseptisé et la stérilisation finale du produit sont deux façons d'obtenir un vaccin stérile (Lewis, 1990). Les procédés conventionnels de stérilisation vapeur ou par air chaud ne sont pas indiqués pour les polyesters aliphatiques biodégradables puisque leur structure chimique et physique est lourdement affectée par la chaleur ou l'humidité (Athanasίου et coll., 1996). L'irradiation gamma se révèle une option intéressante par son pouvoir pénétrant, sa faible réactivité chimique et la faible augmentation de température durant le procédé (Martínez-Sancho et coll., 2004). Cependant, cette méthode diminue le poids moléculaire par scission aléatoire et dégraissage des chaînes polymériques, ce qui accélère la dégradation *in vivo* de la matrice (Nijsen et coll., 2002). La stérilisation par oxyde d'éthylène est souvent employée pour les polymères sensibles à l'humidité, mais cette méthode peut générer des résidus toxiques en surface, ce qui diminue sa popularité en vaccinologie (Athanasίου et coll., 1996). Les effets des différentes techniques sont influencés par les paramètres de stérilisation, le procédé de fabrication des microsphères et par le polymère qui les compose. Le développement de nouvelles méthodes de stérilisation du PLGA est souhaitable.

Jusqu'à maintenant, aucune étude ne s'est penchée sur le ciblage des microsphères de PLGA aux amygdales du porc. Les amygdales du palais mou constituent un site de colonisation important pour *Salmonella* chez les porcs (Wood et Rose, 1992). Le ciblage du véhicule de livraison aux amygdales et aux plaques de Peyer, deux organes clés du MALT, pourrait optimiser la réponse immunitaire mucoale. Des essais préliminaires par microscopie à fluorescence ont permis l'identification de la lectine UEA-1 comme marqueur spécifique des couches superficielles de l'épithélium des cryptes des

amygdales du palais mou chez le porc. L'enrobage des microsphères avec la lectine UEA-1 est possible par l'activation des groupes  $-OH$  du PLGA par l'ajout de carbodiimide/N-hydroxysuccinimide (Weissenböck et coll., 2004).

**Chapitre 5.**  
**CONCLUSION**



Le but de cette étude était d'établir les paramètres impliqués dans le développement d'un vaccin sous-unitaire ciblé contre les infections à *Salmonella* chez le porc dans un contexte où les méthodes prophylactiques ne sont pas suffisamment efficaces. Les conclusions suivantes ont été tirées de ce projet:

1. La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase est une protéine immunogène chez le porc.
2. La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase est une protéine cytosolique conservée parmi les *Enterobacteriaceae* et est exprimée au niveau de la paroi cellulaire de *S. Typhimurium*.
3. La purification à grande échelle de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase est possible par le clonage de sa séquence codante dans un vecteur d'expression.
4. L'encapsulation de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase dans des microsphères d'acide poly (DL-lactique-co-glycolique) par un protocole d'émulsion double est conditionnelle à la coencapsulation de l'albumine sérique bovine.

Des études complémentaires quant à la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase extracytosolique sont nécessaires afin de mieux comprendre son mécanisme de ciblage en surface et son implication dans la pathogénèse. La caractérisation des microsphères d'acide poly (DL-lactique-co-glycolique) générées devra inclure l'évaluation de leurs vitesses de dégradation, de la stabilité protéique et la possibilité de substituer l'albumine sérique bovine. L'enrobage des microsphères par la lectine *Ulex europaeus*-1 permettra de justifier le ciblage du véhicule de livraison aux amygdales dans l'optique de diminuer la colonisation. L'étude *in vivo* du vaccin permettra d'établir l'induction des mécanismes immunitaires humoraux et cellulaires. Le véhicule de livraison développé permettra d'évaluer le potentiel protecteur de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase mais aussi de diverses protéines immunogènes impliquées dans d'autres maladies entériques.

## **BIBLIOGRAPHIE**

**Aderem, A., Underhill, D.M.** 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17:593-623.

**Aguado, M.T., Lambert, P.H.** 1992. Controlled release vaccines-biodegradable polylactide/polyglycolide (PL/PG) microspheres as antigen vehicles. *Immunobiology* 184 :113-125.

**Akiyama, Y., Nagahara, N., Kashihara, T., Hirai, S., Oguchi, H.** 1995. In vitro and in vivo evaluation of mucoadhesive microspheres prepared for the gastrointestinal tract using polyglycerol esters of fatty acids and a poly(acrylic acid) derivative. *Pharm Res* 12 :397-405.

**Allaoui-Attarki, K., Pecquet, S., Fattal, E., Trolle, S., Chachaty, E., Couvreur, P., Andremont, A.** 1997. Protective immunity against *Salmonella typhimurium* elicited in mice by oral vaccination with phosphorylcholine encapsulated in poly (DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *Infect Immun* 65:853-857.

**Alonso, M.J., Gupta, R.K., Min, C., Siber, G.R., Langer, R.** 1994. Biodegradable microspheres as controlled-release tetanus toxoid delivery systems. *Vaccine* 12: 299-306.

**Alpuche-Aranda, C.M., Racoosin, E.L., Swanson, J.A., Miller, S.I.** 1994. *Salmonella* stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J Exp Med* 179:601-608.

**Alpuche-Aranda, C.M., Berthiaume, E.P., Mock, B., Swanson, J.A., Miller, S.I.** 1995. Spacious phagosome formation within mouse macrophages correlates with *Salmonella* serotype pathogenicity and host susceptibility. *Infect Immun* 63:4456-4462.

**Altekruse, S.F., Cohen, M.L., Swerdlow, D.L.** 1997. Emerging foodborne diseases. *Emerg Infect Dis* 3:285-293.

**Althouse, C., Patterson, S., Fedorka-Cray, P., Isaacson, R.E.** 2003. Type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium bind to enterocytes and contribute to colonization of swine in vivo. *Infect Immun* 71: 6446-6452.

**Alvarez, R.A., Blaylock, M.W., Baseman, J.B.** 2003. Surface localized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Mycoplasma genitalium* binds mucin. *Mol Microbiol* 48:1417-1425.

**Apter, F.M., Michetti, P., Winner, L.S. 3rd, Mack, J.A., Mekalanos, J.J., Neutra, M.R.** 1993. Analysis of the roles of antilipopolysaccharide and anti-cholera toxin immunoglobulin A (IgA) antibodies in protection against *Vibrio cholerae* and cholera toxin by use of monoclonal IgA antibodies in vivo. *Infect Immun* 61:5279-5285.

**Arakawa, T., Kita, Y., Carpenter, J.F.** 1991. Protein-solvent interactions in pharmaceutical formulations. *Pharm Res* 8:285-291.

**Argiro, L., Henri, S., Dessein, H., Dessein, A.J., Bourgois, A.** 1999. Induction of a protective immunity against *Schistosoma mansoni* with ovalbumin-coupled Sm37-5 coadsorbed with granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) or IL-12 on alum. *Vaccine* 17: 13-18.

**Argiro, L.L., Kohlstadt, S.S., Henri, S.S., Dessein, H.H., Matabiau, VV., Paris, P.P., Bourgois, A.A., Dessein, A.J.** 2000. Identification of a candidate vaccine peptide on the 37 kDa *Schistosoma mansoni* GAPDH. *Vaccine* 18: 2039-2048.

**Athanasiou, K.A., Niederauer, G.G., Agrawal, C.M.** 1996. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* 17:93-102.

**Audran, R., Men, Y., Johansen, P., Gander, B., Corradin, G.** 1998. Enhanced immunogenicity of microencapsulated tetanus toxoid with stabilizing agents. *Pharm Res* 15:1111-1116.

**Audran, R., Peter, K., Dannull, J., Men, Y., Scandella, E., Groettrup, M., Gander, B., Corradin, G.** 2003. Encapsulation of peptides in biodegradable microspheres prolongs their MHC class-I presentation by dendritic cells and macrophages in vitro. *Vaccine* 21:1250-1255.

**Baggesen, D.L., Aarestrup, F., Mølbak, K.** 1999. The emergence of nalidixic acid resistant, multiresistant *S. Typhimurium* DT104 in Denmark. An outbreak in humans

traced back to pork. Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, August 5 to 7, 1999. Washington, DC, USA, pp. 191-193.

**Banchereau, J., Steinman, R.M.** 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252.

**Baras, B., Benoit, M.A., Gillard, J.** 2000a. Influence of various technological parameters on the preparation of spray-dried poly(epsilon-caprolactone) microparticles containing a model antigen. *J Microencapsul* 17: 485-498.

**Baras, B., Benoit, M.A., Gillard, J.** 2000b. Parameters influencing the antigen release from spray-dried poly(DL-lactide) microparticles. *Int J Pharm* 200: 133-145.

**Barrow, P.A., Wallis, T.S.** 2000. Vaccination against *Salmonella* infection in food animals: rationale, theoretical basis and practical application. In *Salmonella* in domestic animals. Wray, S. et Wray, A. eds. CABI Publishing, pp.323-339

**Barrow, P.A., Page, K., Lovell, M.A.** 2001. The virulence for gnotobiotic pigs of live attenuated vaccine strains of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis. *Vaccine* 19: 3432-3436.

**Bäumler, A.J., Tsolis, R.M., Heffron, F.** 1996. The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patches. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 :279-283.

**Bäumler, A.J., Tsolis, R.M., Heffron, F.** 1997. Fimbrial adhesins of *Salmonella typhimurium*. Role in bacterial interactions with epithelial cells. *Adv Exp Med Biol* 412: 149-158.

**Bean, N.H., Potter, M.E.** 1992. *Salmonella* serotypes from human sources, January 1991 through December 1991. *Proc US An Health Assoc*, Louisville, Ky, pp. 488-491.

**Bearson, S., Bearson, B., Foster, J.W.** 1997. Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 15: 173-180.

**Bearson, B.L., Wilson, L., Foster, J.W.** 1998. A low pH-inducible, phoPQ-dependant acid tolerance response protects *Salmonella typhimurium* against inorganic acid stress. *J Bacteriol* 180: 2409-2417.

**Belz, G.T.** 1998. Intercellular and lymphatic pathways associated with tonsils of the soft palate in young pigs. *Anat Embryol* 197: 331-340.

**Belz, G.T., Heath, T.J.** 1996. Tonsils of the soft palate of young pigs: crypt structure and lymphoepithelium. *Anat Record* 245: 102-113.

**Bergmann, S., Rohde, M., Hammerschmidt, S.** 2004. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* is a surface-displayed plasminogen-binding protein. *Infect Immun* 72: 2416-2419.

**Bezanson, G.S., Khakhria, R., Duck, D., Lior, H.** 1985. Molecular analysis confirms food source and simultaneous involvement of two distinct but related subgroups of *Salmonella typhimurium* bacteriophage type 10 in major interprovincial *Salmonella* outbreak. *Appl Environ Microbiol* 50: 1279-1284.

**Bianchi, A.T. Zwart, R.J., Jeurissen, S.H., Moonen-Leusen, H.W.** 1992. Development of the B- and T-cell compartments in porcine lymphoid organs from birth to adult life: an immunohistological approach. *Vet Immunol Immunopathol* 33:201-221.

**Boehm, M.K., Woof, J.M., Kerr, M.A., Perkins, S.J.** 1999. The Fab and Fc fragments of IgA1 exhibit a different arrangement from that in IgG: a study by X-ray and neutron solution scattering and homology modelling. *J Mol Biol* 286: 1421-1447.

**Boismenu, R., Havran, W.L.** 1998. Gamma delta T cells in host defense and epithelial cell biology. *Clin Immunol Immunopathol* 86: 121-133.

**Botteldoorn, N., Heyndrick, M., Rijpens, N., Grijspeerdt, K., Herman, L.** 2003. *Salmonella* on pig carcasses: positive pigs and cross contamination in the slaughterhouse. *J Appl Microbiol* 95: 891-903.

**Borwesock, T.L., HogenEsch, H., Park, H., Park, K.** 1994. Uptake of alginate microspheres by Peyer's patches. *Porc Int Symp Control Release Bioact Mater* 21: 839-840.

**Bowersock, T.L., HogenEsch, H., Suckow, M., Guimond, P., Martin, S., Borie, D., Torregrosa, S., Park, H., Park, K.** 1999. Oral vaccination of animals with antigens encapsulated in alginate microspheres. *Vaccine* 17: 1804-1811.

**Brandtzaeg, P.** 1984. *Immune functions of human nasal mucosa and tonsils in health and disease*. In *Immunology of the Lung and upper respiratory tract*. Bienestock, J. eds McGraw-Hill, NewYork, pp.28-95.

**Brassard, J., Gottschalk, M., Quessy, S.** 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.

**Carrio, A., Schwach, G., Coudane, J., Vert, M.** 1991. Preparation and degradation of a surfactant-free PLAGA microspheres. *J Control Rel* 37: 113-121.

**Chandrasekaran, R., Chaudhury, M.R.** 1996. Embryotoxicity and teratogenicity studies of poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres incorporated tetanus toxoid in Wistar rats. *Hum Exp Toxicol* 15: 349-351.

**Chang, R.K., Price, J.C. and Whitworth, C.W.** 1986. Dissolution characteristics of poly( $\epsilon$ -carolactone)-polylactide microspheres of chlorpromazine. *Drug Dev Ind Pharm* 12: 2355-2380.

**Chang, A.C., Gupta, R.K.** 1996. Stabilization of tetanus toxoid in poly(DL-lactic-co-glycolic acid) microspheres for the controlled release of antigen. *J Pharm Sci* 85: 123-132.

**Charkowski, A.O., Huang, H.C., Collmer, A.** 1997. Altered localization of HrpZ in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* hrp mutants suggests that different components of the type III secretion pathway control protein translocation across the inner and outer membranes of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 179: 3866-3874.

**Chaudhury, M.R., Sharma, K., Giri, D.K.** 1996. Poly(DL-lactide) glycolide polymer microsphere entrapped tetanus toxoid: safety evaluation in wistar rats. *Hum Exp Toxicol* 15: 205-207.

**Chen, H., Torchilin, V., Langer, R.** 1996. Polymerized liposomes as potential oral vaccine carriers: stability and bioavailability. *J Control Rel* 42: 263-272.

**Chen, H., Langer, R.** 1997. Magnetically-responsive polymerized liposomes as potential oral delivery vehicles. *Pharm Res* 14: 537-540.

**Chen, H., Langer, R.** 1998. Oral particulate delivery: status and future trends. *Adv Drug Deliv Rev* 34: 339-350.

**Childers, N.K., Denys, F.R., McGee, N.F., Michalek, S.M.** 1990. Ultrastructural study of liposome uptake by M cells of rat Peyer's patch: an oral vaccine system for delivery of purified antigen. *Reg Immunol* 3: 8-16.

**Clark, M.A., Jepson, M.A., Simmons, N.L., Hirst, B.H.** 1994. Preferential interaction of *Salmonella* typhimurium with mouse Peyer's patch M cells. *Res Microbiol* 145: 543-552.

**Clark, M.A., Hirst, B., Jepson, M.A.** 2000a. Lectin-mediated mucosal delivery of drugs and microparticles. *Adv Drug Deliv Rev* 43: 207-223.

**Clark, M.A., Wilson, C., Sama, A., Wilson, J.A., Hirst, B.H.** 2000b. Differential cytokeratin and glycoconjugate expression by the surface and crypt epithelia of human palatine tonsils. *Histochem Cell Biol* 114: 311-321.

**Clark, M.A., Blair, H., Liang, L., Brey, R.N., Brayden, D., Hirst, B.H.** 2001. Targeting polymerised liposome vaccine carriers to intestinal M cells. *Vaccine* 20: 208-217.

**Clarke, R.C., Gyles, C.L.** 1993. *Salmonella*. In Pathogenesis of bacterial infections in animals, 2nd edition. Gyles, C.L., and Thoen, C.O. éds. Iowa State University Press. pp. 133-153.



**Cleland, J.L., Powell, M.F., Lim, A., Barron, L., Berman, P.W., Eastman, D.J., Nunberg, J.H., Wrin, T., Vennari, J.C.** 1994. Development of a single-shot subunit vaccine for HIV-1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10 Suppl 2: S21-26.

**Cocks, G.T., Wilson, A.C.** 1972. Enzyme evolution in the Enterobacteriaceae. *J. Bact* 110: 793-802.

**Coffman, R.L., Seymour, B.W., Lebman, D.A., Hiraki, D.D., Christiansen, J.A., Shrader, B., Cherwinski, H.M., Savelkoul, H.F., Finkelman, F.D., Bond, M.W.** 1988. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol Rev* 102: 5-28.

**Coombes, A.G.A., Lavelle, E.C., Davis, S.S.** 1999. Biodegradable lamellar particles of poly(lactide) induce sustained immune responses to a single dose of adsorbed protein. *Vaccine* 17: 2410-2422.

**Corbel, M.J.** 1996. Reasons for instability of bacterial vaccines. *Dev Biol Stand* 87: 113-124.

**Corda, D., Di Girolamo, M.** 2003. Functional aspects of protein mono-ADP-ribosylation. *EMBO J* 22: 1953-1958.

**Corriveau J, Lessard L, Quessy S.** Étude de l'adhésion et de l'invasion de lignées cellulaires intestinales par des souches de *Salmonella* Typhimurium isolées de porcs affectés de salmonellose. Colloque International Francophone de Bactériologie Vétérinaire 2002, 37-38.

**Côté, S., Letellier, A., Lessard, L., Quessy, S.** 2004. Distribution of *Salmonella* in tissues following natural and experimental infection in pigs. *Can J Vet Res* 68: 241-248.

**Cox, D.S., Taubman, M.A.** 1984. Oral induction of the secretory immune response by soluble and particulate antigens. *Int Archs Allergy Appl Immun* 75: 126-131.

**Darwin, K.H., Miller, V.L.** 1999. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin Microbiol Rev* 12: 405-428.

**Day, P.M., Esquivel, F., Lukszo, J., Bennink, J.R., Yewdell, J.W.** 1995. Effect of TAP on the generation and intracellular trafficking of peptide-receptive major histocompatibility complex class I molecules. *Immunity* 2: 137-147.

**D'Costa, S.S., Romer, T.G., Boyle, M.D.P.** 2000. Analysis of expression of a cytosolic enzyme on the surface of *Streptococcus pyogenes*. *Biochem Biophys Res Comm* 278: 826-832.

**De Almeida, M.E., Newton, S.M., Ferreira, L.C.** 1999. Antibody responses against flagellin in mice orally immunized with attenuated *Salmonella* vaccine strains. *Arch Microbiol* 172: 102-108.

**Dellamonica, P., Pradier, C.** 1992. Non-typhoid salmonellosis in HIV infection. *Rev Prat* 15: 2283-2284.

**DeMerlis, C.C., Schoneker, D.R.** 2003. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). *Food Chem Toxicol* 41: 319-326.

**Devriese, L.A., Hommez, J., Pot, B., Haesebrouck, F.** 1994. Identification and composition of the streptococcal and enterococcal flora of tonsils, intestines and faeces of pigs. *J Appl Bacteriol* 77: 31-36.

**Donnenberg, M.S., Kaper, J.B.** 1991. Construction of an eae deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect Immun* 59: 4310-4317.

**Duguid, J.P., Anderson, E.S., Campbell, I.** 1966. Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. *J Pathol Bacteriol* 92:107-138.

**Eisenstein, B.I.** 1987. *Molecular architecture and assembly: fimbriae*. In FC Neidhart, R Curtiss III, Ingraham JL, Lin ECC, Low B, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE (eds), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed, vol1 American Society for Microbiology, Washington DC. pp. 84-90.

**Ekperigin, H.E., Nagaraja, K.V.** 1998. *Salmonella*. Vet Clin North Am: Food Anim Pract 14: 17-29.

**Eldrigdge, J.H., Hammond, C.J., Meulbroek, J.A., Staas, J.K., Gilley, R.M., Tice, T.R.** 1990. Controlled vaccine release in the gut-associated lymphoid tissues. I. Orally administered biodegradable microspheres target the Peyer's patches. J Controlled Release 11: 205-214.

**Eldrigdge, J.H., Staas, J.K., Meulbroek, J.A., Tice, T.R., Gilley, R.M.** 1991. Biodegradable and biocompatible poly (DL-lactide-co-glycolide) microspheres as an adjuvant for staphylococcal enterotoxin B toxoid which enhance the level of toxin-neutralizing antibodies. Infect Immun 59: 2978-2986.

**Ernst, R.K., Guina, T., Miller, S.I.** 2001. *Salmonella typhimurium* outer membrane remodeling: role in resistance to host innate immunity. Microb Infect 3: 1327-1334.

**Fagarasan, S, Honjo, T.** 2003. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. Nat Rev Immunol 3: 63-72.

**Fattal, E., Pecquet, S., Couvreur, P., Andremont, A.** 2002. Biodegradable microparticles for the mucosal delivery of antibacterial and dietary antigens. Int J Pharm 242: 15-24.

**Fedorka-Cray, P.J., Whipp, S.C., Isaacson, R.E., Nord, N., Lager, K.** 1994. Transmission of *Salmonella typhimurium* to swine. Vet Microbiol 41: 333-344.

**Fedorka-Cray, P.J., Kelley, L.C., Stabel, T.J., Gray, J.T., Laufer, J.A.** 1995. Alternate routes of invasion may affect pathogenesis of *Salmonella typhimurium* in swine. Infect Imm 63: 2658-2664.

**Fedorka-Cray, P.J., Bailey, J.S., Stern, N.J., Cox, N.A., Ladely, S.R., Musgrove, M.** 1999. Mucosal competitive exclusion to reduce *Salmonella* in swine. J Food Prot 62: 1376-1380.

**Ferdinand, W.** 1964. The isolation and specific activity of rabbit-muscle glyceraldehyde phosphate dehydrogenase. Biochem J 92: 578-585.

**Forrest, B.D.** 1992. Effects of sample processing on the measurement of specific intestinal IgA immune response. *Vaccine* 10: 802-805.

**Foster, N., Clark, M.A., Jepson, B.H.** 1998. Ulex europaeus 1 lectin targets microspheres to mouse Peyer's patch M-cells in vivo. *Vaccine* 16: 536-541.

**Foster, N., Hirst, B.H.** 2005. Exploiting receptor biology for oral vaccination with biodegradable particulates. *Adv Drug Deliv Review* 57: 431-450.

**Foubister, V., Rosenshine, I., Finlay, B.B.** 1994. A diarrheal pathogen, enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), triggers a flux of inositol phosphates in infected epithelial cells. *J Exp Med* 179: 993-998.

**Freudenberg, M.A., Merlin, T., Gumenscheimer, M., Kalis, C., Landmann, R., Galanos, C.** 2001. Role of lipopolysaccharide susceptibility in the innate immune response to *Salmonella typhimurium* infection: LPS, a primary target for recognition of Gram-negative bacteria. *Microbes Infect* 3: 1213-1222.

**Frey, A., Giannasca, K.T., Weltzin, R., Giannasca, P.J., Reggio, H., Lencer, W.I., Neutra, M.R.** 1996. Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: implications for microbial attachment and oral vaccine targeting. *J Exp Med* 184: 1045-1059.

**Fu, K., Pack, D.W., Klibanov, A.M., Langer, R.** 2000. Visual evidence of acidic environment within degrading poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres. *Pharm Res* 17: 100-106.

**Galan, J.E., Collmer, A.** 1999. Type III Secretion Machines: Bacterial Devices for protein delivery into host. *Science* 284: 1322-1328.

**Gase, K., Gase, A., Schirmer, H., Malke, H.** 1996. Cloning, sequencing and functional overexpression of the *Streptococcus equisimilis* H46A gapC gene encoding a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase that also functions as a plasmin(ogen)-binding protein. Purification and biochemical characterization of the protein. *Eur J Biochem* 239: 42-51.

**Gebert, A.** 1997a. M cells in the rabbit palatine tonsil: the distribution, spatial arrangement and membrane subdonamins as defined by confocal lectin histochemistry. *Anat Embryol* 195: 353-358.

**Gebert, A.** 1997b. The role of M cells in the protection of mucosal membranes. *Histochem Cell Biol* 108: 455-470.

**Gebert, A., Hach, G.** 1993. Differential binding of lectins to M cells and enterocytes in the rabbit cecum. *Gastroenterology* 105: 1350-1361.

**Gebert, A., Rothkotter, H.J., Pabst, R.** 1996. M cells in Peyer's patches of the intestine. *Int Rev Cytol* 167: 91-159.

**Gil-Navarro, I., Gil, M.L., Casanova, M., O'Connor, J.E., Martinez, J.P., Gozalbo, D.** 1997. The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is a surface antigen. *J Bacteriol* 179: 4992-4999.

**Goepfrich, A.** 1996. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* 17: 103-114.

**Goudot-Crozel, V., Caillol, D., Djabali, M., Dessein, A.J.** 1989. The major parasite surface antigen associated with human resistance to schistosomiasis is a 37-kD glyceraldehyde-3P-dehydrogenase. *J Exp Med* 170: 2065-2080.

**Gozalbo, D., Gil-Navarro, I., Azorin, I., Renau-Piqueras, J., Martinez, J.P., Gil, M.L.** 1998. The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein. *Infect Immun* 66: 2052-2059.

**Grau, F.H., Smith, M.G.** 1974. *Salmonella* contamination of sheep and mutton carcasses related to pre-slaughter holding conditions. *J Applied Bacteriology* 37: 111-116.

**Gray, J.T., Fedorka-Cray, P.J., Stabel, T.J., Ackermann, M.R.** 1995. Influence of inoculation route on the carrier state of *Salmonella choleraesuis* in swine. *Vet Microbiol* 47: 43-59.

**Gunn, J.S., Miller, S.I.** 1996. PhoP/PhoQ activates transcription of *pmr A/B*, encoding a two-component system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. J Bacteriol 178: 6857-6864.

**Guo, L., Lim, K.B., Gunn, J.S., Bainbridge, B., Darveau, R.P., Hackett, M., Miller, S.I.** 1997. Regulation of lipid A modification by *Salmonella typhimurium* virulence genes *phoP-phoQ*. Science 276: 250-253.

**Gupta, R.K., Alroy, J., Alonso, M.J., Langer, R., Siber, G.R.** 1997. Chronic local tissue reactions, long-term immunogenicity and immunologic priming of mice and guinea pigs to tetanus toxoid encapsulated in biodegradable polymer microspheres composed of poly lactide-co-glycolide polymers. Vaccine 15: 1716-1723.

**Haesebrouck, F., Pasmans, F., Chiers, K., Maes, D., Ducatelle, R., Decostere, A.** 2004. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? Vet Microbiol 100: 255-258.

**Heard, T.W., Linton, A.H.** 1966. An epidemiological study of *Salmonella* in a closed pig herd. J Hyg 64: 411-417.

**Hensel, M., Shea, J.E., Waterman, S.R., Mundy, R., Nikolaus, T., Banks, G., Vazquez-Torres, A., Gleeson, C., Fang, F.C., Holden, D.W.** 1998. Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. Mol Microbiol 30: 163-174.

**Ho, A.S., Moore, K.W.** 1994. Interleukin-10 and its receptor. Ther Immunol 1: 173-185.

**Hohmann, E.L.** 2001. Nontyphoidal Salmonellosis. Food Safety 32: 263-269.

**Hormaeche, C.E., Joysey, H.S., Desilva, L., Izhar, M., Stocker, B.A.** 1991. Immunity conferred by *Aro Salmonella* live vaccines. Microb Pathog 10: 149-158.

**Horter, D.C., Yoon, K.J., Zimmerman, J.J.** 2003. A review of porcine tonsils in immunity and disease. Anim Health Res Rev 4: 143-155.

**Hudault, S., Guignot, J., Servin, A.L.** 2001. *Escherichia coli* strains colonizing the gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonella typhimurium* infection. *Gut* 49: 47-55.

**Hueck, C.J.** 1998. Type III secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Molec Biol Rev* 62: 379-443.

**Hughes, E.A., Galan, J.E.** 2002. Immune response to *Salmonella*: location, location, location? *Immunity* 16:325-328.

**Humphrey, T.** 2000. Public-health Aspects of *Salmonella* infection. In *Salmonella* in Domestic animals. In *Salmonella* in domestic animals. Wray, S. et Wray, A. eds. CABI Publishing. Pp. 245-263.

**Humphrey, T.** 2004. *Salmonella*, stress response and food safety. *Nat Rev Microbiol* 2: 504-509.

**Humphrey, T. J., Richardson, N. P., Statton, K. M. & Rowbury, R. J.** 1993. Effects of temperature shift on acid and heat tolerance in *Salmonella enteritidis* phage type 4. *Appl Environ Microbiol* 59: 3120–3122.

**Humphrey, T.J., Wilde, S.J., Rowbury, R.J.** 1997. Heat tolerance of *Salmonella typhimurium* DT104 isolates attached to muscle tissue. *Lett Appl Microbiol* 25: 265-268.

**Hurd, H.S., McKean, J.D., Griffith, R.W., Wesley, I.V., Rostagno, M.H.** 2002. *Salmonella enterica* infections in market swine with and without transport and holding. *Appl Environ Microbiol* 68: 2376-2381.

**Inaba, K., Inaba, M., Naito, M., Steinman, R.M.** 1993. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med* 178: 479-488.

**Isaacson, R.E., Kinsel, M.** 1992. Adhesion of *Salmonella typhimurium* to porcine intestinal epithelial surfaces: identification and characterization of two phenotypes. *Infect Imm* 60: 3193-3200.

**Isaacson, R.E., Firkins, L.D., Weigel, R.M., Zuckermann, F.A., DiPietro, J.A.** 1999. Effect of transportation and feed withdrawal on shedding of *Salmonella typhimurium* among experimentally infected pigs. *Am J Vet Res* 60: 1155-1158.

**Iwasaki, A., Kelsall, B.** 2001. Unique function of CD11b+, CD8 $\alpha$ +, and double negative Peyer's patch dendritic cells. *J Immunol* 166: 4884.

**Jameela, S.R., Suma, N. and Jayakrishana, A.** 1997. Protein release from poly (epsilon-caprolactone) microspheres prepared by melt encapsulation and solvent evaporation techniques: a comparative study. *J Biomater Sci Polym* 8: 457-466.

**Janeway, C.A. Jr, Carding, S., Jones, B., Murray, J., Portoles, P., Rasmussen, R., Rojo, J., Saizawa, K., West, J., Bottomly, K.** 1988. CD4+ T cells: specificity and function. *Immunol Rev* 101: 39-80.

**Jani, P.U., Florence, A.T., McCarthy, D.E.** 1992. Further histological evidence of the gastrointestinal absorption of polystyrene nanospheres in the rat. *Int J Pharm* 84: 245-252.

**Jeffrey, H., Davis, S.S., O'Hagan, D.T.** 1991. The preparation and characterization of poly (lactide-co-glycolide) microparticles:oil-in-water emulsion solvent evaporation. *Int J Pharm* 77: 169-175.

**Jepson, M.A., Simmons, N.L., O'Hagan, D.T., Hirst, B.H.** 1993. Comparison of poly(DL-lactide-co-glycolide) and polystyrene microspheres targeting to intestinal M cells. *J Drug Target* 1: 245-249.

**Jepson, M.A., Simmons, N.L., Savidge, T.C., James, P.S., Hirst, B.H.** 1993. Selective binding and transcytosis of latex microspheres by rabbit intestinal M cells. *Cell Tissue Res* 271: 399-405.

**Jepson, M.A., Mason, C.M., Clark, M.A., Simmons, N.L., Hirst, B.H.** 1995. Variations in lectin binding properties of intestinal M cells. *J Drug Target* 3: 75-77.

**Jepson, M.A., Clark, M.A., Foster, N., Mason, C.M., Bennett, M.K., Simmons, N.L., Hirst, B.H.** 1996. Targeting to intestinal M cells. *J Anat* 189: 507-516.



**Jepson, M.A., Clark, M.A.** 2001. The role of M cells in *Salmonella* infection. *Microb Infect* 3: 1183-1190.

**Jiang, W., Gupta, R.K., Deshpande, M.C., Schwendeman, S.P.** 2005. Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens. *Adv Drug Deliv Rev* 57: 391-410.

**Jobin, M.C., Brassard, J., Quessy, S., Gottschalk, M., Grenier, D.** 2004. Acquisition of host plasmin activity by the swine pathogen *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* 72 : 606-610

**Johansen, P., Tamber, H., Merkle, H.P., Gander, B.** 1999. Diphtheria and tetanus toxoid microencapsulation into conventional and end-group alkylated PLA/PLGAs. *Eur J Pharm Biopharm* 47: 193-201.

**Johnson, O.L., Cleland, J.L., Lee H.J., Charnis, M., Duenas, E., Jaworowicz, W., Shepard, D., Shahzamani, A., Jones, A.J.S., Putney, S.D.** 1996. A month-long effect from a single injection of microencapsulated human growth hormone. *Nat Med* 2: 795–799.

**Jones, B.D.** 1997. Host responses to pathogenic *Salmonella* infection. *Genes Dev* 11: 679-687.

**Joosten, P.H., Engelsma, M.Y., van der Zee, M.D., Rombout, J.H.** 1997. Induction of oral tolerance in carp after feeding protein antigens. *Vet Immunol Immunopathol* 60: 187-196.

**Kassay, D., Sandor, A.** 1962. The crypt system of the palatine tonsils. *Arch Otolaryngol* 75: 144-55.

**Kawai, K., Liu, Y., Ohnishi, K., Oshima, S.** 2004. A conserved 37 kDa outer membrane protein of *Edwardsiella tarda* is an effective vaccine candidate. *Vaccine* 22: 3411-3418.

**Keith, B.R., Harris, S.L., Walker, P.R., Orndorff, P.E.** 1990. Effect of type 1 piliation on in vitro killing of *Escherichia coli* by mouse peritoneal macrophages. *Infect Imm* 58: 3448-3454.

**Kenny, B., Finlay, B.B.** 1995. Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 7991-7995.

**Kerr, M.A.** 1990. The structure and function of human IgA. *Biochem J* 271: 285-296.

**Kidane, A., Guimond, P., Ju, T.R., Sanchez, M., Gibson, J., Bowersock, T.L.** 2001. The efficacy of oral vaccination of mice with alginate encapsulated outer membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* and One-Shot. *Vaccine* 19: 2637-2646.

**Klena, J.D., Ashford, R.S., Schnaitman, C.A.** 1992. Role of *Escherichia coli* K-12 *rfa* genes and the *rfp* gene of *Shigella dysenteriae* 1 in the generation of lipopolysaccharide core heterogeneity and attachment of O antigen. *J Bacteriol* 174: 7297-7303.

**Kraehenbuhl, J.P., Neutra, M.R.** 1992. Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol Rev* 72: 853-879.

**Kwan, L.Y., Isaacson, R.E.** 1998. Identification and characterization of a phase-variable nonfimbrial *Salmonella typhimurium* gene that alters O-antigen production. *Infect Imm* 66: 5725-5730.

**Kyte, J., Doolittle, R.F.** 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol* 157: 105-132.

**Lahteenmaki, K., Virkola, R., Pouttu, R., Kuusela, P., Kukkonen, M., Korhonen, T.K.** 1995. Bacterial plasminogen receptors: in vitro evidence for a role in degradation of the mammalian extracellular matrix. *Infect Immun* 63: 3659-3664.

**Lamm, M.E.** 1997. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu Rev Microbiol* 51: 311-340.

**Laval, A, Morvan, H., Desprez, G., Corbion, B.** 1991. La salmonellose du porc. *Rec Med Vet* 167: 835-848.

**Lavelle, E.C., Sharif, S., Thomas, N.W., Holland, J., Davis, S.S.** 1995. The importance of gastrointestinal uptake of particles in the design of oral delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 18: 5-22.

**Lavelle, E.C., Yeh, M.K., Coombes, A.G.A., Davis, S.S.** 1999. The stability and immunogenicity of a protein antigen encapsulated in biodegradable microparticles based on blends of lactide polymers and polyethylene glycol. *Vaccine* 17: 512-529.

**Lavelle, E.C., Grant, G., Pusztai, A., Pfuller, U., O'Hagan, D.T.** 2000. Mucosal immunogenicity of plant lectins in mice. *Immunology* 99: 30-37.

**Lee, J.C., Timasheff, S.N.** 1981. The stabilization of proteins by sucrose. *J Biol Chem* 256: 7193-7201.

**Lehr, C.M., Poelma, F.G.J., Junginger, H.E., Tukker, J.J.** 1991. An estimate of turnover time of intestinal mucus gel layer in the rat in situ loop. *Int J Pharm* 70: 235-240.

**Lehr, C.M., Bouwstra, J.A., Kok, W., Noach, A.B.J., de Boer, A.G., Junginger, H.E.** 1992. Bioadhesion by means of specific binding of tomato lectin. *Pharm Res* 9: 547-553.

**Lehr, C.M.** 1994. Bioadhesins technologies for the delivery of peptide and protein drugs to the gastrointestinal tract. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 11: 119-160.

**LeMinor, L.** 1984. Facultative anaerobic gram-negative rods, In *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*. Krieg, N.R., Jolt, J.G. eds., Williams & Wilkins, Baltimore. Pp.427-458.

**Letellier, A., Messier, S., Paré, J., Ménard, J., Quessy, S.** 1999. Distribution of *Salmonella* in swine herds in Québec. *Vet Microbiol* 67: 299-306.

**Letellier A, Messier S, Lessard L, Chenier S, Quessy S.** 2001. Host response to various treatments to reduce *Salmonella* infections in swine. *Can J Vet Res* 65: 168-172.

**Levine, W.C., Smart, A.F., Arhcer, D.L., Bean, N.T.I.** 1991. Foodborne disease outbreaks in nursing homes, 1975 through 1987. *J Am Med Assn* 266: 2105-2109.

**Lewis, D.H.** 1990. Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. In *Biodegradable Polymers as Drugs Delivery Systems*. Chasin M and Langer R éds. New York, Marcel Dekker Inc. Pp. 1-41.

**Li, L., Schwendeman, S.P.** 2005. Mapping neutral microclimate pH in PLGA microspheres. *J Control Release* 101: 163-73.

**Liang-Takasaki, C.J., Saxen, H., Makela, P.H., Leive, L.** 1983. Complement activation by polysaccharide of lipopolysaccharide: an important virulence determinant of *Salmonella*. *Infect Imm* 41: 563-569.

**Linton, A.H., Jennett, N.E., Heard, T.W.** 1970. Multiplication of *Salmonella* in liquid feed and its influence on the duration of excretion in pigs. *Res Vet Sci* 11:452-7.

**Liu, W., Yang, Y., Chung, N., Kwang, J.** 2001. Induction of humoral immune response and protective immunity in chickens against *Salmonella enteritidis* after a single dose of killed bacterium-loaded microsphere. *Av Dis* 45:797-806.

**Liu, Y., Oshima, S., Kurohara, K., Ohnishi, K., Kawai, K.** 2005. Vaccine efficacy of recombinant GAPDH of *Edwardsiella tarda* against edwardsiellosis. *Microbiol Immunol* 49: 605-612.

**Lo, W.F., Ong, H., Metcalf, E.S., Soloski, M.J.** 1999. T cell responses to Gram-negative intracellular bacterial pathogens: a role for CD8+ T cells in immunity to *Salmonella* infection and the involvement of MHC class Ib molecules. *J Immunol* 162 :5398-406.

**Lu, W., Park, T.G.** 1995. Protein release from poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: protein stability problems. *PDA J Pharm Sci Technol* 49: 13-19.

**Lumsden, J.S., Wilkie, B.N., Clarke, R.C.** 1991. Resistance to faecal shedding in pigs and chickens vaccinated with an aromatic dependant mutant of *Salmonella typhimurium*. *Am J Vet Res* 52: 1784-1787.

**Macnab RM.** 1996. *Flagella and motility*. In FC Neidhart, R Curtiss III, Ingraham JL, Lin ECC, Low B, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE (eds), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed, vol1 American Society for Microbiology, Washington DC. p. 123-145

**MacPherson, G., Milling, S., Yrlid, U., Cousins, L., Turnbull, E., Huang, F.P.** 2004. Uptake of antigens from the intestine by dendritic cells. *Ann N Y Acad Sci* 1029:75-82.

**Maeda, K., Nagata, H., Yamamoto, Y., Tanaka, M., Tanaka, J., Minamino, N., Shizukuishi, S.** 2004. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus oralis* functions as a coadhesin for *Porphyromonas gingivalis* major fimbriae. *Infect Immun* 72 :1341-1348.

**Magre, E.P., Sam, A.P.** 1997. Hydrolytic degradation of PLGA, calculation of rate constant from various types of in vitro degradation curves. *J Control Release* 48: 318-319.

**Martinez-Sancho, C., Herrero-Vanrell, R., Negro, S.** 2004. Study of gamma-irradiation effects on aciclovir poly(DL-lactic-co-glycolic) acid microspheres for intravitreal administration. *J Control Release* 99:41-52.

**Mastroeni, P., Chabalgoity, J.A., Dunstan, S.J., Maskell, D.J., Dougan, G.** 2000. *Salmonella*: Immune response and vaccines. *Vet J* 161: 132-164.

**Mazanec, M.B., Nedrud, J.G., Kaetzel, C.S., Lamm, M.E.** 1993. A three-tiered view of the role of IgA in mucosal defense. *Immunol Today* 14:430-435.

**McClelland, M., Sanderson, K.E., Spieth, J., Clifton, S.W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., Hou, S., Layman, D., Leonard, S., Nguyen, C., Scott, K., Holmes, A., Grewal, N., Mulvaney, E., Ryan, E., Sun, H., Florea, L., Miller, W., Stoneking, T., Nhan, M., Waterston, R., Wilson, R.K.** 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* 413: 852-856

**McGee, J.P., Singh, M., Xuan-Mao, L., Qui, H., O'Hagan, D.T.** 1997. The encapsulation of a model protein in poly (lactide-co-glycolide) microparticles of various sizes; an evaluation of process reproducibility. *J Microencap* 14:197-210.

**McGhee, J.R., Mestecky, J., Elson, C.O., Kiyono, H.** 1989. Regulation of IgA synthesis and immune response by T cells and interleukins. *J Clin Immunol* 9:175-199.

**McGinity, J.W., O'Donnell, P.B.** 1997. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Adv Drug Deliv Rev* 28: 25-42.

**McSorley, S.J., Cookson, B.T., Jenkins, M.K.** 2000. Characterization of CD4+ T cell responses during natural infection with *Salmonella typhimurium*. *J Immunol* 164: 986-993.

**Mead, P.S., Slutsker, L., Ditez, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V.** 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5: 607-625.

**Michetti, P., Mahan, M.J., Slauch, J.M., Mekalanos, J.J., Neutra, M.R.** 1992. Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 60:1786-1792.

**Miller, S.I., Kukral, A.M., Mekalanos, J.J.** 1989. A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5054-5058.

**Mittrücker, H.W., Kaufmann, S.H.** 2000. Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *J Leukoc Biol* 67:457-463.

**Modun, B., Williams, P.** 1999. The staphylococcal transferrin-binding protein is a cell wall glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Infect Immun* 67:1086-1092.

**Mølbak, K.** 2004. Spread of resistant bacteria and resistance genes from animals to humans--the public health consequences. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 51:364-369.

**Monack, D.M., Raupach, B., Hromockj, A.E., Falkow, S.** 1996. *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9833-9838.

**Morris, W., Steinhoff, M.C., Russell, P.K.** 1994. Potential of polymer encapsulation technology for vaccine innovation. *Vaccine* 12:5-11.

**Morse, E.V., Duncan, M.A.** 1974. Salmonellosis; an environmental health problem. *J Am Vet Med As* 165:1015-1019.

**Mosser, D.M.** 2003. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 73:209-212.

**Muir, W.M., Husband, A.J., Gipps, E.M., Bradley, M.P.** 1994. Induction of specific IgA responses in rats after oral vaccination with biodegradable microspheres containing a recombinant protein. *Immunol Lett* 42:203-207.

**Müller-Schollenberger, V., Beyer, W., Schintzler, P., Merckelbach, A., Roth, S., Kalinna, B.H., Lucius, R.** 2001 Immunization with *Salmonella typhimurium*-delivered glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protects mice against challenge infection with *Echinococcus multilocularis* eggs. *Int J Parasitol* 31:1441-1449.

**Murillo, M., Gamazo, C., Goni, M., Irache, J., Blanco-Prieto, M.** 2002. Development of microparticles prepared by spray-drying as a vaccine delivery system against brucellosis. *Int J Pharm* 242: 341–344.

**Murray, C.J.** 2000. Environmental aspects of *Salmonella*. In *Salmonella* in domestic animals. In *Salmonella* in domestic animals. Wray, S. et Wray, A. eds. CABI Publishing, Pp. 265-283.

**Murphy, R.S.R.** 1997. *Biodegradable polymers*. In *Controlled and Novel Drug Delivery*. Jain, N.K. ed. CBS Publisher, New Delhi, pp. 27–51.

**Mutwiri, G., Bowersock, T., Kidane, A., Sanchez, M., Gerdts, V., Babiuk, L.A., Griebel, P.** 2002. Induction of mucosal immune responses following enteric immunization with antigen delivered in alginate microspheres. *Vet Immunol Immunopathol* 87:269-276.

**Naisbett, B., Woodley, J.** 1995. The potential use of tomato lectin for oral drug delivery. 2. Mechanism of uptake in vitro. *Int J Pharm* 110:227-236.

**Nam, Y.S., Park, T.G.** 1999. Protein loaded biodegradable microspheres based on PLGA-protein bioconjugates. *J Microencapsul* 16: 625-637.

**Nauciel, C.** 1990. Role of CD4+ T cells and T-independent mechanisms in acquired resistance to *Salmonella typhimurium* infection. *J Immunol* 145:1265-1269.

**Nelson, K., Whittam, T.S., Selander, R.K.** 1991. Nucleotide polymorphism and evolution in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (*gapA*) in natural populations of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6667-6671.

**Nelson, D., Goldstein, J.M., Boatright, K., Harty, D.W., Cook, S.L., Hickman, P.J., Potempa, J., Travis, J., Mayo, J.A.** 2001. pH-regulated secretion of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus gordonii* FSS2: purification, characterization, and cloning of the gene encoding this enzyme. *J Dent Res* 80 : 371-377

**Neutra, M.R., Phillips, T.L., Mayer, E.L., Fishkind, D.J.** 1987. Transport of membrane-bound macromolecules by M cells in follicle-associated epithelium of rabbit Peyer's patch. *Cell Tissue Res* 247:537-546.

**Neutra, M.R., Giannasca, P.J., Giannasca, K.T.** 1995. M cells and microbial pathogens. In *Infections of the GI tract*. Blaser, M., Smith, P.D., Ravodin, J.I. eds. New York Raven Press:163-178.

**Nicholson, T.L., Bäumler, A.J.** 2001. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium elicits cross-immunity against a *Salmonella enterica* serotype enteritidis strain expressing LP fimbriae from the lac promoter. *Infect Immun* 69:204-212.

**Nijssen JF, van Het Schip AD, van Steenberg MJ, Zielhuis SW, Kroon-Batenburg LM, van de Weert M, van Rijk PP, Hennink WE.** 2002. Influence of neutron irradiation on holmium acetylacetonate loaded poly(L-lactic acid) microspheres. *Biomaterials* 23: 1831-1839.

**Nixon, D.F., Hioe, C., Chen, P.D., Bian, Z., Kuebler, P., Li, M.L., Qiu, H., Li, X.M., Singh, M., Richardson, J., McGee, P., Zamb, T., Koff, W., Wang, C.Y., O'Hagan, D.** 1996. Synthetic peptides entrapped in microparticles can elicit cytotoxic T cell activity. *Vaccine* 14:1523-1530.



**Norris TL, Bäumlér AJ.** 1999. Phase variation of the *lpf* operon is a mechanism to evade cross-immunity between *Salmonella* serotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13393-13398.

**O'Hagan, D.T., Jeffery, H., Roberts, M.J., McGee, J.P., Davis, S.S.** 1991. Controlled release microparticles for vaccine development. *Vaccine* 9: 768-771.

**O'Hagan, D.T., McGee, J.P., Boyle, R., Gumaer, D., Li, X-M., Potts, B., Wang, C.Y., Koff, W.C.** 1995a. The preparation, characterization and pre-clinical evaluation of an orally administered HIV-1 vaccine, consisting of a branched peptide immunogen entrapped in controlled release microparticles. *J Control Rel* 36:75-84.

**O'Hagan, D.T., McGee, J.P., Lindblad, M., Holmgren, J.** 1995b. Cholera toxin B subunit retains antigenicity and immunogenicity following encapsulation in biodegradable microparticles. *Int J Pharm.* 119: 251-255.

**Ohi, M.E., Miller, S.I.** 2001. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annu Rev Med* 52:259-274.

**Okada, J., Cohen, S., Langer, R.** 1995. In vitro evaluation of polymerized liposomes as an oral drug delivery system. *Pharm Res* 12:576-582.

**Pancholi, V., Fischetti, V.A.** 1992. A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J Exp Med* 176:415-426.

**Pancholi, V., Fischetti, V.A.** 1993. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase on the surface of group A streptococci is also an ADP-ribosylating enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8154-8158.

**Pang, T., Bhutta, Z.A., Finlay, B.B., Altwegg, M.** 1995 Typhoid fever and other salmonellosis: a continuing challenge. *Trends Microbiol* 3:253-255.

**Pappo, J., Ermak, T.H.** 1989. Uptake and translocation of fluorescent latex particles by rabbit Peyer's patch follicle epithelium: a quantitative model for M cell uptake. *Clin Exp Immunol* 76:144-148.

**Pappo, J., Ermak, T.H., Steger, H.J.** 1991. Monoclonal antibody-directed targeting of fluorescent polystyrene microspheres to Peyer's patch M cells. *Immunology* 73:277-280.

**Partidos, C.D., Vohra, P., Jones, D., Farrar, G., Steward, M.W.** 1997. CTL responses induced by a single immunization with peptide encapsulated in biodegradable microparticles. *J Immunol Methods* 206:143-151.

**Periwal, S.B., Speaker, T.J., Cebra, J.J.** 1997. Orally administered microencapsulated reovirus can bypass suckled, neutralizing maternal antibody that inhibits active immunization of neonates. *J Virol* 71:2844-2850.

**Phalipon, A., Kaufmann, M., Michetti, P., Cavaillon, J.M., Huerre, M., Sansonetti, P., Kraehenbuhl, J.P.** 1995. Monoclonal immunoglobulin A antibody directed against serotype-specific epitope of *Shigella flexneri* lipopolysaccharide protects against murine experimental shigellosis. *J Exp Med* 182:769-778.

**Pie, S., Truffa-Bachi, P., Pla, M., Nauciel, C.** 1997. Th1 response in *Salmonella typhimurium*-infected mice with a high or low rate of bacterial clearance. *Infect Immun* 65:4509-4514.

**Pikal, M.J.** 1991. Freeze-drying of proteins: part II. Formulation selections. *Pharm Technol Int* 40-43.

**Pistel, K.F., Kissel, T.** 2000. Effects of salt addition on the microencapsulation of proteins using W/O/W double emulsion technique. *J Microencapsul* 17: 467-483.

**Porta, C., James, P.S., Phillips, A.D., Savidge, T.C., Smith, M.W., Cremaschi, D.** 1992. Confocal analysis of fluorescent bead uptake by mouse Peyer's patch follicle-associated M cells. *Exp Physiol* 77:929-932.

- Proux, K., Cariolet, R., Fravallo, P., Houdayer, C., Keranflech, A., Madec, F.** 2001. Contamination of pigs by nose-to-nose contact or airborne transmission of *Salmonella* Typhimurium. *Vet Res* 32:591-600.
- Quessy, S., Bélanger, D., Letellier, A.** 2001 Épidémiologie et contrôle des infections à *Salmonella* chez le porc. *Méd Vet Québec* 31: 30-31.
- Raghuvanshi, R.S., Singh, M., Talwar, G.P.** 1993. Biodegradable delivery system for single step immunization with tetanus toxoid. *Int J Pharm* 93:R1-R5.
- Rebelatto, M.C., Guimond, P., Bowersock, T.L., HogenEsch, H.** 2001. Induction of systemic and mucosal immune response in cattle by intranasal administration of pig serum albumin in alginate microspheres. *Vet Immunol Immunopathol* 83:93-105.
- Reddin, K.M., Easterbrook, T.J., Eley, S.M., Russell, P., Mobsby, V.A., Jones, D.H., Farrar, G.H., Williamson, E.D., Robinson, A.** 1998. Comparison of the immunological and protective responses elicited by microencapsulated formulations of the F1 antigen from *Yersinia pestis*. *Vaccine* 16:761-767
- Renegar, K.B., Small, P.A. Jr.** 1991. Passive transfer of local immunity to influenza virus infection by IgA antibody. *J Immunol* 146:1972-1978.
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.P., Ricciardi-Castagnoli, P.** 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2 :361-367.
- Richter-Dahlfors, A., Buchan, A.M.J., Finlay, B.B.** 1997. Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella typhimurium* resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo. *J Exp Med* 186:569-580.
- Roesler, U., Marg, H., Schroder, I., Mauer, S., Arnold, T., Lehmann, J., Truyen, U., Hensel, A.** 2004. Oral vaccination of pigs with an invasive *gyrA-cpxA-rpoB Salmonella* Typhimurium mutant. *Vaccine* 23:595-603.

**Roof MB, Doitchinoff DD.** 1995. Safety, efficacy, and duration of immunity induced in swine by use of an avirulent live *Salmonella cholerasuis*-containing vaccine. *Am J Vet Res* 56: 39-44.

**Rosas, J.E., Hernandez, R.M., Gascon, A.R., Igartua, M., Guzman, F., Patarroyo, M.E., Pedraz, J.L.** 2001. Biodegradable PLGA microspheres as a delivery system for malaria synthetic peptide SPf66. *Vaccine* 19: 4445-4451.

**Rosenshine, I., Donnenberg, M.S., Kaper, J.B., Finlay, B.B.** 1992. Signal transduction between enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and epithelial cells: EPEC induces tyrosine phosphorylation of host cell proteins to initiate cytoskeletal rearrangement and bacterial uptake. *EMBO J* 11:3551-3560.

**Rosinha, G.M., Myioshi, A., Azevedo, V., Splitter, G.A., Oliveira, S.C.** 2002. Molecular and immunological characterization of recombinant *Brucella abortus* glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase, a T- and B-cell reactive protein that induces partial protection when co-administered with an interleukin-12-expressing plasmid in a DNA vaccine formulation. *J Med Microbiol* 51 : 661-671.

**Sah, H.K.** 1999. Protein behavior at the water/methylene chloride interface. *J Phar Sci* 88: 1320-1325.

**Sah, H.** 2000. Ethyl formate –an alternative dispersed solvent useful in preparing PLGA microspheres. *Int J Pharm* 195: 103-113.

**Salles, M.W., Middleton, D.M.** 2000. Lymphocyte subsets in porcine tonsillar crypt epithelium. *Vet Immunol Immunopathol* 77:133-144.

**Sansonetti, P.J., Phalipon, A.** 1999. M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: mechanisms of interaction, consequences for the disease process. *Semin Immunol* 11: 193-203.

**Santé Canada.** Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (PICRA/CIPARS). Ottawa, 2004. Disponible [www.hc-sc.gc.ca/pphb-dqsp/cipars-picra/index.html](http://www.hc-sc.gc.ca/pphb-dqsp/cipars-picra/index.html)

**Sato, Y., Wake, K., Watanabe, I.** 1990. Differentiation of crypt epithelium in human palatine tonsils: the microenvironment of crypt epithelium as a lymphoepithelial organ. *Arch Histol Cytol* 53:41-54.

**Scholes, P.D., Coombes, A.G., Illum, L., Davis, S.S., Watts, J.F., Ustariz, C., Vert, M., Davies, M.C.** 1999. Detection and determination of surface levels of poloxamer and PVA surfactant on biodegradable nanospheres using SSIMS and XPS. *J Control Release* 59:261-278.

**Schwartz, K.J.** 1999. *Salmonellosis*. In *Diseases of swine*. Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J., eds 8<sup>th</sup> ed. Ames, Iowa State University Press. pp. 535-551.

**Seifert, K.N., McArthur, W.P., Bleiweis, A.S., Brady, L.J.** 2003. Characterization of group B streptococcal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: surface localization, enzymatic activity, and protein-protein interactions. *Can J Microbiol* 49:350-356.

**Sharon, N.** 1993. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. *Trends Biochem Sci* 18: 221-226.

**Shenderova, A., Burke, T.G., Schwendeman, S.P.** 1998. Evidence for an acidic microclimate in PLGA microspheres. *Proceed Int'l Symp Control Real Bioact Mater* 25:265-266.

**Singh, S.P., Williams, Y.U., Benjamin, W.H., Klebba, P.E., Boyd, D.** 1996. Immunoprotection by monoclonal antibodies to the porins and lipopolysaccharide of *Salmonella typhimurium*. *Microb Pathog* 21:249-263.

**Singh, M., Li, X.M., Wang, H., McGee, J.P., Zamb, T., Koff, W., Wang, C.Y., O'Hagan, D.T.** 1997a. Immunogenicity and protection in small-animal models with controlled-release tetanus toxoid microparticles as a single-dose vaccine. *Infect Immun* 65:1716-1721.

**Singh, M., Li, X.M., McGee, J.P., Zamb, T., Koff, W., Wang, C.Y., O'Hagan, D.T.** 1997b. Controlled release microparticles as a single dose hepatitis B vaccine: evaluation of immunogenicity in mice. *Vaccine* 15:475-481.

**Singh, M., O'Hagan, D.** 1998. The preparation and characterization of polymeric antigen delivery systems for oral administration. *Adv Drug Deliv Rev* 34:285-304.

**Singh, M., O'Hagan, D.** 1999. Advances in vaccine adjuvants. *Nat Biotechnol* 17:1075-1081.

**Sirover, M.A.** 1999. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 1432:159-184

**Sjoberg, U., Pohl, G., Olsen, A.** 1994. Plasminogen, absorbed by *Escherichia coli* expressing curli or by *Salmonella enteritidis* expressing thin aggregative fimbriae, can be activated by simultaneously captured tissue-type plasminogen activator (t-PA). *Mol Microbiol* 14: 443-452.

**Slipka, J.** 1988. Palatine tonsils--their evolution and ontogeny. *Acta Otolaryngol Suppl* 454:18-22.

**Sojka, M., Sayers, A.R., Woodward, M.J.** 2001. Analysis of expression of flagella by *Salmonella enterica* serotype Typhimurium by monoclonal antibodies both phase specific and common epitopes. *Vet Microbiol* 78: 61-77.

**Srisart, P., Reynolds, B.L., Rowley, D.** 1985. The correlation between serum IgA antibody levels and resistance to infection with *Salmonella typhimurium* after oral immunization with various salmonellae. *Aust J Exp Biol Med Sci* 63:177-182.

**Stenger, S., Hanson, D.A., Teitelbaum, R., Dewan, P., Niazi, K.R., Froelich, C.J, Ganz, T., Thoma-Uszynski, S., Melian, A., Bogdan, C., Porcelli, S.A., Bloom, B.R., Krensky, A.M., Modlin, R.L.** 1998. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 282:121-125.

**Stokes, C.R., Bailey, M., Wilson, A.D.** 1994. Immunology of the porcine gastrointestinal tract. *Vet Immunol Immunopathol* 43:143-150.

**Storni, T., Kundig, T.M., Senti, G., Johansen, P.** 2005. Immunity in response to particulate antigen-delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 57:333-355.

**Svensson, M., Stockinger, B., Wick, M.J.** 1997. Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells. *J Immunol* 158:4229-4236.

**Svensson, M., Johansson, C., Wick, M.J.** 2000. *Salmonella enterica* serovar typhimurium-induced maturation of bone marrow-derived dendritic cells. *Infect Immun* 68:6311-6320.

**Tabata, Y., Inoue, Y., Ikada, Y.** 1996. Size effect on systemic and mucosal immune responses induced by oral administration of biodegradable microspheres. 14: 1677-1685.

**Tabata, Y., Ikada, Y.** 1988. Macrophage phagocytosis of biodegradable microspheres composed of L-lactic acid/glycolic acid homo- and copolymers. *J Biomed Mater Res* 22: 837-858.

**Takahata, H., Lavelle, E.C., Coombes, A.G.A., Davis, S.S.** 1998. The distribution of protein associated with poly(DL-lactide co-glycolide) microparticles and its degradation in simulated body fluids. *J Control Release* 50:237-246.

**Tamber, H., Johansen, P., Merkle, H.P., Gander, B.** 2005. Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 57:357-376.

**Taylor, J.M., Heinrichs, D.E.** 2002. Transferrin binding in *Staphylococcus aureus*: involvement of a cell wall-anchored protein. *Mol Microbiol* 43:1603-1614.

**Thankavel, K., Shah, A.H., Cohen, M.S., Ikeda, T., Lorenz, R.G., Curtiss, R. 3<sup>rd</sup>, Abraham, S.N.** 1999. Molecular basis for the enterocyte tropism exhibited by *Salmonella typhimurium* type 1 fimbriae. *J Biol Chem* 274 :5797-5809.

**Torché, A.M., Jouan, H., Le Corre, P., Albina, E., Primault, R., Jestin, A., Le Verge, R.** 2000. Ex vivo and in situ PLGA microspheres uptake by pig ileal Peyer's patch segment. *Int J Pharm* 201:15-27.

**Trautmann, A., Fiebiger, J.** 1957. *Fundamentals of the Histology of Domestic Animals*. Ithaca (NY): Comstock Publishing Associates, 121-133.

**Uchida, T., Yagi, A., Oda, Y., Nakada, Y., Goto, S.** 1996. Instability of bovine serum insulin in poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) microspheres. *Chem Pharm Bull* 44: 235-236.

**Uchiya, K., Sugihara, H.** 1990. Immunological studies on soluble protective antigen (SPA) separated from culture supernatant fluids of *Salmonella enteritidis*. *Kansenshogaku Zasshi* 64: 973-979.

**Uren, T.K., Wijburg, O.L., Simmons, C., Johansen, F.E., Brandtzaeg, P., Strugnell, R.A.** 2005. Vaccine-induced protection against gastrointestinal bacterial infections in the absence of secretory antibodies. *Eur J Immunol* 35:180-188.

**Uzzau, S., Brown, D.J., Wallis, T., Rubino, S., Leori, G., Bernard, S., Casadesùs, J., Platt, D.J., Olsen, J.E.** 2000. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol Infect* 125:229-255.

**van Egmond, M., Damen, C.A., van Spriel, A.B., Vidarsson, G., van Garderen, E., van de Winkel, J.G.** 2001. IgA and the IgA Fc receptor. *Trends Immunol* 22:205-211.

**Vert, M., Li, S., Garreau, H.** 1991. More about the degradation of LA/GA-derived matrices in aqueous media. *J Control Rel* 16: 15-26.

**Villamon, E., Villalba, V., Noguerras, M.M., Tomas, J.M., Gozalbo, D., Gil, M.L.** 2003. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, a glycolytic enzyme present in the periplasm of *Aeromonas hydrophila*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 84:31-38.

**Waeckerle-Men, Y., Groettrup, M.** 2005. PLGA microspheres for improved antigen delivery to dendritic cells as cellular vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* 57: 475-482.

**Walker, J.E., Wonacott, A.J., Harris, J.I.** 1980. Heat stability of a tetrameric enzyme, D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Eur J Biochem* 108: 581-586.

**Walter, E., Dreher, D., Kok, M., Thiele, L., Kiama, S.G., Gehr, P., Merkle, H.P.** 2001. Hydrophilic poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres for the delivery of DNA to human-derived macrophages and dendritic cells. *J Control Rel* 76: 149-168.



**Watson, P.R., Paulin, S.M., Jones, P.W., Wallis, T.S.** 2000. Interaction of *Salmonella* serotypes with porcine macrophages in vitro does not correlate with virulence. *Microbiology* 146 :1639-1649.

**Wennerås, C., Neeser, J.R., Svennerholm, A.M.** 1995. Binding of the fibrillar CS3 adhesin of enterotoxigenic *Escherichia coli* to rabbit intestinal glycoproteins is competitively prevented by GalNAc beta 1-4Gal-containing glycoconjugates. *Infect Immun* 63:640-646.

**Wei, L.N., Joys, T.M.** 1985. Covalent structure of three phase-1 flagellar filament proteins of *Salmonella*. *J Mol Biol* 186:791-803.

**Weissenbock, A., Wirth, M., Gabor, F.** 2004. WGA-grafted PLGA-nanospheres: preparation and association with Caco-2 single cells. *J Control Release* 99:383-392.

**Weltzin, R., Lucia-Jandris, P., Michetti, P., Fields, S.N., Kraehenbuhl, J.P., Neutra, M.R.** 1989. Binding and transepithelial transport of immunoglobulins by intestinal M cells: demonstration using monoclonal IgA antibodies against enteric viral proteins. *J Cell Biol* 108:1673-1685.

**Wick, M.J., Ljunggren, H.G.** 1999. Processing of bacterial antigens for peptide presentation on MHC class I molecules. *Immunol Rev* 172:153-162.

**Wilcock, B., Olander, H.** 1978. Influence of oral antibiotic feeding on the duration and severity of clinical disease, growth performance, and pattern of shedding in swine inoculated with *Salmonella typhimurium*. *J Am Vet Med Assoc* 172:472-477.

**Williams, R.C., Gibbons, R.J.** 1972. Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A: a mechanism of antigen disposal. *Science Wash.* 177: 697-699.

**Williams, D.M., Rowland, A.C.** 1972. The palatine tonsils of the pig – an afferent route to the lymphoid tissue. *J Anat* 113 :131-137.

**Wood, R.L., Posposchil, A., Rose, R.** 1989. Distribution of persistent *Salmonella typhimurium* infection in internal organs of swine. *Am J Vet Res* 50:1015-1021.

**Wood, R.L., Rose, R.** 1992. Populations of *Salmonella typhimurium* in internal organs of experimentally infected carrier swine. Am J Vet Res 53:653-658.

**Yrlid, U., Wick, M.J.** 2000. *Salmonella*-induced apoptosis of infected macrophages results in presentation of a bacteria-encoded antigen after uptake by bystander dendritic cells. J Exp Med 191:613-624.

**Yrlid, U., Wick, M.J.** 2002. Antigen presentation capacity and cytokine production by murine splenic dendritic cell subsets upon *Salmonella* encounter. J Immunol 169:108-116.

**Zhou, F., Kraehenbuhl, J.P., Neutra, M.R.** 1995. Mucosal IgA response to rectally administered antigen formulated in IgA-coated liposomes. Vaccine 13:637-644.

**Zuckermann, F.A.** 1999. Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells. Vet Immunol Immunopathol 72:55-66

# ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE<sup>1</sup>

## IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

<b>Nom de l'étudiant</b> Amélie Desautels		
<b>Sigle du programme</b> M.Sc.	<b>Titre du programme</b> Sciences vétérinaires	<b>Option</b> Microbiologie

## DESCRIPTION DE L'ARTICLE

<b>Auteurs</b> Desautels AK, Letellier A, Brassard J, Prud'homme RE, Fraschini C, Quessy, S.	
<b>Titre</b> Development of a subunitary vaccine against asymptomatic <i>Salmonella</i> infection in swine	
<b>Revue</b> Canadian Journal of Veterinary Research	<b>Date de publication</b> En préparation

## DECLARATION DES COAUTEURS

<b>Déclaration</b>		
<i>À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que Amélie Desautels inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre « Mise au point d'un vaccin sous-unitaire contre les infections sous-cliniques à Salmonella chez le porc.</i>		
<b>Coauteur</b> Ann Letellier		<b>Date</b> 31/08/05
<b>Coauteur</b> Julie Brassard	<b>Signature</b>	<b>Date</b>
<b>Coauteur</b> Robert E. Prud'homme	<b>Signature</b>	<b>Date</b>
<b>Coauteur</b> Carole Fraschini	<b>Signature</b>	<b>Date</b>
<b>Coauteur</b> Sylvain Quessy		<b>Date</b> 31/08/05
<b>Coauteur</b>	<b>Signature</b>	<b>Date</b>
<b>Coauteur</b>	<b>Signature</b>	<b>Date</b>
<b>Coauteur</b>	<b>Signature</b>	<b>Date</b>

<sup>1</sup>Annexe II du Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat, mars 2001

## ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE

### IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

Nom de l'étudiant Amélie Desautels		
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Microbiologie

### DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Desautels AK, Letellier A, Brassard J, Prud'homme RE, Fraschini C, Quessy, S.	
Titre Development of a subunitary vaccine against asymptomatic <i>Salmonella</i> infection in swine	
Revue Canadian Journal of Veterinary Research	Date de publication En préparation

### DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration <i>A titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que Amélie Desautels inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre « Mise au point d'un vaccin sous-unitaire contre les infections sous-cliniques à Salmonella chez le porc.</i>		
Coeuteur Ann Letellier	Signature	Date
Coeuteur Julie Brassard		Date
Coeuteur Robert E. Prud'homme		Date
Coeuteur Carole Fraschini	Signature	Date
Coeuteur Sylvain Quessy	Signature	Date
Coeuteur	Signature	Date
Coeuteur	Signature	Date
Coeuteur	Signature	Date

*\*Annexe II du Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat, mars 2001*

## ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE<sup>1</sup>

### IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

<b>Nom de l'étudiant</b> Amélie Desautels		
<b>Siège du programme</b> M.Sc.	<b>Titre du programme</b> Sciences vétérinaires	<b>Option</b> Microbiologie

### DESCRIPTION DE L'ARTICLE

<b>Auteurs</b> Desautels AK, Letellier A, Brassard J, Prud'homme RE, Fraschini C, Quesy S	
<b>Titre</b> Development of a subunitary vaccine against asymptomatic <i>Salmonella</i> infections in swine	
<b>Revue</b> Canadian Journal of Veterinary Research	<b>Date de publication</b> En préparation

### DÉCLARATION DES COAUTEURS

<b>Déclaration</b> <i>A titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que Amélie Desautels inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre « Mise au point d'un vaccin sous-unitaire contre les infections sous-cliniques à Salmonella chez le porc »</i>		
<b>Coeuteur</b> Ann Letellier	<b>Signature</b>	<b>Date</b>
<b>Coeuteur</b> Julie Brassard		<b>Date</b>
<b>Coeuteur</b> Robert E. Prud'homme		<b>Date</b> 2005.08.29
<b>Coeuteur</b> Carole Fraschini		<b>Date</b> 2005.08.29
<b>Coeuteur</b> Sylvain Quesy		<b>Date</b>
<b>Coeuteur</b>	<b>Signature</b>	<b>Date</b>
<b>Coeuteur</b>	<b>Signature</b>	<b>Date</b>
<b>Coeuteur</b>	<b>Signature</b>	<b>Date</b>

<sup>1</sup>Annexe II du Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat (mars 2001)