

Université de Montréal

IMMUNOTHÉRAPIE PASSIVE: UNE ALTERNATIVE POUR LA PRÉVENTION DES
INFECTIONS DUES AUX *ESCHERICHIA COLI* ENTÉROTOXINOGENÈS (ETEC) CHEZ
LES PORCELETS EN PÉRIODE POST-SEVRAGE

par

SÉBASTIEN LÉVESQUE

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

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

décembre 2006

© Sébastien Lévesque, 2006



SF

607

054

2007

√ 010

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 :

IMMUNOTHÉRAPIE PASSIVE: UNE ALTERNATIVE POUR LA PRÉVENTION DES
INFECTIONS DUES AUX *ESCHERICHIA COLI* ENTÉROTOXINOGENÈS (ETEC) CHEZ
LES PORCELETS EN PÉRIODE POST-SEVRAGE

présenté par :

SÉBASTIEN LÉVESQUE

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Martine Denicourt, président-rapporteur

John M. Fairbrother, directeur de recherche

Gabriela Martinez, codirectrice

Marie Archambault, membre du jury

Résumé

Escherichia coli entérotoxigène exprimant l'adhésine fimbriaire F4 est une des bactéries responsables de la diarrhée post-sevrage chez les porcelets d'élevage. Le but du présent travail est d'étudier un traitement prophylactique d'immunothérapie passive constitué d'immunoglobulines IgY anti-F4 ajoutées à la moulée standard offert aux porcelets, suite à une optimisation de leur production par les poules pondeuses. Une telle optimisation a permis d'augmenter de 480%, en moyenne, la quantité d'IgY spécifiques à l'antigène injecté avec l'adjuvant incomplet de Freund supplémenté de 10µg de Cytosine-phosphate-Guanosine Oligodéoxynucléotide, comparativement à l'adjuvant non-supplémenté. La poudre d'oeufs contenant ces IgY a été enrobée avec un lipide, puis cubée à même la moulée des porcelets, permettant une administration aisée ainsi qu'une protection des IgY en milieu acide et une libération au niveau intestinal. La mise au point du modèle d'infection expérimentale a permis d'effectuer un essai de prévention de la diarrhée post-sevrage dans un contexte représentant l'infection naturelle. Effectivement, 75% des porcelets non traités et étant positifs pour les récepteurs de F4 ont développé une diarrhée aqueuse en 1 jour post-infection. Alors que l'ajout de poudre d'oeufs à l'alimentation des porcelets a permis de réduire les signes cliniques de diarrhée de 1 à 1,5 jours ainsi que la sévérité de celle-ci (1 score). Par contre, l'effet protecteur semble être présent tant en présence d'IgY spécifiques que non. En conclusion, le projet a permis de réaliser que l'ajout de poudre d'œuf enrobée à une moulée standard pourrait être une alternative novatrice en prophylaxie pour la prévention de la diarrhée post-sevrage. Toutefois, l'étude devra être continuée afin de déterminer le composant présent dans l'œuf entier ayant un effet de protection.

Mots clés

Immunoglobuline Yolk (IgY)

F4 (K88)

Infection expérimentale

Diarrhée post-sevrage

Aliment supplémenté pour porcelet

Immunsation

Anticorps spécifiques

Immunothérapie passive

Escherichia coli entérotoxigènes

Abstract

Enterotoxigenic *Escherichia coli* expressing F4 fimbrial adhesin is responsible for post-weaning diarrhea in piglets. Passive immunotherapy using chicken immunoglobulin IgY is an attractive alternative to antibiotics, the usual approach for treatment of the disease. The aim of the present study is to evaluate a prophylactic strategy using feed supplemented with anti-F4 IgY. This feed was tested in an experimental challenge of 80 post-weaned piglets following an optimization of the immunization procedure for yolk transfer of specific IgY. This optimization resulted in a mean increase of 480% in the quantity of specific IgY transferred to the yolk, using Cytosine-phosphate-Guanosin oligodeoxynucleotide to supplement incomplete Freund's adjuvant for immunization with F4, as compared to non-supplemented adjuvant. This egg powder was lipid microencapsulated to protect against the acid pH in the stomach and allow a controlled release in the small intestine. As observed by indirect ELISA, the supplemented feed was produced without any substantial loss in activity of IgY. A F4+ ETEC experimental challenge assay was set up to mimic natural infection. Seventy-five percent of F4 receptor-positive infected piglets developed diarrhea at one day post-challenge. Addition of microencapsulated egg powder to a pelleted commercial pig feed, allowed a reduction of clinical signs of diarrhea from 1 to 1.5 days in the duration of diarrhea and of 1 severity score. However, the protective effect seemed to be present whether the specific IgY were present or not in the egg powder. In conclusion, this project allowed the development of an innovative, cost-effective alternative, could be used for the prevention of postweaning diarrhea. However, the active component in eggs should be isolated and the strategy further evaluated in field studies.

Key words

Immunoglobulin Yolk (IgY)

F4 (K88)

Experimental challenge

Post-weaning diarrhea

Hens' immunization

Specific antibodies

Passive immunotherapy

Enterotoxigenic *Escherichia coli*

Pig's supplemented food

Table des matières

RÉSUMÉ	iv
ABSTRACT	v
TABLE DES MATIÈRES	vi
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES FIGURES	X
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xii
INTRODUCTION	1
RECENSION DE LA LITTÉRATURE	2
1. INFECTIONS INTESTINALES CHEZ LES PORCELETS EN PÉRIODE POST-SEVRAGE	3
2. <i>ESCHERICHIA COLI</i>	4
2.1. Généralités	4
2.2. PEPEC	6
2.3. STEC	7
2.4. ETEC	7
2.4.1. FACTEURS DE VIRULENCE ASSOCIÉS AUX ETEC	8
2.4.1.1. Toxines impliquées dans la diarrhée post-sevrage	8
2.4.1.1.1. Entérotoxine thermolabile (LT)	8
2.4.1.1.2. Toxine thermorésistante (ST)	9
2.4.1.1.2.1. STa	9

2.4.1.1.2.2. STb	9
2.4.1.1.2.3. East1	10
2.4.1.2. Fimbriae associés à la diarrhée post-sevrage	10
2.4.1.2.1. F18	10
2.4.1.2.2. F4	11
2.4.1.2.2.1. Récepteurs spécifiques de F4	15
3. REPRODUCTION EXPÉRIMENTALE DE LA DIARRHÉE POST-SEVRAGE	16
4. MÉTHODES DE CONTRÔLE ET DE PRÉVENTION DE LA DIARRHÉE POST-SEVRAGE CAUSÉE PAR LES ETEC	18
4.1. Antibiotiques	18
4.2. Probiotiques	19
4.3. Vaccins	20
4.4. Régie de production	21
4.4.1. ACIDIFICATION DES ALIMENTS	21
4.4.2. ZINC	22
4.4.3. PRODUITS LAITIERS	23
4.4.4. IMMUNOTHÉRAPIE PASSIVE	24
4.4.4.1. Plasma séché et pulvérisé	24
4.4.4.2. L'œuf séché et pulvérisé	25
4.4.4.2.1. Caractérisation des IgY	27
5. PRODUCTION D'IGY SPÉCIFIQUES	29
5.1. Adjuvants utilisés afin d'optimiser la production d'IgY spécifiques	31
5.1.1. $1\alpha,25$ -DIHYDROXIVITAMINE D3 ($1\alpha25(\text{OH})_2\text{D}_3$)	32
5.1.2. CpG-ODN	33
5.1.2.1. Inocuité chez les espèces animales	35
5.1.2.2. CpG-ODN chez la poule	36
6. UTILISATION DE LA POUDRE D'OEUF DANS LA PRÉVENTION DE LA DIARRHÉE POST-SEVRAGE	37

Article 1: Improvement of Adjuvant Systems to Obtain a Cost-Effective Production of High Levels of Specific IgY

Abstract	43
Introduction	44
Materials and Methods	45
Results and Discussion	48
Acknowledgment	51
References	52

Article 2: Evaluation of Microencapsulated Anti-F4 IgY as a Feed Supplement in the Prevention of Post-Weaning Escherichia coli Diarrhea in Pigs.

Abstract	58
Introduction	60
Materials and Methods	62
Results	68
Discussion	71
Conclusion	75
Acknowledgments	75
Literature cited	75

DISCUSSION ET CONCLUSION **83**

7. DISCUSSION **84**

8. CONCLUSION **89**

RÉFÉRENCES CITÉES **90**

Liste des tableaux

Tableau I)	Protéines impliquées dans la biosynthèse du fimbria F4.....	12
Tableau II)	Propriétés d'hémagglutination des variants de F4.....	14
Tableau III)	Matières retrouvées dans l'œuf entier.....	26
Tableau IV)	Adjuvants pour l'espèce aviaire	32

Article 2: Evaluation of Microencapsulated anti-F4 IgY as a Feed Supplement in the Prevention of Post-Weaning *Escherichia coli* Diarrhea in Pigs.

Table 1)	Composition of diets fed to pigs.....	78
Table 2)	Composition of treated groups	79
Table 3)	Multiplex PCR primers, PCR products and references for all the detected genes.....	79

Liste des figures

Figure 1.	Représentation schématique des étapes impliquées dans la pathogénèse des infections des différents pathotypes d' <i>Escherichia coli</i> chez les animaux	5
Figure 2.	Schéma représentant l'arrangement des gènes impliqués dans la biosynthèse des fimbriae F4	13
Figure 3.	Schéma représentant l'assemblage des protéines dans la biosynthèse des fimbriae F4..	14
Figure 4.	Schéma représentant une IgY	28
Article 1:	Improvement of Adjuvant Systems to Obtain a Cost-Effective Production of High Levels of Specific IgY	
Figure 1.	Mean number of eggs laid per week by hens after immunization.....	55
Figure 2.	Effect of supplementation of enterotoxigenic <i>E. coli</i> fimbrial adhesin F4 emulsified in incomplete Freund's adjuvant with CpG-ODN (F4-IFA-CpG group) or 1 α ,25(OH) $_2$ D3 (F4-IFA-D3 group) on specific anti-F4 IgY levels in the eggs of hens at different times after initial immunization	56

Article 2: Evaluation of Microencapsulated anti-F4 IgY as a Feed Supplement in the Prevention of Post-Weaning *Escherichia coli* Diarrhea in Pigs.

- Figure 1.** Remaining activity of anti-F4 IgY following incubation at different physiological pHs for various periods of time..... 80
- Figure 2.** Severity of diarrhea in F4R-positive pigs following challenge with an F4-positive ETEC strain..... 81
- Figure 3.** Proportion of F4R-positive pigs with diarrhea for each day after challenge with a F4-positive ETEC strain 82
- Figure 4.** Median bacterial counts of shedding of challenge F4-positive ETEC strain in the feces for F4R-positive pigs, in log 82

Liste des sigles et abréviations

ACF	Adjuvant complet de Freund
AIF	Adjuvant incomplet de Freund
AEEC	Attaching/effacing <i>Escherichia coli</i> (<i>Escherichia coli</i> Attachant/Effaçant)
BSA	Bovine serum albumin (Albumine du sérum bovin)
CCPA	Conseil Canadien de Protection des Animaux
CMH-II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe 2
CpG-ODN	Cytosine-phosphate-Guanosine oligodeoxynucleotide
CT	cholera toxin (toxine cholérique)
Dps	Diarrhée post-sevrage
EAggEC	Enteraggregative <i>Escherichia coli</i> (<i>Escherichia coli</i> entéroaggrégatif)
East1	Enteraggregative <i>Escherichia coli</i> heat stable toxin 1 (Toxine 1 résistante à la chaleur d' <i>Escherichia coli</i> entéroaggrégatif)
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods (Centre européen pour la validation des méthodes alternatives)
ETEC	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (<i>Escherichia coli</i> entérotoxigène)
F4R	Récepteur spécifique de F4
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (Facteur de stimulation des colonies de granulocyte-macrophage)
GP74	Intestinal neutral glycosphingolipid (Glycosphingolipide neutre intestinal)
HSA	Human serum albumin (Albumine du sérum humain)
Ig	Immunoglobuline
IKK	I κ B Kinase
IL-12	Interleukine 12
IL-6	Interleukine 6
IMTGP	Intestinal mucin-type sialoglycoprotein (Sialoglycoprotéine intestinale de type mucine)
INF α	Interféron alpha
INF β	Interféron bêta
INF-g	Interféron gamma
IRAK	Interleukin 1 Receptor Associated Kinase (Kinase associée au Récepteur de

	l'interleukine 1)
LEE	Locus of Enterocyte Effacement (Locus d'effacement des entérocytes)
LT	Heat-Labile toxin (Toxine thermolabile)
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase (Protéine kinase mitogène activée)
MyD88	Myeloid differentiation factor 88 (Facteur de différenciation myéloïde 88)
NK	Natural Killer cell (cellule tueuse naturelle)
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern (motif moléculaire associé aux pathogènes)
PBMN	Peripheral Blood Mononuclear cells (cellules mononucléaires circulant dans le sang)
PEPEC	Porcine Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> (<i>Escherichia coli</i> Entéropathogènes du porc)
PRR	Pattern recognition receptor (Récepteur de reconnaissance de motifs)
SDE	Spray-dried egg (œuf séché et pulvérisé)
SDEY	Spray-dried egg yolk (jaune d'œuf séché et pulvérisé)
SDPP	Spray-dried porcine plasma (Plasma porcin séché et pulvérisé)
STa	Heat Stable toxin « a » (toxine thermostable « a »)
STaP	Heat Stable toxin « a » porcine variant (toxine thermostable « a », variant porcin)
STb	Heat Stable toxin « b » (toxine thermostable « b »)
STEC	Shigatoxin producing <i>Escherichia coli</i> (<i>Escherichia coli</i> producteur de Shigatoxines)
TLR9	Toll-like receptor 9 (Récepteur « Toll-like » 9)
TNF-a	Tumor necrosis Factor alpha (Facteur alpha nécrosant les tumeurs)
TRAF6	TNF Receptor-Associated Factor 6 (Facteur 6 associé au TNF)
UFC	Unité formatrice de colonie

Introduction

Les infections intestinales causent de grands préjudices aux élevages porcins québécois, surtout au moment du sevrage des porcelets. *Escherichia coli* est une des principales bactéries impliquées dans ces infections, occasionnant un taux de mortalité élevé, de la diarrhée et une diminution du gain de poids. Parmi les *Escherichia coli* entérotoxigènes (ETEC), celles exprimant l'adhésine fimbriaire F4 sont les plus prévalentes dans les infections post-sevrage chez le porcelet et ce, mondialement. Annuellement, plusieurs millions de dollars sont dépensés afin de tenter de prévenir ce type d'infection ainsi que pour les traiter. Bien que l'immunisation passive des porcelets à l'aide d'immunoglobulines aviaires (IgY) anti-F4 soit déjà utilisée couramment à titre prophylactique, aucune preuve scientifique irréfutable n'a pu établir son efficacité à prévenir la diarrhée post-sevrage chez les porcelets.

Jusqu'à maintenant, les études sur le sujet se sont montrées contradictoires en plus d'être effectuées dans un contexte différent des élevages québécois. De plus, les IgY traditionnellement utilisés dans l'immunisation passive des porcelets sont, soit purifiés, soit présents dans de la poudre d'œuf sans qu'aucune protection ne leur soit appliquée afin d'empêcher leur dégradation en milieu gastrique acide. Cet effet mène à la nécessité d'utiliser une plus grande quantité d'Ig, ce qui augmente ainsi le coût de production d'une telle alternative aux antibiotiques pour la prévention de la diarrhée post-sevrage chez le porc.

Ce projet visait, dans un premier temps, à optimiser la production d'IgY chez la poule immunisée afin de compléter une moulée standard offerte aux porcelets, de façon la plus rentable qui soit. Dans un deuxième temps, à établir la protection apportée aux porcelets en période post-sevrage par cette nourriture complétée d'IgY anti-F4 enrobées, suivant une infection expérimentale par *Escherichia coli* entérotoxigène exprimant F4.

RECENSION DE LA LITTÉRATURE

1. Infections intestinales chez les porcelets en période post-sevrage

Parmi toutes les étapes à franchir pour la production d'une viande salubre, le moment du sevrage chez le porcelet est une période critique pour la santé et la survie des animaux. Effectivement, le stress occasionné par la séparation des porcelets de leur mère, le manque soudain d'immunoglobulines (Ig) maternelles, qui étaient jusque maintenant apportées par le colostrum et le lait (majoritairement des IgG et IgA, respectivement (Fairbrother, 1999)), ainsi que le changement de diète (Fairbrother, 2000), fragilisent grandement les animaux, les rendant donc plus susceptibles aux infections. De plus, en Amérique du Nord, les producteurs porcins optent pour le sevrage des animaux de 17 à 23 jours suite à leur naissance. Or, à cet âge, les porcelets n'ont pas l'immunité suffisamment développée, puisque leur production d'Ig n'est pas encore optimale (Gaastra et de Graaf, 1982), pour être en mesure de se protéger efficacement contre les bactéries pathogènes présentes dans leur environnement. Ces bactéries se retrouvent dans l'environnement par contaminations fécales (Fairbrother, 2000) et peuvent alors infecter les animaux, en suivant la route fécale-orale (Evans et Evans, 1996), via les aérosols, la nourriture, les autres animaux et même le personnel d'entretien (Evans et Evans, 1996; Fairbrother, 1999; Guillot et Lafont, 1989). Les facteurs prédisposants le développement des infections intestinales peuvent être reliés à un milieu contaminé dû à une désinfection inadéquate et à des conditions environnementales stressantes pour le porcelet, telles une température ambiante sous 25°C ou des courants d'air excessifs (Gyles et Fairbrother, 2004). Ces facteurs contribuent à la rétention des bactéries pathogènes dans l'environnement et à la réduction de l'activité péristaltique du porcelet, augmentant ainsi le délai d'excrétion des bactéries en plus d'une diminution de la vitesse du transit des anticorps protecteurs (Gyles et Fairbrother, 2004). Il y a également une baisse de production d'enzymes digestives, produisant ainsi un environnement favorable pour la multiplication rapide des bactéries (Gyles et Fairbrother, 2004). Ces facteurs favorisent l'excrétion des bactéries et la propagation rapide des bactéries entre les animaux d'un même troupeau et même entre les troupeaux, causant une perte importante à l'économie porcine.

Dès la naissance, l'intestin stérile des porcelets nouveaux nés est rapidement colonisé par des bactéries et, dès lors, *Escherichia coli* s'impose comme l'une des plus présentes, demeurant alors dans la flore normale de l'animal tout au long de sa vie. Ces bactéries sont majoritairement non-

pathogènes et généralement présentes à des concentrations variant de 10^7 à 10^9 organismes par gramme de fèces. Toutefois, lorsqu'elles acquièrent des facteurs de virulence, elles peuvent devenir pathogènes et ont alors un potentiel infectieux important pouvant provoquer des maladies diverses chez les animaux et causer de la diarrhée (Gyles et Fairbrother, 2004).

2. *Escherichia coli*

2.1. Généralités

Escherichia coli est un bacille à Gram négatif, anaérobie facultatif appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. Afin de permettre leur classification, les *E. coli* sont sérogroupés selon l'antigène somatique (l'antigène O), flagellaire (antigène H) et capsulaire (antigène K) qu'ils expriment. La spécificité de l'antigène O est déterminée par la séquence de ses chaînes polysaccharidiques du lipopolysaccharide (LPS) (Orskov et Orskov, 1992). Il existe 175 antigènes O différents identifiés jusqu'à maintenant et 53 antigènes H (Gyles et Fairbrother, 2004), où O149 est le sérotype le plus souvent associé à la diarrhée post-sevrage (dps) chez le porc (Frydendahl, 2002). La détermination de l'antigène K n'est plus effectuée de routine lors de la sérotypie, qui consiste plus en la détermination des antigènes O et H. Par ailleurs, l'antigène F (fimbriaire) est souvent déterminé lors de sérotypie, puisqu'il confère une information importante pour la caractérisation des souches en plus d'apporter une contribution essentielle quant à la pathogénicité de celles-ci (Gyles et Fairbrother, 2004).

Les maladies causées par *E. coli* chez le porc sont responsables de grandes pertes économiques en raison de la mortalité rapide, 5 à 9 jours après le sevrage (Svendsen et al., 1977), la perte importante de poids et du coût de la médication requise pour traiter les animaux atteints (Fairbrother, 2000). Le diagnostic de ce type d'infection chez les porcelets en période post-sevrage se fait initialement par l'observation des signes cliniques, soit une diarrhée jaune et fluide (Barker et al., 1993), une déshydratation (Andren et S., 1983) et une léthargie générale. Suite à la nécropsie de l'animal, il devient alors possible de noter les lésions histologiques et la présence de bactéries à Gram négatifs (*E. coli*) adhérentes à la muqueuse intestinale (Fairbrother, 2000). L'isolement de ces bactéries et subséquentement leur sérotypie ainsi que la détermination du pathotype (catégorisation des *E. coli* en fonction de leur pathogénicité) et du virotype (combinaison des facteurs de virulence) sont des outils importants pour l'identification des

bactéries ayant causées les signes cliniques observés (Fairbrother et al., 1994).

Chez les porcelets, la diarrhée est causée majoritairement par les ETEC (*Escherichia coli* entérotoxigènes) et les PEPEC (*Escherichia coli* entérotoxigènes porcins), tandis que la maladie d'œdème par les STEC (*Escherichia coli* producteurs des Shigatoxines) et les septicémies par les ETEC et les SEPEC (*Escherichia coli* septicémiques) (Blanco et al., 1997; Fairbrother, 2004; Fairbrother et al., 1994; Fairbrother, 2000). Le mécanisme d'action des différents pathotypes d'*E. coli* est schématisé à la figure 1.

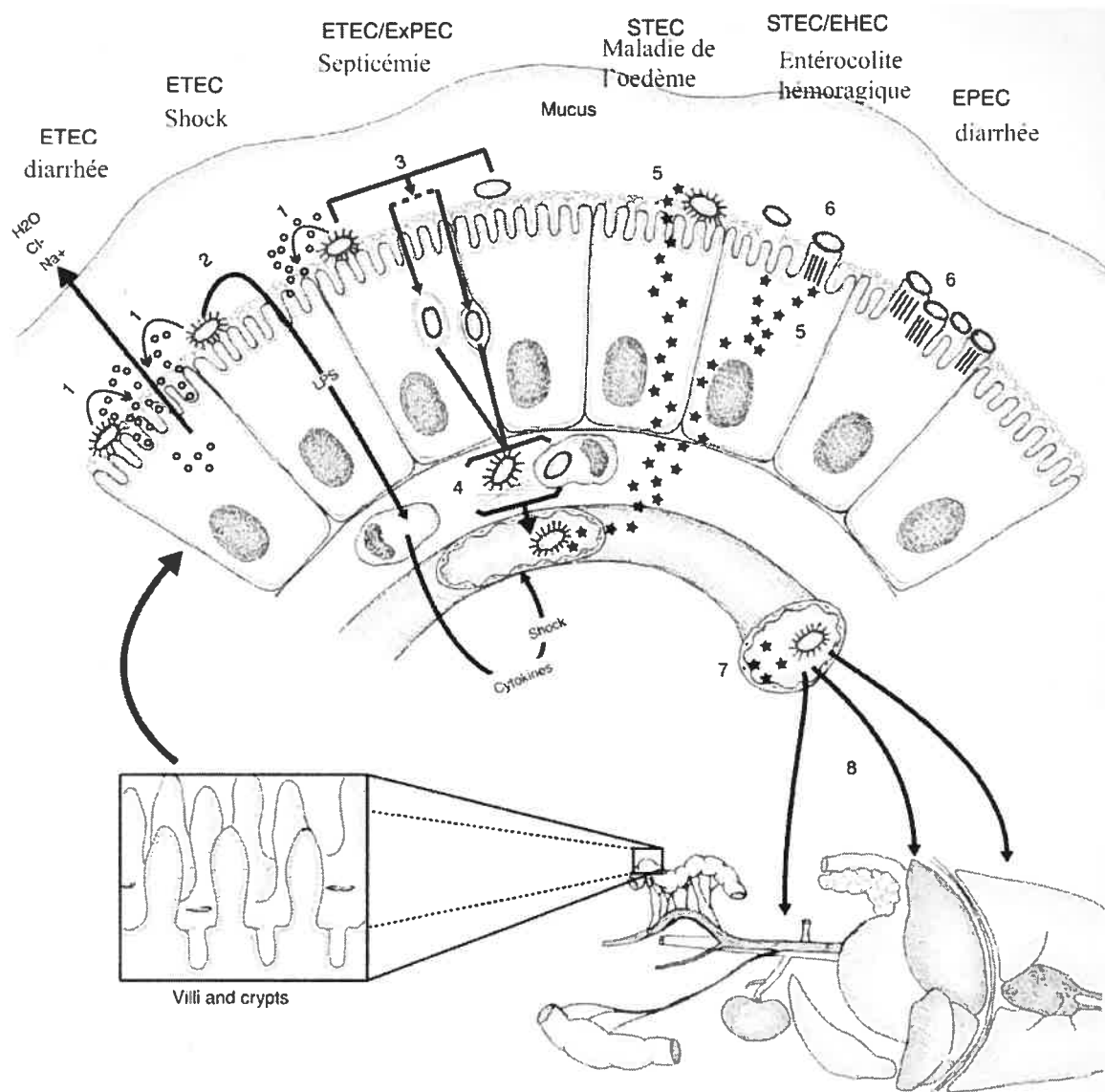


Figure 1. Représentation schématique des étapes impliquées dans la pathogénèse des infections des différents pathotypes d'*Escherichia coli* chez les animaux. (1) L'adhérence des ETEC à l'épithélium du petit intestin menant à la production d'entérotoxines, qui stimulent la sécrétion d'eau

et d'électrolytes au niveau de la lumière intestinale. (2) Les lipopolysaccharides sont relâchés par les ETEC et passent à travers l'épithélium et stimulent les macrophages à produire des médiateurs qui vont agir sur l'endothélium vasculaire et ainsi produire un « shock ». (3) Les ETEC et ExPEC peuvent passer à travers ou entre les cellules épithéliales pour pénétrer dans la circulation sanguine et (8) être disséminées vers les organes extra-intestinaux. (4) Ces bactéries peuvent adhérer aux protéines de la matrice extracellulaire et peuvent alors résister à l'effet bactéricide du complément et des phagocytes. (5) Les STEC (*E. coli* exprimant le fimbriae F18 causant la maladie d'oedème chez le porc) produisent la cytotoxine Stx, qui passe via les cellules épithéliales et entre dans la circulation sanguine (7) pour agir sur l'endothélium vasculaire à des sites cibles. (6) Les STEC et EPEC s'attachent intimement aux cellules épithéliales et induisent un réarrangement des fibres d'actine menant à la formation d'un attachement en forme de piédestal. Tiré et adapté de Gyles et Fairbrother, (2004).

2.2. PEPEC

Les PEPEC (Porcine enteropathogenic *Escherichia coli*, en anglais) induisent des lésions de type attachant/effaçant (A/E) et font donc partie de la catégorie d'*E. coli* appelée AEEC (Attaching/effacing *Escherichia coli*, en anglais). Les gènes codant pour les protéines impliquées dans la formation des lésions A/E sont regroupés à l'intérieur d'un îlot de pathogénicité, nommé LEE (locus of enterocyte effacement, en anglais). La protéine Tir est transloquée à la surface de la cellule hôte via un système de sécrétion de type III. Le gène *eae* code pour une intimine de 94 kDa (Nataro and Kaper, 1998), qui interagit avec son récepteur Tir, pour créer l'attachement intime de la bactérie à la cellule hôte (Campellone et Leong, 2003). Cet attachement, qui est précurseur des lésions, crée un réarrangement au niveau du cytosquelette, notamment par une accumulation d'actine polymérisée sous la bactérie menant à l'effacement des microvillosités et à la formation de la structure en piédestal. Le mécanisme par lequel les PEPEC induisent la diarrhée n'est pas très bien compris pour le moment. Toutefois, il a été avancé que la perte des propriétés absorbantes des microvillosités dans les lésions A/E pourrait conduire à la diarrhée par manque d'absorption (Nataro et Kaper, 1998). La diarrhée pourrait aussi être provoquée par l'augmentation de la perméabilité des jonctions serrées entre les cellules épithéliales, à cause de la réponse inflammatoire aux sites de la lésion ou à la sécrétion d'ions chlore suivant la migration des leukocytes polymorphonucléaires (Gyles et Fairbrother, 2004). Les sérogroupes majoritairement retrouvés chez les PEPEC sont O45, O103 et O108.

2.3. STEC

Les STEC (Shigatoxin producing *Escherichia coli*, en anglais) colonisent l'intestin des porcelets et produisent une ou plusieurs toxines (Stx, anciennement appelées vérotoxines, ou Shiga-like toxins) qui transitent jusqu'au sang, menant à la création de la maladie de l'œdème chez les porcelets infectés. Cette toxine endommage les parois vasculaires (Fairbrother, 1999), ce qui serait probablement la cause de l'œdème observé (Barker et al., 1993). Cette maladie se caractérise par le développement de signes nerveux, une diarrhée aqueuse accompagnée parfois de sang vers la fin de l'infection (Fairbrother, 1999), une détresse respiratoire, une incapacité de l'animal à se lever et finalement la mort de celui-ci dans 100% des cas (Barker et al., 1993). À la nécropsie, il est possible de constater des lésions caractéristiques de l'œdème dans l'intestin. Toutefois, elles ne sont pas toujours observables, surtout si l'animal a souffert d'une forte diarrhée. La prévalence d'infection à STEC n'est pas très élevée en Amérique du Nord (Barker et al., 1993). Toutefois, il est nécessaire de tenter de prévenir ce type d'infection, car lorsqu'on observe les signes cliniques, la maladie est déjà trop avancée (Fairbrother, 1999) pour que l'administration d'antibiotiques soit efficace. Les sérogroupes majoritairement retrouvés chez les STEC sont O138, O139 et O141.

2.4. ETEC

Annuellement, les ETEC (Enterotoxigenic *Escherichia coli*, en anglais) sont responsables de la moitié de la mortalité des porcs mondialement, équivalant à 5 millions d'animaux (Walters et Sellwood, 1982), soit par mort soudaine ou, habituellement, des suites d'une diarrhée aqueuse (dps, pour diarrhée post-sevrage) (Fairbrother et al., 2005). La pathogénèse d'une infection à ETEC comporte cinq étapes (Fairbrother, 2004):

- 1-Adhérence des bactéries aux cellules épithéliales;
- 2-Colonisation de la muqueuse jéjunale et iléale;
- 3-Production d'entérotoxines;
- 4-Flux d'eau et d'électrolytes dans la lumière intestinale;
- 5- Diarrhée aqueuse.

Cette diarrhée est souvent accompagnée de déshydratation et de dépression de la part des animaux (Fairbrother, 1999). Les porcelets sont susceptibles d'être atteints de diarrhée dans les 14 premiers jours suivant le sevrage (Hardy, 2003), mais il est très rare que l'infection se manifeste avant le 3^e jours post-sevrage (Cardinal, 2002). La perte en eau corporelle occasionnée

par la diarrhée amène les cochons infectés à se désintéresser de leur nourriture et de l'abreuvement (Krsnik et al., 1999), menant à un pic de mortalité dans les 6 à 10 jours suivants l'infection (Fairbrother, 1999). Dans certains cas, les animaux pourront manifester des symptômes plus tard, jusqu'à 4 à 8 semaines après le sevrage (Fairbrother et al., 2005). Puisque les porcelets mangent et boivent très peu suite à l'infection, le traitement doit obligatoirement être effectué parentéralement (Fairbrother, 1999). Les sérogroupes majoritairement retrouvés chez les ETEC sont O8, O9, O71, O115, O138, O141, O149 et O157.

2.4.1. Facteurs de virulence associés aux ETEC

La prochaine section décrit les principaux facteurs de virulence associés aux ETEC et ainsi impliqués dans la diarrhée post-sevrage.

2.4.1.1. Toxines impliquées dans la diarrhée post-sevrage

Les entérotoxines induisent la sécrétion d'eau et d'électrolytes dans la lumière intestinale, provoquant alors une diarrhée aqueuse ainsi qu'un épisode aiguë de déshydratation (Fairbrother, 2000; Gaastra et de Graaf, 1982). Les animaux peuvent également mourir rapidement sans signe clinique apparent. Les combinaisons d'entérotoxines les plus souvent retrouvées dans les souches d'*E. coli* associées aux infections post-sevrage sont LT^+STb^+ et $LT^+STa^+STb^+$ (Fairbrother, 2000).

2.4.1.1.1. Entérotoxine thermolabile (LT)

La toxine LT est oligomérique et possède 80% d'homologie avec la toxine de *Vibrio cholerae* (CT, pour cholera toxin, en anglais). Elle est composée d'une sous-unité A (28 kDa) et de cinq sous-unités B (11,5 kDa). Les sous-unités B sont arrangées en rond et se lient avec une très forte affinité à un ganglioside, GM1 ($Gal\beta 1-3GalNAc\beta 1-4(NeuAc\alpha 2-3)Gal\beta 1-4Glc\beta 1-1ceramide$) présent à la surface des cellules épithéliales intestinales, laissant ainsi pénétrer la sous-unité A. Celle-ci est alors clivée en deux peptides (A_1 et A_2). Le peptide A_1 active alors l'adénylate cyclase, ce qui a pour effet d'augmenter l'AMPc intracellulaire, résultant en la sécrétion des ions Cl^- à partir des cryptes des cellules épithéliales et inhibition de la réabsorption du NaCl par les villosités. Donc, l'augmentation des ions dans la lumière intestinale augmente le passage passif d'eau expliquant l'induction de la diarrhée aqueuse (Popoff, 1998).

2.4.1.1.2. Toxine thermorésistante (ST)

Il s'agit de petites toxines monomériques contenant plusieurs résidus cystéines, formant des ponts disulfures, leur conférant une résistance à la chaleur. Effectivement, ces toxines peuvent demeurer actives suite à une ébullition de 15 minutes.

2.4.1.1.2.1. STa

Le variant porcine de la toxine STa (STaP) est un peptide de petit poids moléculaire (approximativement 2 kDa) qui consiste en 18 acides aminés créant 3 liens disulfures. STaP se lie à son récepteur, la guanylate cyclase C, qui est situé à la partie apicale de la membrane des cellules épithéliales intestinales. Cette liaison stimule l'activité guanylate cyclase et augmente la GMPc intracellulaire, ce qui stimule la sécrétion d'ions Cl^- et inhibe la réabsorption de NaCl , menant à la sécrétion de fluides intestinaux (Popoff, 1998), créant une diarrhée aqueuse. STa, généralement en association avec d'autres entérotoxines, est souvent associée à la dps chez les porcelets (Fairbrother et al., 2005). Effectivement, Noamani et al. (2003) ont trouvée *EstA*, le gène codant pour STa, dans 92% des isolats ETEC O149 provenant de cas de dps en Ontario.

2.4.1.1.2.2. STb

STb est un peptide de 48 acides aminés (5,4 kDa) créant 2 ponts disulfures et synthétisé sous forme de précurseur. Bien qu'appartenant à la même famille de toxine que STa, STb ne possède pas d'homologie avec cette dernière et est retrouvée uniquement dans les ETEC chez le porc. Malgré que le mécanisme exact menant à la diarrhée n'est pas encore élucidé, le sulfatide a été identifié comme le récepteur fonctionnel de STb (Beausoleil et al., 2002; Labrie et al., 2001; Rousset et al., 1998). Celui-ci est retrouvé au niveau des cellules intestinales cibles. Suite à la liaison de STb à son récepteur, il y a augmentation de la concentration calcique intracellulaire via l'ouverture d'un canal calcium couplé aux protéines G. Ceci aboutit à la stimulation subséquente de la synthèse de prostaglandine E2 et de sérotonine, deux sécrétagogues connus pour induire la sécrétion d'eau et d'électrolytes au niveau du duodénum et du jéjunum. D'autre part, l'augmentation du Ca^{2+} induite par STb conduit à l'ouverture d'un canal chlore également impliqué dans l'induction de la diarrhée. Dans un autre ordre d'idée, STb est une toxine formant des pores et a été récemment montrée comme étant capable d'être internalisée à l'intérieur de la cellule. Ceci se fait via deux voies, l'une Clathrine-dépendante aboutissant au recyclage de la toxine vers les fibrilles de fibronectine, l'autre Caveolae-dépendante aboutissant à son accumulation au niveau du réticulum endoplasmique (Penel et al., manuscrit en préparation).

Cependant, la cible intracellulaire de cette toxine ainsi que sa fonction demeure inconnue à ce jour.

2.4.1.1.2.3. East1

Initialement identifiée chez les souches *E. coli* entéroagrégatifs (EAaggEC), East1 (Enteraggative *Escherichia coli* heat stable toxine 1, en anglais) est une toxine maintenant reconnue pour avoir été associée à plusieurs reprises aux diarrhées porcines à ETEC. Effectivement, dans une étude portant sur le virotype de souches isolées de cas de dps, 22.7% des souches possédaient le gène *astA*, codant pour East1 (Choi et al., 2001). En plus d'être associée à plusieurs autres toxines, East1 est parfois associée avec l'adhésine fimbriaire F4, malgré que les deux gènes se retrouvent sur deux plasmides indépendants (Yamamoto et Nakazawa, 1997). En effet, 16% des souches ETEC isolées de porcelets diarrhéiques exprimaient F4 et East1 simultanément (Choi et al., 2001). East1, un petit peptide codée par le gène *estA1* et qui contient 2 ponts disulfures, active la guanylate cyclase, au même titre que STa (Savarino et al., 1996). Toutefois, le rôle de East1 dans l'induction de la diarrhée n'a pas encore été défini, probablement à cause des difficultés entourant sa production et sa purification.

2.4.1.2. Fimbriae associés à la diarrhée post-sevrage

Les souches ETEC causant des diarrhées aux porcelets en post-sevrage peuvent exprimer divers fimbriae. Un fimbria est un appendice composé d'un assemblage de protéines radiant à la surface bactérienne, de diamètre variable (3-7 nm) et se retrouvant en quantité variable sur les bactéries (100-1000). Les fimbriae peuvent être différents morphologiquement, biologiquement ainsi qu'antigéniquement en fonction des souches bactériennes. Chez les ETEC, les fimbriae F4 et F18 sont le plus souvent associés à la dps (Fairbrother et al., 2005). Ils peuvent lier les cellules épithéliales intestinales grâce à une action d'adhésine. F18 se retrouve associé aux souches causant la diarrhée chez les porcelets sevrés, tandis que F4 est associé à la diarrhée en période pré- et post-sevrage (Fairbrother et al., 2005).

2.4.1.2.1. F18

F18 est un long fimbria flexible en forme caractéristique de zigzag (Nagy et al., 1997). F18 est présent sous deux formes antigéniques, F18ab et F18ac. Ce fimbria est peu exprimé *in vitro* et est majoritairement retrouvé chez les souches ETEC (F18ac) ou STEC (Wittig et al., 1995). Le fimbria F18 médie l'adhésion à l'épithélium intestinal de porcs âgés de plus de 3 semaines, et non

aux animaux plus jeunes (Fairbrother et al., 2005), puisque son récepteur n'est pas complètement exprimé chez ces animaux (Nagy et al., 1992). La fréquence d'association de F18 avec la dps varie énormément en fonction du lieu et de la région géographique (Amezcuca et al., 2002; Frydendahl, 2002; Osek, 1999; Post et al., 2000). Au Québec, il existe seulement une faible proportion de souches ETEC exprimant F18 (Fairbrother, 2000).

2.4.1.2.2. F4

Parmi les souches ETEC causant des infections chez les porcelets en post-sevrage, celles exprimant F4 ont la plus forte prévalence mondialement (Flores-Abuxapqui et al., 1997; Rapacz et Hasler-Rapacz, 1986). Effectivement, dans une étude récente, F4 a été retrouvé dans 44,7% des isolats provenant de cas de dps porcine (Frydendahl, 2002), comparativement à 39,3% pour F18. F4 est un fin filament polymérique flexible se retrouvant à plusieurs centaines de copies à la surface des ETEC uniquement (Fairbrother et al., 1994) dont la sous-unité majeure a un poids moléculaire de 27 500 Da (Kehoe et al., 1981). Son diamètre moyen est de 3,0 nm (Jacobs and Graaf, 1985). F4 est encodé par des gènes sur un gros plasmide d'environ 70 kb (Kehoe et al., 1981), qui permet l'expression de 10 protéines (tableau I) regroupées en un opéron (figure 2), qui s'assemblent comme le schématise la figure 3. La production des fimbriae a une prédominance pour les conditions naturelles. Effectivement, F4 est synthétisé à 37°C, alors qu'ils ne le sont pas sous des températures de 18°C, (Gaastra et de Graaf, 1982; Jones et Rutter, 1972) indiquant sa nécessité à être synthétisé dans l'intestin plutôt que dans l'environnement.

Il existe 3 variants antigéniques de F4, soit F4ab, F4ac et F4ad, où la région antigénique « a » est la portion conservée. Chacun des variants exhibe une spécificité unique en regard de leurs caractéristiques d'hémagglutination (voir tableau II). La différence d'adhésion de F4ab et F4ac est attribuable à des acides aminés particuliers sur leur sous-unité majeure, FaeG (Sun et al., 2000; Bakker et al., 1992). F4ac est le variant antigénique prédominant retrouvé actuellement dans des cas de diarrhées porcines dans le monde (Alexa et al., 2001; Choi et Chae, 1999). Effectivement, la colonisation par les ETEC se fait le plus souvent par les bactéries exprimant l'adhésine F4ac et occasionnellement F4ab et F4ad (Fairbrother, 2000; Sun et al., 2000), tandis que F4ab n'est pas souvent associé à la dps de source naturelle (Francis et al., 1999).

Tableau I) Protéines impliquées dans la biosynthèse du fimbria F4

Protéines	Fonctions
FaeA	Régulation ⁵
FaeB	Régulation ⁵
FaeC	Lie la membrane externe directement, sans interaction avec FaeE, uniquement lorsque la membrane contient FaeD ⁴ Première protéine à interagir avec FaeD dans la biosynthèse de F4 ⁴ Se retrouve au sommet de la fimbria
FaeD	Situé dans la membrane externe et est impliqué dans la translocation des sous-unités fimbriaires à travers la membrane ³ , en formant une sorte de pore ³⁻⁴ Fonction d'ancrage de la fimbria dans la membrane externe
FaeE	Protéine périplasmique, présente en homodimère, protéine chaperonne ² Sous forme hétérotrimère avec FaeG, FaeH et FaeI (protection contre la dégradation protéolytique)
FaeF	Rôle dans la biosynthèse (initiation et/ou élongation), mais pas dans l'adhésion ¹ , 2 ^e molécule à être ajoutée après FaeC
FaeG	Sous-unité majeure, site d'adhésion ¹ La partie C-terminale est impliquée dans la spécificité des différents variants de F4 ²
FaeH	Rôle dans l'élongation, mais pas dans l'adhésion ¹
FaeI	Pas de rôle dans la biosynthèse, ni dans l'adhésion ¹
FaeJ	Pas de rôle dans la biosynthèse, ni dans l'adhésion ¹

Références: ¹ - (Bakker et al., 1992)

² - (Bakker et al., 1992)

³ - (Harms et al., 1999)

⁴ - (Mol et al., 2001)

⁵ - (Van den Broeck et al., 2000)

Lors de l'entrée dans le système digestif porcin, les ETEC exprimant F4 (ETEC F4+) adhèrent à la paroi intestinale, via la liaison spécifique à un récepteur. Cette adhérence est essentielle à leur virulence et leur permet de coloniser la surface épithéliale du petit intestin, alors que les ETEC F4- se retrouvent aléatoirement distribués dans la lumière intestinale (Jones et Rutter, 1972) et y sont expulsés par le péristaltisme et l'excrétion. Les bactéries qui sont attachées à l'épithélium intestinal délivrent leurs toxines en haute concentration près des récepteurs de celles-ci sur la membrane des cellules intestinales. L'association rapprochée prévient donc la perte d'activité des toxines due à la dégradation par les enzymes et les substances chimiques qui se trouvent dans les fluides mucosaux (Beachey, 1981). L'adhérence et la colonisation des cellules épithéliales, étapes essentielles à l'infection, sont suivies par une prolifération qui mène à une grande population bactérienne menant à l'observation des signes cliniques ou non, selon le degré de colonisation (Gaastra et de Graaf, 1982).

Figure 2. À droite, schéma représentant l'arrangement des gènes impliqués dans la biosynthèse des fimbriae F4. Les gènes sont représentés par les boîtes, la description des gènes se trouve dans les boîtes et le poids moléculaire des protéines est en kDa. Se référer au tableau I pour connaître la fonction des gènes. Tiré de (Van den Broeck et al., 2000).

Les ETEC F4+ lient uniquement le pôle apical des entérocytes et non les cellules indifférenciées des cryptes (Cox et al., 1988). Bien que l'adhésion se fasse majoritairement dans la partie médiane et postérieure de l'intestin porcin soit, le jéjunum et l'iléon (Jones et Rutter, 1972), c'est la région antérieure qui est la plus susceptible aux effets entérotoxiques. Toutefois, dès le début des ces effets, les régions médiane et postérieure de l'intestin deviennent rapidement sensibles (Gaastra et de Graaf, 1982).

Les trois variants antigéniques, qui possèdent des épitopes conformationnels, forment des liaisons carbohydrates avec leur récepteur, un glycoconjugué, qui est présent sur les cellules épithéliales intestinales, dans le mucus intestinal et sur les globules rouges (voir tableau II) (Erickson et al., 1994). Les trois variants n'ont pas seulement une différence antigénique, mais également une différence dans la liaison spécifique avec le récepteur, où certains porcelets sont susceptibles à tous les variants, d'autres à seulement deux des trois, d'autres à seulement un sur les trois tandis que certains sont résistants à la liaison par les trois variants (Francis et al., 1999).



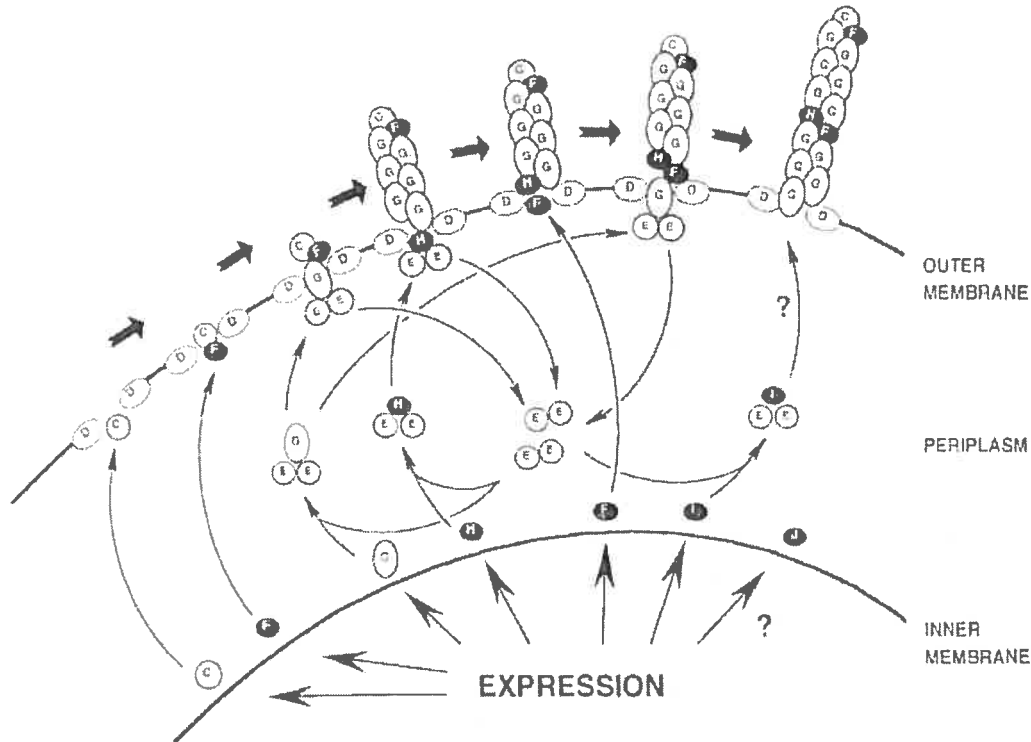


Figure 3. Schéma représentant l'assemblage des protéines dans la biosynthèse des fimbriae F4. C;D;E;F;G;H;I et J réfèrent à FaeC-FaeJ. La description des protéines impliquées dans cet assemblage se retrouve au tableau I. Tiré de (Van den Broeck et al., 2000).

Tableau II) Propriétés d'hémagglutination des variants de F4*

Origine des érythrocytes	Variants antigéniques		
	ab	ac	ad
Cobaye	++	+	++
Poule	++++	-	-
Cochon	++	-	++++
Rat	++	-	++
Lapin	++	++	++
Hamster			
<i>C. cricetus</i>	++	-	-
<i>M. auratus</i>	-	++++	-

Légende : +/- : Rapidement élué, agglutination faite sur glace
 ++ : Agglutination stable sur glace
 +++ : Élué, agglutination faite à température pièce
 ++++ : Agglutination stable à température pièce
 *Adapté de : (Bakker et al., 1992)

2.4.1.2.2.1. Récepteurs spécifiques de F4

Le gène codant pour le récepteur de F4 (F4R) se trouve sur le chromosome 13 (Guerin et al., 1993). La quantité de récepteurs varie énormément le long du tractus digestif, où elle est maximale au niveau du jéjunum. Les récepteurs spécifiques à F4 n'ont pas été retrouvés au niveau du caecum ni du gros intestin (Chandler et al., 1994). Il semblerait qu'un galactose en position terminale jouerait un rôle dans la reconnaissance de l'adhésine à son récepteur (Grange et al., 2002).

La différence dans l'adhésion des variants de F4 à la bordure en brosse est due à la présence de variants au niveau des récepteurs (Francis et al., 1999). Bien que plusieurs molécules aient été identifiées comme récepteurs de F4 durant les dernières années (voir la revue effectuée par Jin et al., (2000)), Van den Broeck et al. (2000) ont décrit le modèle le plus récent de récepteurs de F4 (récepteurs *bcd*, *bc*, *b* et *d*). Ce modèle correspond à 6 phénotypes différents permettant de les regrouper en fonction de l'adhésion différentielle des variants de F4 à la bordure en brosse. Le récepteur *bcd* est proposé comme étant une collection de glycoprotéines (45-70 kDa). Le récepteur *bc*, avait initialement été identifié comme étant deux glycoprotéines (210 et 240 kDa) (Erickson et al., 1992). Par la suite, ce récepteur s'est révélé être une sialoglycoprotéine, de type mucine, de la bordure en brosse (Erickson et al., 1994) (IMTGP, pour intestinal mucin-type sialoglycoprotein, en anglais) Sun et al. (2000), lie F4ab et F4ac). Le récepteur *b* a été identifié comme une glycoprotéine de 74 kDa (Grange et Mouricout, 1996), appartenant à la famille des transferrines et étant associé à la bordure en brosse (GP74, pour intestinal transferrin, en anglais, lie F4ab). Le récepteur *d* fut identifié plus récemment comme une glycosphingolipide de la bordure en brosse avec une masse moléculaire inconnue (IGLad, pour intestinal neutral glycosphingolipid, en anglais, lie F4ad) (Grange et al., 1999; Francis et al., 1999).

Certains porcelets ne possèdent pas les récepteurs de F4 sur leur bordure en brosse. Par conséquent, ces animaux sont résistants à l'infection par des souches ETEC F4+. Ces animaux expriment un complexe glycoprotéique analogue, qui ne lie pas les fimbriae F4. Il semblerait que la différence des deux complexes repose sur une différence génétique de la partie glycosyl du complexe, provoquant ou non la susceptibilité aux ETEC F4+, c'est-à-dire que l'épitope spécifique permettant la liaison de F4 serait absent (Jeyasingham et al., 1999) dans le complexe analogue au récepteur. La résistance à l'infection vient d'une transmission Mandélienne simple

d'un locus avec deux allèles, où la présence du récepteur est dominante. On retrouve alors trois génotypes possibles, soit « ss » (n'impliquant pas d'adhésion d'où la résistance à l'infection), soit « SS » ou « Ss » (impliquant l'adhésion d'où la sensibilité à l'infection) (Sellwood et al., 1975). Dans le premier groupe, les ETEC F4+ ne sont pas capables de s'attacher aux cellules de la bordure en brosse et sont, par conséquent, rapidement expulsés du tractus digestif, impliquant la résistance à l'infection par ces bactéries. Dans le second groupe, les ETEC F4+ peuvent s'attacher via leur récepteur spécifique et se multiplier pour atteindre un grand nombre dans l'intestin. Puisque l'attachement du fimbria à son récepteur est l'évènement initiant la pathogénèse de la dps, le blocage de cet attachement éliminerait la susceptibilité à la maladie pour l'animal (Francis et al., 1999).

Récemment, un test « DNA marker-based test » (Jorgensen et al., 2004) a permis le génotypage de la résistance/sensibilité des ETEC F4+. Le génotypage, à l'aide d'un échantillon sanguin, de parents par cette méthode, a permis de détecter efficacement le génotype susceptible à l'infection par ETEC F4+ chez les porcelets (Jensen et al., 2006), permettant une meilleure utilisation des animaux lors de la reproduction de l'infection en milieu contrôlé.

3. Reproduction expérimentale de la diarrhée post-sevrage

Afin d'évaluer la pathogénèse et de tester les méthodes de prévention et les traitements applicables à la dps, il est essentiel d'arriver à reproduire l'infection expérimentalement. Or, jusqu'à maintenant, les études se sont heurtées à la difficulté de reproduire la dps comme celle observée dans des conditions naturelles.

Plusieurs facteurs semblent influencer la reproduction de l'infection en milieu contrôlé. Parmi ceux-ci, il est possible de noter l'état de santé initial des animaux, la charge bactérienne infectante, la voie d'administration, la durée de l'expérience, le nombre et la fréquence des infections ainsi que la virulence de la souche infectante utilisée.

Madec et al. (2000) ont induit une diarrhée pour une courte période (durée moyenne de 1,7 jours) chez environ 50% des 124 porcs infectés suite à une infection expérimentale de 10^8 UFC (unité formatrice de colonies) à 10^{12} UFC ETEC F4+:LT+:STa+:STb+, alors que 56% des porcs à l'étude étaient F4R+. La diarrhée est survenue rapidement (parfois quelques heures après

l'inoculation) et pouvait durer de 1 à 7 jours. Il faut noter que l'utilisation d'une charge bactérienne infectante importante (eg. 10^{12} UFC), a induit la mortalité de 10 des 16 porcs à l'étude.

Sarmiento et al. (1988) ont réussi à induire une diarrhée représentant celle rencontrée en élevage. Effectivement, 47% des porcelets à l'étude ont développé la diarrhée en 1 à 2 jours suivant l'inoculation avec 10^{10} UFC de la souche M1823B, F4+ :LT+ :STb+ :H43. Seulement 3 des 44 porcelets à l'étude sont décédés suite à l'infection, alors que les porcelets survivants ont développé une diarrhée durant 3 à 4 jours.

Jensen et al. (2006) ont réussi à induire la diarrhée la première journée post-infection à 74% des porcelets F4R+ infectés suite à une inoculation de 10^9 UFC d'une souche ETEC O149 : F4ac suivant une administration de bicarbonate afin d'augmenter le pH gastrique et ainsi améliorer la survie des bactéries pathogènes. Toutefois, le modèle expérimental proposé peut devenir fastidieux puisque les auteurs proposent d'infecter les animaux jusqu'à deux fois par jours durant quatre jours, ou jusqu'à l'obtention de diarrhée.

Des études récentes ont rapporté l'usage d'un pré-traitement à l'aide d'antibiotique (colistine) précédent l'infection expérimentale, afin d'éliminer toute contamination initiale des animaux. Toutefois, malgré ce traitement préalable, aucun porcelet n'a développé de diarrhée suite à une inoculation de 10^{10} UFC ETEC F4+ (Verdonck et al., 2005).

Un des enjeux dans la reproduction expérimentale de la dps est la présence d'anticorps lactogènes ou l'exposition préalable des animaux avec des souches ETEC, ce qui pourrait empêcher l'induction de la maladie. Il est donc important d'effectuer une bonne vérification de la santé des animaux à l'étude. Cependant, il est reconnu depuis plusieurs années déjà (Cox et al., 1991) que dans certains cas, des porcelets F4R+ sans antécédent de maladies intestinales auxquels on administre du bicarbonate préalablement à l'infection expérimentale (O149 : F4ac), ne développent pas de diarrhée.

4. Méthodes de contrôle et de prévention de la diarrhée post-sevrage causée par les ETEC

Afin de diminuer les pertes économiques et tenter d'améliorer le sort des animaux d'élevage, plusieurs stratégies sont utilisées afin de contrer les manifestations de la dps causée par les ETEC.

4.1. Antibiotiques

L'antibiothérapie est un outil puissant utilisé pour traiter individuellement les porcelets infectés par les ETEC, ainsi que pour contrôler certains pathogènes d'une population. Toutefois, lorsque l'infection s'est propagée à une majorité d'animaux, l'administration massive d'antibiotiques, même aux animaux sains, est souvent effectuée, permettant ainsi de réduire l'excrétion par les animaux infectés ainsi que de diminuer le risque d'infection de ceux qui ne le sont pas (Morrison et Deen, 2003). De plus, puisque les méthodes de pratique actuelles n'incluent que pas toujours un diagnostic précis de la cause des infections, les doses d'antibactériens utilisées peuvent être sublétales pour les bactéries en cause. De telles pratiques favoriseraient la sélection des bactéries multirésistantes, ce qui pourrait expliquer que l'efficacité des antibiotiques généralement utilisés pour traiter les infections à *E. coli* dont l'ampicilline, l'apramycine, la gentamicine, la néomycine, la tétracycline, entre autres, a diminué grandement au cours des dernières années (Carlander et al., 2000; Docic et Bilkei, 2003; Fairbrother, 2000) et ce, particulièrement chez les ETEC O149:K91 (Maynard et al., 2003). D'ailleurs, une souche résistante à tous les antibiotiques communément utilisés pour le traitement de la dps a été découverte en Ontario il y a quelques années (Fairbrother, 2000). Parmi tous les isolats de *E. coli* chez le porc, ceux provenant de dps montrent le plus grand taux de résistance aux agents antimicrobiens (Fairbrother et al., 2005). De plus, l'utilisation d'antibiotiques en agriculture fait craindre la présence de résidus chimiothérapeutiques dans la viande (Spyridon et Morrison, 2003).

Certains des antibiotiques sont aussi utilisés comme facteur de croissance (Morrison et Deen, 2003) à des dosages sous-thérapeutiques, à raison de 5 à 50 ppm (Guillot et Lafont, 1989), en fonction de l'antibiotique choisi. À ces doses, ils permettent d'apporter une amélioration de l'état sanitaire, de la vitesse de croissance et de l'efficacité alimentaire. Le Danemark a éliminé

progressivement, à partir de décembre 1999, tous les antimicrobiens utilisés à cet escient. La résistance de certaines souches bactériennes a alors diminuée, sans avoir d'effet notable au niveau des performances des porcs en engraissement. Toutefois, pour les porcelets en pouponnière, il en fut autrement, indiquant qu'il manque encore des méthodes de contrôle et de prévention adéquates pour cet âge critique (Pettigrew, 2003).

Bien que la conjugaison semble être un des mécanismes d'acquisition de résistance, il existe également une propagation de la résistance aux antibiotiques hors du contexte de leur utilisation en élevage porcin (Belloc et al., 2003). En vue de ce qui précède et de la complexité des circonstances de l'apparition et de la persistance des résistances aux antibiotiques, un consensus pour réduire l'utilisation de ceux-ci en élevage a été établi (Spyridon et Morrison, 2003), menant donc au développement de techniques alternatives dans le contrôle des infections bactériennes.

4.2. Probiotiques

Les probiotiques sont des produits contenant des micro-organismes spécifiques, en quantité suffisante pour être capables de croître chez un individu, permettant un effet positif sur la santé de l'hôte en inhibant la croissance des pathogènes (Jin et al., 2000; Solano-Aguilar et al., 2003; Spyridon et Morrison, 2003). *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Enterococcus* sont les bactéries les plus souvent utilisées à cet escient (Solano-Aguilar et al., 2003). L'ajout de ces microorganismes vivants non-pathogènes à la diète peut modifier positivement la balance fragile de la flore intestinale d'un porcelet en post-sevrage, empêchant une répercussion négative sur sa croissance (Tournut, 1989) et amener un bénéfice pour sa santé (Spyridon et Morrison, 2003). Toutefois, il est essentiel que les probiotiques soient capables de: moduler la réponse immunitaire, induire une réponse immunitaire localisée, compétitionner pour les nutriments ou les récepteurs dans le tractus intestinal, ou encore de produire des substances antimicrobiennes dans le but de promouvoir la santé de l'hôte (Solano-Aguilar et al., 2003; Spyridon et Morrison, 2003). Les probiotiques peuvent être administrés oralement sous forme liquide, de pâtes ou plus rarement, incorporés dans l'aliment (Tournut, 1989).

Puisque chaque probiotique est différent, il est difficile de conclure à l'efficacité ou non de ce type de traitement tant que plusieurs études n'auront pas été menées sur le sujet (Pettigrew, 2003). Néanmoins, Jin et al. (2000) ont démontré que *Enterococcus faecium* (18C23) pouvait

inhiber la liaison de *E. coli* F4+, parce qu'il se lierait probablement à un domaine du récepteur de F4 dans le mucus intestinal des porcelets. Cependant, l'ajout volontaire de micro-organismes vivants à l'alimentation ne fait pas l'unanimité de la communauté scientifique. Il est donc envisageable que plusieurs pays puissent se doter d'une législation empêchant une telle utilisation.

4.3. Vaccins

Il existe différents types de vaccins administrés soit à la truie ou aux porcelets afin de prévenir les infections à ETEC. Par exemple, les truies immunisées avec l'antigène fimbraire F4 purifié, transmettent, via le colostrum et le lait, la propriété de neutralisation des ETEC F4+ (Rutter et al., 1976). Un tel vaccin administré à la truie gestante résulte en une réponse de l'immunité humorale et le transfert d'anticorps spécifiques dirigés contre F4 dans le colostrum (Beachey, 1981). Toutefois, l'immunité passive transmise via le colostrum et le lait ne protège le porcelet que pour un court laps de temps suite au sevrage. De plus, puisque l'immunité du porcelet est encore en développement et qu'il est, par conséquent, incapable de produire des quantités d'Ig permettant sa protection, l'immunisation active du porcelet n'a pas une efficacité accrue suite au sevrage (Gaastra et de Graaf, 1982). Effectivement, Snoeck et al. (2003) ont démontré que des porcelets en post-sevrage ne peuvent pas être protégés d'une infection à ETEC F4+ par leur vaccination avec des fimbriae F4 purifiés.

Pour optimiser la prévention de la dps, la vaccination doit activer l'immunité mucoale et induire une réponse IgA et IgM spécifique de l'antigène administré (Bianchi et al., 1996; Van den Broeck et al., 1999). Or, chez les porcelets, l'intestin est le principal producteur de ces Ig. Effectivement, les plaques de peyers ont été identifiées récemment comme étant le principal site d'induction de la réponse immunitaire aux fimbriae F4 lors d'une infection ETEC (Huyghebaert et al., 2005). Ainsi, certains chercheurs tentent d'enrober les fimbriae F4, afin de les protéger contre l'acidité de l'estomac lors d'une administration par voie orale et permettre une livraison directement au niveau intestinal, en évitant leur dégradation préalable à leur entrée dans l'intestin (Calinescu et al., 2005; Huyghebaert et al., 2005).

La stratégie vaccinale actuelle inclut également l'immunisation orale des porcelets avec les bactéries vivantes d'une souche non-toxinogène de *E. coli* exprimant un fimbria précis. Ce type

de vaccin peut être administré dans l'eau d'abreuvement des porcelets en post-sevrage, permettant la colonisation intestinale par les bactéries ainsi que l'induction locale d'Ig, qui bloqueront l'adhérence des souches pathogènes de *E. coli* et ainsi empêcherait le développement de la diarrhée (Fairbrother et al., 2005). Cette approche semble être efficace pour le contrôle de la dps due aux ETEC exprimant les fimbriae F4 et F18 (Fuentes et al., 2004). Toutefois, la colonisation par la souche non-toxinogène pourrait être empêchée par l'immunité lactogénique chez les porcelets fraîchement sevrés (Fairbrother et al., 2005).

4.4. Régie de production

La régie de production inclue les gestes effectués tous les jours par les producteurs. Il est évidemment question de désinfection efficace, du respect des normes de biosécurité en vigueur et de l'alimentation adéquate donnée aux animaux. Effectivement, le succès d'un sevrage réside en d'excellentes conditions sanitaires, des règles de biosécurité strictes et l'usage d'une diète complexe incluant des ingrédients contenant une riche source d'Ig (Harmon et al., 2002). D'où l'importance d'une alimentation bien supplémentée et bien équilibrée afin d'offrir aux porcelets les meilleures performances possibles.

La voie d'administration la plus simple pour traiter les porcelets d'élevage et ainsi prévenir les infections chez ces animaux, est évidemment la voie orale. Or, la moulée de démarrage des porcelets au Canada est souvent administrée sous forme de moulée cubée (de l'anglais, pelleting). On retrouve donc sur le marché une vaste gamme de moulées en cubes supplémentées avec diverses substances. Il est donc important de déterminer si les substances à incorporer à la nourriture résisteront aux températures, humidité, la friction ainsi que la coupe des cubes à la grosseur voulue.

4.4.1. Acidification des aliments

L'acidification des aliments est un procédé qui est beaucoup plus utilisé en Europe qu'en Amérique du Nord (Pettigrew, 2003). La prévention contre la diarrhée apportée par l'acidification à l'aide d'acides organiques, a longtemps été associée avec le fait que les bactéries pathogènes, en général, prolifèrent moins bien en milieu acide. Il est maintenant reconnu qu'en plus d'abaisser le pH stomacal, les acides organiques non-ionisés ont un pouvoir antimicrobien

important. Toutefois, chaque acide organique a une action propre envers les bactéries impliquées, notamment la perturbation de leur membrane cellulaire, l'inhibition de leurs fonctions métaboliques fondamentales, la modification de leur pH interne et l'accumulation d'anions toxiques dans la bactérie. Au Québec, les producteurs peuvent se procurer des produits acidifiants (le plus souvent il s'agit d'un mélange d'acides organiques et inorganiques tel l'acide fumarique, acide citrique, acide orthophosphorique, acide malique, acide phosphorique et autres) sous formes diverses (e.g. : libre, poudre, liquide ou protégé dans l'aliment) et peuvent l'utiliser dans l'eau d'abreuvement. La protection des acides organiques permet d'apporter ceux-ci jusqu'à l'intestin sous une forme non-ionisée, pour être libérée à proximité des bactéries, dont on veut contrôler le développement (Gauthier, 2002) en plus d'utiliser des quantités réduites tout en obtenant des résultats optimaux.

4.4.2. Zinc

Le zinc est un oligo-élément essentiel à la plupart des fonctions biologiques des animaux, notamment au niveau de l'expression des gènes, de la stabilisation de la structure des protéines et de la réplication cellulaire. En raison de sa faible absorption par l'intestin porcin (moins de 20% de la quantité ingérée) (Poulsen et Larssen, 1995), l'apport de zinc des matières premières seules ne permet pas de couvrir les besoins du porc. Une carence en zinc provoque des anomalies structurelles et physiques se manifestant par la perte d'appétit, la diarrhée, le retard de croissance et la parakératose (Scott, 1972). Puisque son seul apport prévient et guérit ces troubles, l'addition de zinc dans les compléments alimentaires est donc nécessaire et généralement utilisée. De plus, le zinc, administré sous forme d'oxyde de zinc, est utilisé pour lutter contre les diarrhées non spécifiques, augmentant ainsi la prise de poids des animaux (Hardy, 2003; Mavromichalis et al., 2000). Afin de palier à sa faible absorption et puisqu'à faible dose (200 ppm) le zinc n'a pas d'effet sur la croissance des animaux, les moulées sont supplémentées de routine avec de fortes concentrations en zinc (plus de 2000 ppm) (Chauvel, 2000). Cependant, le zinc inorganique utilisé à 2000-3000 ppm est considéré comme une cause de pollution environnementale dans certains pays (Hardy, 2003), puisque la majorité de la dose administrée est rejetée dans les fèces (Case et Carlson, 2002), sans être assimilée.

La raison de l'augmentation du poids des porcs suite à une addition alimentaire de zinc est inconnue. Il semblerait qu'elle soit reliée à l'augmentation de la métallo-thionine, un régulateur

de l'homéostasie du zinc (Carlson et al., 1999; Mercer et Grimes, 1986). L'effet du zinc sur la croissance ne semble dépendre ni de la biodisponibilité du zinc ni du type de celui-ci (organique ou inorganique) (Case et Carlson, 2002; Mavromichalis et al., 2000). D'un autre côté, l'effet anti-diarrhéique de l'oxyde de zinc ne réside pas en sa capacité à empêcher la croissance des *E. coli* F4+ (Hardy, 2003; Roselli et al., 2003). Roselli et al. (2003) émettent plutôt l'hypothèse que l'effet du zinc serait dû à sa possibilité à lier les fimbriae, les empêchant alors de se fixer à leurs récepteurs spécifiques.

Parallèlement, il est connu que les porcelets sevrés hâtivement (avant 21 jours) et traditionnellement (28 jours) ont besoin d'être nourris avec une dose pharmacologique de zinc, sous forme d'oxyde de zinc, pour une période de deux semaines suivant immédiatement le sevrage. Le gain de poids observé est le même chez les porcelets nourris pendant une période de deux ou quatre semaines. Ceci suggère que la durée optimale de supplémentation idéale ne serait que de deux semaines (Carlson et al., 1999), comparativement aux quatre semaines de supplémentation en zinc généralement offerte aux porcelets suivant leur sevrage. Cette réduction en apport de zinc pourrait réduire de moitié les rejets dans l'environnement, sans compromettre la croissance des animaux.

Hardy (2003) propose de remplacer l'apport excessif en oxyde de zinc par du sulfate de cuivre à 125 ppm, qui inhibe 75% de la croissance des *E. coli*, en plus d'augmenter la croissance des porcs. Il faut toutefois noter, que leur effet n'est pas synergique. Effectivement, en présence de zinc, l'effet du cuivre s'annule (Chauvel, 2000).

4.4.3. Produits laitiers

Les produits laitiers sont utilisés comme supplément depuis 1970, étant une source de protéines et de lactose. Ceux-ci encouragent la prolifération de certaines bactéries dans le tractus digestif, telles les *Lactobacillus*, entre autres. L'effet de prévention est donc dû à l'augmentation de la flore intestinale (Pettigrew, 2003).

4.4.4. Immunothérapie passive

Un apport constant en immunoglobulines (Ig) aux porcelets permet d'augmenter la quantité de nourriture ingérée, de diminuer la fréquence de la diarrhée et d'améliorer leur performance (Harmon et al., 2002). Ainsi, dans la dernière décennie, l'immunothérapie passive s'est imposée comme une méthode alternative très intéressante dans la prévention des maladies infectieuses. Effectivement, l'immunothérapie passive consiste en l'apport externe d'anticorps dirigés spécifiquement contre un antigène afin de protéger l'hôte contre une infection potentielle. La présence des Ig est alors transitoire et il n'existe pas d'effet mémoire lié à ceux-ci. Il est donc important d'assurer un apport constant tout au long de la période de susceptibilité des animaux. Bien que l'administration des Ig se faisait par voie systémique à la création de la technique, celle-ci s'est raffinée pour devenir sous forme orale (Larsson et Carlander, 2003). L'immunothérapie passive est une méthode de choix dans les stratégies de prévention des infections à ETEC F4+. Effectivement, de la même façon que procède les Ig maternelles, l'administration orale d'Ig, dirigées spécifiquement contre une adhésine bactérienne pourrait empêcher l'adhésion intestinale de la bactérie. Toutefois, la méthode s'est heurtée à quelques inconvénients, empêchant sa commercialisation à grande échelle, tels que le coût et la difficulté de production d'anticorps en grande quantité (Shin et al., 2002a). Afin de palier à ce problème, plusieurs sources d'anticorps spécifiques ont été utilisées comme traitement, notamment les IgG humains, des anticorps monoclonaux de souris, du colostrum bovin ou porcin, du plasma porcin séché et pulvérisé ainsi que des IgY aviaires (Larsson et Carlander, 2003).

4.4.4.1. Plasma séché et pulvérisé

Le plasma séché et pulvérisé (SDPP pour spray-dried porcine plasma, en anglais) est offert en additif alimentaire comme source de protéines et d'Ig, afin d'augmenter la croissance des porcelets en post-sevrage en plus de réduire leur susceptibilité aux infections gastro-intestinales (Campbell et al., 2003). Les porcelets nourris avec SDPP consomment plus de nourriture, menant à une augmentation plus rapide de leur croissance, comparativement à ceux nourris à partir de protéines végétales (Jiang et al., 2000a; van der Peet-Schwering et al., 1996), puisque l'efficacité de la conversion alimentaire des protéines est augmentée (Jiang et al., 2000b). Bosi et al. (2001) rapportent qu'une diète contenant du SDPP a protégé les animaux F4R+ contre une infection à ETEC F4+, a augmenté leur prise de poids, a réduit l'excrétion des bactéries pathogènes et entraîne une réduction de la réponse inflammatoire des porcs.

Le SDPP contenant des Ig spécifiques contre certains pathogènes, offre une meilleure protection contre ceux-ci comparativement à une préparation SDPP ne contenant pas d'Ig spécifique (Bosi et al., 2001). Effectivement, une étude récente démontre une augmentation du gain de poids des animaux ainsi qu'une diminution de la fréquence de la diarrhée chez les porcelets sevrés hâtivement (10 jours d'âge) et nourris avec une nourriture supplémentée avec du SDPP (Owusu-Asiedu et al., 2002). Ces effets ont été partiellement attribués à la présence d'Ig spécifique anti-ETEC dans la préparation de SDPP.

Toutefois, il s'agit d'une stratégie coûteuse (Nollet et al., 1999) et puisqu'il s'agit d'un sous-produit d'origine animale, au même titre que les farines de viande et de graisse animale, il est envisageable que le SDPP soit interdit dans plusieurs pays. En novembre 2000, l'Union européenne a banni l'utilisation des farines de viande et de graisse animale pour l'ensemble des animaux d'élevage (Marouby, 2000) à cause de la possibilité de transmission d'encéphalopathie spongiforme.

4.4.4.2. L'œuf séché et pulvérisé

Jaune d'oeuf

Le jaune d'œuf séché et pulvérisé (SDEY, pour spray-dried egg yolk, en anglais) contenant des anticorps anti-F4, bloque l'adhésion *in vitro* des ETEC F4+ 10^9 UFC, même si dilué jusqu'à 100 fois. Toutefois, la poudre de jaune d'œuf n'arrive pas à déloger les bactéries une fois adhérentes, ce qui indique l'incapacité de la technique pour une utilisation thérapeutique. Donc, l'effet du SDEY est dépendant de la dose et fonction de la concentration bactérienne (Jin et al., 1998). L'effet *in vitro* est probablement dû à l'agglutination des bactéries, ce qui peut possiblement prévenir la division cellulaire et la croissance bactérienne (Shimizu et al., 1988).

Bien que les résultats de réduction des signes cliniques de la dps ont toujours été associés à la présence d'IgY spécifiques dans ces préparations, une découverte récente semble indiquer que d'autres substances pourraient avoir un effet semblable (Kassaify et al. 2005). Il devient donc très intéressant d'utiliser l'œuf entier, plutôt que seulement le jaune, parce que le lysozyme et certains composants de haut poids moléculaire se trouvant dans l'albumen pourrait avoir une relation avec l'effet anti-adhésif des bactéries associé à l'utilisation des œufs en alimentation porcine.

Oeuf entier

Plusieurs raisons peuvent expliquer l'utilité d'oeuf entier séché et pulvérisé (SDE, pour spray-dried egg, en anglais) dans la prévention de la dps. Par exemple, l'oeuf est une source accessible de plusieurs nutriments, ce qui lui vaut la réputation de l'aliment le plus complet au monde (tableau III). Effectivement, SDE peut constituer une excellente alternative au SDPP dans l'aliment de démarrage pour les porcelets en post-sevrage, autant comme source d'Ig (Harmon et al., 2002), que comme source protéinique pour augmenter la croissance des porcs. Ainsi, le SDE peut être une source fiable d'Ig pour la prévention, par immunothérapie passive, des infections intestinales à ETEC. Effectivement, il est très facile d'orienter la réponse immunitaire d'une poule contre un antigène particulier, ce qui résultera en la production d'une grande quantité d'IgY spécifique de celui-ci. Puisqu'il n'existe que 8 acides aminés de différence dans le site de liaison des 3 variants de F4 (Sun et al., 2000), les IgY dirigées spécifiquement contre F4ac réagissent de façon croisée avec F4ab et F4ad (Fang et al., 2000). Il est donc possible de bloquer l'adhérence des ETEC exprimant chacun des 3 variants de F4 en utilisant seulement des Ig dirigées contre F4ac. Il faut également noter que l'utilisation d'IgY comme source d'Ig spécifiques est beaucoup plus valorisée depuis quelques années, en raison du raffinement éthique procuré par l'utilisation de la poule plutôt que les autres espèces animales traditionnellement utilisées pour ce type de production (Larsson et al., 1998; Schade et al., 1996). Effectivement, les Ig sont transférées dans les oeufs, limitant les manipulations invasives sur les animaux. De plus, la poule produit une quantité d'Ig pouvant correspondre à 30 fois celle d'un lapin, sur une période annuelle (Hatta et al., 1993).

Tableau III) Substances retrouvées dans l'oeuf entier*

Substances	Unités	Quantités
Protéines	%	48,00
Lysine	%	3,72
Méthionine/Cystéine	%	2,79
Thréonine	%	2,23
Tryptophane	%	0,74
Matières grasses	%	28,00
Énergie métabolisable	kcal/lb	2285,70
Phosphore	%	0,80
IgY	ppm	12000

*Adapté de (Harmon et al., 2002)

4.4.4.2.1. Caractérisation des IgY

Les IgY ont été caractérisées pour la première fois en 1969 et puisqu'elles ne ressemblaient à aucune Ig mammifères connues, Leslie et Clem (1969) les ont nommées IgY. Ces immunoglobulines Yolk sont produites dans la bourse de Fabricius (Weill et Reynaud, 1987) et sont les Ig majoritaires produits par les espèces ovipares. Ce sont des Ig systémiques, plutôt que mucosales, de faible poids moléculaire, retrouvées également dans le contenu duodéal et trachéal des espèces aviaires. De plus, elles sont retrouvées en grande quantité dans le jaune d'œuf, afin de participer à la formation d'un système immunitaire humoral fonctionnel chez le poussin (Carlander, 2002). Le transport actif des Ig du sérum de la poule vers le jaune de l'œuf est analogue au transport trans-placentaire des Ig chez les mammifères (Carlander, 2002; Carlander et Larsson, 2001). Ce transport s'effectue en fonction de la concentration des IgY dans le sérum (Larsson et Carlander, 2003). Il ne se produit ni destruction ni sélection lors de ce transport (Carlander, 2002; Larsson et Carlander, 2003). En effet, les récepteurs sur l'oocyte lient toutes les IgY du sérum de la poule et les dirigent vers l'œuf (Larsson et Carlander, 2003). Ainsi, la poule produit et excrète environ de 100 à 400 mg d'Ig dans un œuf, ce qui correspond à 10-20 mg/mL d'œuf (Carlander, 2002). De cette quantité, environ 10% est spécifique de l'antigène injecté (NeuralNotes, 1996). Toutefois, ce ratio dépend de l'individu, de la procédure d'immunisation et de l'immunogénicité de l'antigène (Cardinal, 2002). Une poule pond environ 250 œufs par année (Hatta et al., 1993). Ces œufs, si récoltés quotidiennement et manipulés avec soin, peuvent être entreposés à 4°C pour une période allant jusqu'à un an (NeuralNotes, 1996) sans perte d'activité. Il faut également noter que les IgY purifiées ont démontré une stabilité accrue pour une période pouvant atteindre 10 ans à 4°C (Larsson et al., 1999), ou 6 mois à la température pièce (Larsson et al., 1991).

Les IgY sont les immunoglobulines responsables de plusieurs fonctions biologiques chez la poule. Elles sont notamment l'équivalent fonctionnel des IgG mammifères, puisqu'elles sont associées aux mêmes fonctions, en plus d'effectuer les fonctions des IgE mammifères. La région Fc est responsable de la fixation au complément et de l'opsonisation (Carlander, 2002; Larsson et Carlander, 2003). D'un point de vue phylogénétique, les IgY pourraient être les ancêtres des IgA mammifères à cause de leur similarité antigénique (Hadge et Ambrosius, 1984). Les chaînes lourdes des IgY ont un poids moléculaire supérieur à celles des IgG, tandis que les chaînes légères ont un poids inférieur à leur homologue mammifère (Sun et al., 2001) (figure 4). Bien que longtemps confondues avec les IgG mammifères, les IgY ne démontrent pas de réactions croisées

sérologiques avec ces Ig, indiquant une grande différence antigénique entre elles. En effet, le degré de réactions croisées sérologiques entre deux protéines homologues est directement relié à leur niveau de ressemblance entre leurs séquences en acides aminés (Hadge et Ambrosius, 1984). Zhao et al. (2000) ont démontré que la région constante des chaînes lourdes des IgY est localisée sur le chromosome E18C15W15.

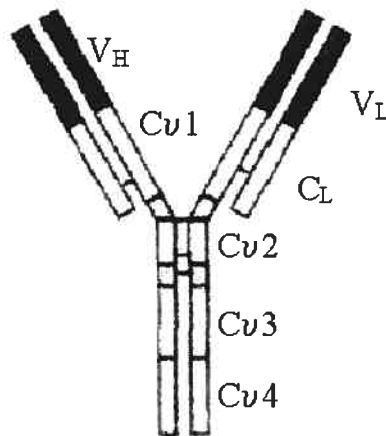


Figure 4. Schéma représentant une IgY. Les IgY sont constituées de deux chaînes lourdes (65 105 Da) et deux chaîne légères (18 660 Da). Chaque chaîne lourde (H) est composée de quatre domaines constants (C_v1-C_v4) et un domaine variable (V). Les chaînes légères (L) inclues un domaine constant et un domaine variable. La région C_v2 est probablement une forme condensée de la région charnière des IgG (Schade et al., 1996; Sun et al., 2001).

En plus d'être avantageuses pour l'immunothérapie passive, les IgY sont également avantageuses en diagnostique puisqu'elles parviennent à empêcher certaines réactions indésirables, qui sont souvent à la base de faux-positifs dans les tests immunologiques. En effet, les IgY n'activent pas le complément (Carlander et Larsson, 2001), empêchent l'interaction avec le facteur rhumatoïde (Larsson et al., 1991), empêchent l'interaction avec le HAMA (Human Anti-Mouse IgG Antibodies) (Larsson et Mellstedt, 1992) et n'interagissent pas avec les récepteurs bactériens de Fc (Carlander, 2002). De plus, les IgY procurent un avantage important puisqu'ils ont une forte activité immunitaire et aide à l'élimination de la trame de fond dans les ELISA, les RIA, la cytométrie de flux et en immunohistochimie (Larsson et al., 1999; Olovsson et Larsson, 1993).

Par contre, puisque les IgY n'ont pas de région charnière, ils ont moins de facilité à précipiter l'antigène spécifique qu'une IgG, requérant donc une plus grande quantité pour le même effet (Schade et al., 1996).

5. Production d'IgY spécifiques

En immunothérapie passive, il est avantageux que les IgY soient produites en grande quantité et à faible coût tout en limitant au minimum la manipulation des oiseaux servant à leur production. La section suivante décrit les principes d'immunisation des poules pondeuses afin d'obtenir des Ig spécifiques ainsi que les nouveaux développements dans le domaine.

Il est essentiel de porter une attention particulière à la préparation et l'administration du composant injecté lors d'une immunisation, puisque la survie des poules, le taux de ponte et la quantité d'IgY produites y sont fortement liés (Shin et al., 2002b). C'est pour cette raison, que le «European Centre for Validation of Alternative Methods» (ECVAM) (Schade et al., 1996) et le Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA) (CCAC, 2002) ont émis des recommandations quant à l'utilisation des poules pondeuses pour la production d'Ig. À ce titre, il est recommandé d'immuniser les poules à raison de 2 sites d'injection, et d'y administrer entre 0,5 et 1 mL de liquide par site. Il est conseillé de procéder à une immunisation intramusculaire dans les muscles de la poitrine ou sous-cutanée au niveau du cou. Toutefois, la voie d'injection intramusculaire est préférable chez la poule puisque ceci résulte en une spécificité antigénique presque 10 fois supérieure à celle obtenue suite à une injection par la voie sous-cutanée (Carlson et al., 1999; Chang et al., 1999; Jeyasingham et al., 1999; Krsnik et al., 1999). Les poules pondeuses peuvent être immunisées à l'aide de bactéries vivantes, de toxines, de bactérines, ou de protéines de la membrane externe bactérienne (Chang et al., 1999; Shin et al., 2002b) ou encore avec des facteurs de virulence spécifiques. Les poules doivent être âgées d'un minimum de 7 semaines lors de la première immunisation. Toutefois, la maturité sexuelle de la poule, correspondant au début de la ponte, survient environ de 18 à 21 semaines d'âge (Losonczy et al., 2000). Il est donc rare d'immuniser les poules avant leur 18^e semaine de vie. Les poules peuvent être immunisées durant toute la période de ponte, soit environ un an, à condition que les titres d'Ig spécifiques se maintiennent assez hauts. La fréquence des immunisations est relative au type d'adjuvant ainsi qu'à la dose d'antigène administrée (voir la section adjuvant du présent ouvrage

à ce sujet). On devrait minimalement immuniser deux fois les poules et leur administrer un rappel d'antigène lorsqu'on détecte une chute du titre d'Ig spécifiques (Schade et al., 1996). Puisque l'immunité acquise des poules peut être modulée en fonction de facteurs environnementaux tels que la nutrition, le stress et l'âge de l'oiseau (Gustafsson et al., 1994) et qu'il est également essentiel d'établir les conditions idéales permettant d'optimiser la quantité d'œufs produits annuellement ainsi que la quantité d'IgY spécifiques transférées dans ceux-ci, l'ECVAM a établi les six recommandations suivantes pour la régie des poules :

- Garder les animaux à l'intérieur sans tenter de reproduire les conditions extérieures;
- Restreindre le contact des animaux avec le personnel ayant des contacts avec des poulaillers commerciaux afin de limiter la propagation d'agents infectieux;
- Minimum de 2 poules par cage afin de favoriser la sociabilité;
- Utilisation de poules certifiées libres de pathogènes puisque les Ig sont destinées à un usage thérapeutique;
- L'utilisation de poules pondeuses commerciales est adéquate; cependant, pour obtenir de meilleurs résultats, il faudrait avoir recours à une lignée génétique reconnue pour son haut titre d'anticorps. Il est également recommandé d'utiliser des poules Leghorns, puisqu'elles pondent des œufs plus gros (NeuralNotes, 1996);
- Il est préférable d'immuniser les poules avant qu'elles ne commencent à pondre parce que leur manipulation pourrait influencer négativement la ponte (Shin et al., 2002b).

La variation de la quantité d'IgY transférée dans l'œuf d'un jour à un autre pour un même individu est très faible, comparativement à la différence inter-individuelle. Il est donc essentiel d'effectuer un suivi rapproché du plus grand nombre d'animaux possible. D'autre part, la quantité d'IgY spécifiques produite par une poule ne baisse pas à la fin du cycle de ponte et il n'existe pas de corrélation entre le nombre d'œufs produit par poule et la concentration d'IgY par œuf (Carlander et al., 2001). Finalement, il est important d'optimiser les procédures d'immunisation des poules afin d'utiliser la plus petite quantité possible d'antigènes (Larsson et al., 1998). Larsson et al. (1998) ont induit la production d'anticorps spécifiques dans l'œuf avec aussi peu que 1 µg d'albumine bovine (BSA, pour Bovine Serum Albumin, en anglais).

Pour l'immunisation de poules avec des antigènes bactériens, plusieurs molécules immunogènes peuvent être identifiées. Cependant, l'administration de certaines de ces molécules chez la poule

ne résulte pas en une réponse immunitaire suffisante pour induire la production en masse d'anticorps. L'utilisation d'un adjuvant est donc souhaitable pour activer les cellules T, qui contrôlent l'immunité spécifique.

5.1. Adjuvants utilisés afin d'optimiser la production d'IgY spécifiques

Un adjuvant est un composé ou une association de composés capable d'augmenter ou de moduler la réponse spécifique envers un antigène. Il n'existe pas d'adjuvant parfait qui pourrait servir à toutes les sortes d'immunisations, il est donc nécessaire d'en développer plusieurs et d'optimiser leur utilisation (Audibert et Lise, 1993). Il est désirable de trouver des nouveaux adjuvants qui induisent une réponse sélective appropriée mais en possédant une faible toxicité permettant leur utilisation en formulations vétérinaires (Lima et al., 2004).

L'adjuvant complet de Freund (ACF), qui contient des mycobactéries tuées, procure une très forte réponse immunitaire spécifique suite à une immunisation avec un antigène. Par contre, la présence de ces micro-organismes cause une réaction inflammatoire sévère au site d'injection (Wanke et al., 1996). Par conséquence, son utilisation au Canada a été fortement déconseillée par le CCPA (CCAC, 2002). L'adjuvant incomplet de Freund (AIF) est maintenant utilisé par la plupart des chercheurs comme standard pour la production d'anticorps spécifiques. Ce dernier ne contient pas de mycobactéries et, comme l'ACF, est un adjuvant huileux formant un dépôt au site d'injection, protégeant ainsi l'antigène et permettant sa relâche à une fréquence relativement lente, stimulant ainsi constamment le système immunitaire. Chez la poule, il semble qu'il y a peu de variation dans la production d'Ig spécifiques suite à l'utilisation d'ACF ou d'AIF (Schade et al., 1996). Par contre, il est désirable d'induire une réponse immunitaire supérieure permettant la production d'une plus grande quantité d'Ig spécifiques. Ainsi, différentes stratégies, soit de combinaison ou de formulation d'adjuvants, ont été essayées dans le but d'atteindre la formation d'un dépôt, le recrutement, le ciblage et l'activation/conditionnement des cellules présentatrices de l'antigène en présence de l'antigène désiré, et ce afin d'induire une réponse immunitaire plus généralisée, particulièrement avec une forte réponse cellulaire (Lima et al., 2004). Le tableau IV regroupe quelques exemples d'adjuvants pouvant être utilisés chez la poule.

Tableau IV) Adjuvants pour l'espèce aviaire

Adjuvant	Référence
Adjuvant Complet de Freund*	(CCAC, 2002)
Adjuvant Incomplet de Freund	(CCAC, 2002)
Specol	(Larsson and Carlander, 2003; Leenaars et al., 1994)
TiterMax	(Larsson and Carlander, 2003), (CCAC, 2002)
Pam3-Cys-Ser(Lys) ₄	(Larsson and Carlander, 2003)
1 α , 25-dihydroxyvitamin D ₃ **	(Van der Stede et al., 2003; Van Der Stede et al., 2004)
CpG-ODN**	(CCAC, 2002)

* L'adjuvant complet de Freund ne doit être utilisé que lorsqu'on a démontré que les autres adjuvants sont inefficaces (CCAC, 2002).

** Adjuvants pouvant être utilisés seuls ou en addition avec un adjuvant huileux (e.g. AIF).

5.1.1. 1 α ,25-dihydroxivitamine D₃ (1 α 25(OH)₂D₃)

Le métabolite actif de la vitamine D₃, 1 α 25(OH)₂D₃, est une hormone stéroïde lipophile. Cette molécule était traditionnellement associée avec l'homéostasie du calcium. Elle exerce son action en se liant à son récepteur nucléaire spécifique (nVDR) (Bouillon et al., 1995). La découverte de ce récepteur sur plusieurs cellules immunitaires (e.g. monocytes, macrophages, cellules dendritiques (Adorini et al., 2001) ainsi que lymphocytes B et T (Lemire et al., 1984; Morgan et al., 1999) suggère un rôle dans le système immunitaire. Ainsi, son rôle en tant qu'adjuvant est beaucoup étudié présentement.

Une étude récente suggère un usage possible de 1 α 25(OH)₂D₃ comme adjuvant puisque sa co-administration avec le vaccin inactivé du poliovirus a augmenté la réponse immunitaire systémique et mucoale chez la souris (Ivanov et al., 2006). De plus, suite à une immunisation intramusculaire de porcs âgés de 7 semaines avec l'albumine humaine (HSA, pour Human serum albumin, en anglais) associée avec IFA supplémentée de 2 μ g de 1 α 25(OH)₂D₃, une augmentation notable d'IgA anti-HSA a été notée dans le sérum (Van Der Stede et al., 2004). Chez ces mêmes animaux, une augmentation dans le nombre de cellules sécrétrices d'IgA dans les tissus lymphoïdes, les plaques de peyers et dans la lamina propria du tractus intestinal ont été également observées. Puisque les IgY aviaires semblent être les précurseurs des IgA mammifères, d'un point de vue phylogénétique (Hadge et Ambrosius, 1984), il est raisonnable de penser que l'utilisation de 1 α 25(OH)₂D₃ comme adjuvant chez l'espèce aviaire pourrait avoir un effet immunostimulant. Toutefois, la poule pondeuse n'a pas encore été utilisée comme modèle avec cet adjuvant.

5.1.2. CpG-ODN

L'ADN bactérien peut stimuler l'immunité innée des animaux. Cette activation est fonction des motifs CpG non-méthylés, qui se retrouvent en abondance chez les bactéries et en plus faible quantité chez les animaux. Les oligodéoxynucléotides synthétiques (CpG-ODN) contenant des motifs CpG non-méthylés ont la même action d'immunostimulation (Ioannou et al., 2003). Comme pour les bactéries entières, la présence d'un motif CpG non-méthylé est à l'origine de l'activité immunostimulatrice de ces séquences (Hemmi et Akira, 2005). Ces motifs spécifiques, extrêmement bien conservés entre une grande variété de micro-organismes et faisant partis des PAMPs, (« Pathogen-Associated Molecular Patterns », en anglais), sont reconnus par le système immunitaire inné des vertébrés via les PRRs (« pattern recognition receptors », en anglais) comme étant le non-soi (Krieg, 2001). Les TLRs (« Toll-like Receptor », en anglais) font partie de la famille des PRR.

CpG-ODN est un très bon candidat au titre d'adjuvant pour la production de plus grandes quantités d'anticorps spécifiques (Krieg et al., 1995). En effet, des cellules B purifiées montrent une forte réponse synergétique quand elles sont stimulées par CpG-ODN en présence d'antigène, indiquant une interaction entre le récepteur des cellules B et la voie de signalisation de CpG-ODN (Krieg et Wagner, 2000). Plusieurs facteurs contribuent à cette potentialisation spécifique. Premièrement, CpG-ODN peut induire plus de 95% des cellules B à entrer dans le cycle cellulaire (Krieg et al., 1999; Krieg et al., 1995) en plus de prévenir leur apoptose (Krieg et al., 1999) favorisant ainsi leur persistance et contribuant à la génération d'une réponse immunitaire beaucoup plus soutenue. De plus, à faible dose, CPG-ODN co-stimule fortement l'activation des cellules B par l'antigène spécifique (Klinman et al., 1999; Krieg et al., 1999). Les cellules B sont également conduites à exprimer plus de molécules de co-stimulation incluant CMH-II, B7-1 et B7-2 (Krieg et al., 1995), augmentant ainsi la présentation de l'antigène. Deuxièmement, CPG-ODN active directement les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques à sécréter $\text{IFN}\alpha/\beta$, IL-6, IL-12, GM-CSF, chimiokines et $\text{TNF-}\alpha$, qui à leur tour stimulent les cellules T à sécréter des cytokines additionnelles ainsi que les cellules NK à sécréter $\text{IFN-}\gamma$. Le profil cytokinaire (IL-12 et $\text{INF-}\gamma$) favorise grandement une réponse de type Th-1 alors que le profil Th-2 est beaucoup moins important (Ioannou et al., 2003; Krieg et Wagner, 2000).

Le mécanisme exact par lequel CpG-ODN stimule le système immunitaire est partiellement résolu. Une hypothèse veut que CpG-ODN soit capturé par une cellule immunitaire, probablement une cellule dendritique (Hemmi et Akira, 2005) et induirait la voie de signalisation qui débiterait suite à sa reconnaissance par le « Toll-like receptor » 9 (TLR9), lequel est essentiel pour la réponse cellulaire à l'ADN bactérien, aussi bien qu'à CpG-ODN (Hemmi et al., 2000). Effectivement, les cellules dendritiques de souris TLR9^{-/-} sont incapables de produire en quantité détectable IL-12 (Hemmi et al., 2000), une cytokine essentielle à la réponse Th1-like, chez ces souris. La stimulation des TLR induit une maturation fonctionnelle des cellules dendritiques incluant l'augmentation de leur capacité à présenter l'antigène aux cellules T naïves, résultant en une activation plus effective de l'immunité acquise (Hemmi et Akira, 2005). TLR9 semble être localisé dans un endosome et la maturation endosomale est nécessaire à l'initiation de cette signalisation (Hemmi et Akira, 2005). Par la suite, la protéine MyD88 (Myeloid Differentiation Factor 88, en anglais), IRAK (IL-1 Receptor-Associated Kinase, en anglais) et le TRAF6 (Tumor Necrosis Factor Receptor-associated factor 6, en anglais) activeraient les kinases cellulaires, telles IKK (IκB-Kinase, en anglais) et MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase, en anglais). La traduction du signal par ces voies mènerait à l'activation de gènes responsables de diverses fonctions, telle la sécrétion de cytokines (Freytag et Clements, 2005; He et Kogut, 2003; Hemmi et al., 2003).

Il existe trois classes de CpG-ODN, en fonction de leur séquence, leur structure et leur activité biologique (Hemmi et Akira, 2005; Vollmer et al., 2004). CpG-ODN de classe A (connue aussi sous le nom de type D), comporte une modification phosphorothioate aux extrémités, un centre palindromique phosphodiester et une queue poly-guanosine (polyG). CpG-ODN de classe A stimule les cellules NK (plus que les cellules B) et induit une sécrétion d'INF-α par les cellules plasmacytoïdes humaine.

CpG-ODN de classe B (connue aussi sous le nom de type K), comportant une modification phosphorothioate entre chaque nucléotide, est la meilleure stimulatrice des cellules B en plus de stimuler les cellules NK et la production de cytokines. La modification phosphorothioate est le remplacement d'un oxygène par un soufre dans la liaison entre les nucléotides. Ces modifications confèrent au CpG-ODN une résistance accrue aux nucléases et le protège donc de la dégradation suite à son injection chez l'animal (Sands et al., 1994), sans toutefois ajouter à

l'effet d'immunostimulation (McCluskie et al., 2001). Effectivement, *in vitro*, CpG-ODN phosphorothioate s'est montré actif à des concentrations de 10 à 100 fois inférieures à la séquence correspondante phosphodiester quant à la stimulation de la production d'oxyde nitrique (Sester et al., 2000), une molécule effectrice du système immunitaire inné. De plus, CpG-ODN avec la modification phosphorothioate peut stimuler les cellules B murines à une concentration jusqu'à 2 log inférieurs à celle requise pour CpG-ODN non modifié (Krieg et al., 1995). Une étude *in vivo*, où des souris ont été injectés intrapéritonéalement avec CpG-ODN phosphorothioate, a montré une augmentation de 3 à 6 fois supérieure au niveau de la prolifération des cellules B spléniques et la sécrétion d'Ig en 24 heures, en plus d'une augmentation de l'expression de marqueur d'activation tels les molécules du CMH-II, par rapport aux souris injectées avec CpG-ODN phosphodiester (Krieg et al., 1995).

Le CpG-ODN de la classe C est composé de modifications phosphorothioates, sans queue polyG, avec une séquence palindromique et un motif CpG, lui conférant un effet intermédiaire aux deux autres classes (Vollmer et al., 2004).

En résumé, CpG-ODN avec des liaisons traditionnelles phosphodiester active fortement les cellules NK tandis que le CpG-ODN avec des liaisons phosphorothioates augmente dramatiquement la stimulation des cellules B et réduit l'activation des cellules NK (Ballas et al., 1996; Ioannou et al., 2003; Krieg et al., 1995), ce qui en fait un adjuvant désirable.

5.1.2.1. Inocuité chez les espèces animales

CpG-ODN peut être utilisé soit seul ou en combinaison avec des adjuvants conventionnels pour induire une réponse immunitaire plus équilibrée (Ioannou et al., 2002; Ioannou et al., 2003; Weeratna et al., 2000). De telle façon, CpG-ODN peut être utilisé pour diminuer les effets toxiques des adjuvants conventionnels sans réduire la réponse immunitaire induite, puisqu'on remplace une partie de l'adjuvant huileux couramment utilisé et que CpG-ODN peut bénéficier de l'effet de libération lente et graduelle généré par le dépôt (Weeratna et al., 2000).

Les résultats d'une étude effectuée par McCluskie et Davis (1998) indiquent qu'il est possible d'utiliser de plus petites doses d'antigènes avec CpG-ODN pour obtenir une meilleure réponse immunitaire avec une plus faible toxicité. CpG-ODN est bien toléré par les souris jusqu'à une dose de 500 µg intranasale. À titre de comparaison, les souris montrent des signes de toxicité à

partir de 10 µg de la toxine CT, utilisée également comme adjuvant (McCluskie et Davis, 1998). De plus, des administrations hebdomadaires répétées de CpG-ODN chez le singe n'ont pas causé de pathologie substantielle pour une dose allant jusqu'à 10 mg kg⁻¹ (Krieg et Wagner, 2000).

5.1.2.2. CpG-ODN chez la poule

La réponse immunitaire déclenchée par CpG-ODN est motif-dépendante. Lors d'une étude *in vitro*, Rankin et al. (2001) ont étudié 30 motifs de CpG-ODN afin de trouver ceux créant la plus forte réponse proliférative pour les PBMN (Peripheral Blood Mononuclear Cells, en anglais) chez les différentes espèces animales. De ces motifs, les auteurs ont déterminé que celui qui engendrait la meilleure prolifération de PBMN chez la poule a été GTCGTT, avec modification phosphorothioate. La même conclusion a été tirée par l'équipe de He et al. (2003), considérant la réponse sur une lignée de macrophage aviaire (HD11). Effectivement, CpG-ODN a induit la production d'oxyde nitrique chez ces cellules et la reconnaissance de CpG-ODN par les hétérophiles aviaires, en présence de sérum aviaire, amènent ceux-ci à se mobiliser et à relâcher le contenu de leurs granules.

Chez la poule, l'injection d'une dose aussi faible que 0,1 µg de CpG-ODN résulte en un recrutement de cellules mononucléaires et polymorphonucléaires au site d'administration (Gomis et al., 2003), indiquant un effet d'immunostimulation. La majorité des démonstrations de l'efficacité *in vivo* de CpG-ODN repose sur la potentialisation de l'effet vaccinal. Ainsi, Vleugels et al. (2002) ont observé une augmentation du niveau des anticorps sériques spécifiques suite à une administration de CpG-ODN avec BSA (« bovine serum albumin », en anglais), malgré que le motif utilisé ne corresponde pas à celui qui est optimal chez la poule, ayant des liaisons phosphodiester, et que l'immunisation ait été faite par voie sous-cutanée. Plus récemment, Ameiss et al. (2006) ont observé une réponse immunitaire systémique et mucosale suite à la vaccination orale, via l'eau d'abreuvement, avec CpG-ODN et BSA. De plus, l'administration sous-cutanée ou intramusculaire d'aussi peu que 3.16 µg jusqu'à 100 µg de CpG-ODN, a stimulé une protection efficace contre une infection intra-lésionnelle de 10⁹CFU mL⁻¹ d'une souche *E. coli* causant la cellulite chez la poule âgée de 22 jours (Gomis et al., 2003).

Bien que le CpG soit efficace pour contrer une infection létal avec *E. coli* et ait un potentiel comme vaccin, son utilisation dans le but de produire davantage d'anticorps spécifiques dans les

œufs des poules pondeuses immunisées n'a pas encore été rapporté.

6. Utilisation de la poudre d'œuf dans la prévention de la diarrhée post-sevrage

Les IgY contenues dans les œufs sont appelées à être ajoutées à titre d'additif alimentaire, à la nourriture des porcelets afin de servir en immunothérapie passive par voie orale. Pour ce faire, la préparation d'œuf liquide préalablement mélangée doit être déshydratée, soit par lyophilisation ou par vaporisation/atomisation (spray-dry, en anglais), qui, de plus, sont des procédés souvent utilisés afin d'assurer la stérilité du produit final. Il est donc important de connaître la résistance des IgY face aux températures utilisées dans ces procédés. Hatta et al. (1993) ont démontré que suite à une incubation de 30 minutes à 70°C, les IgY perdaient 50% de leur activité et 90% suite à 10 minutes à 80°C alors qu'elles résistent totalement à la pasteurisation (60°C pour une période de 3½ à 8 minutes). Les IgY sont stables pour une période de 15 minutes à 70°C, tandis que les IgG le sont à 80°C, pour la même période. Des recherches ont déterminé que plus la concentration en protéines est grande dans un échantillon, moins il se produit de dénaturation due à la chaleur (Carlander, 2002; Chang et al., 1999; Shimizu et al., 1992). On peut donc aisément penser que les IgY contenues dans l'œuf entier résisteraient mieux à la chaleur que les IgY purifiées.

Dans un autre ordre d'idées, puisque les IgY sont destinées à être administrées par voie orale, il est important de connaître leur résistance envers les différents pH biologiques afin de savoir si elles seront capables de persister et de demeurer actives suite à leur passage au niveau de l'estomac. Carlander (2002) a démontré que les IgY tolèrent bien l'acidité à pH 4.0, mais on observe une diminution rapide de leur activité à pH 2.0 correspondant à une chute de leur capacité de liaison à l'antigène. Effectivement, dès que le pH se situe en bas de 4.0, on observe rapidement une inactivation irréversible (Shimizu et al., 1992) des IgY se produisant surtout dans les 30 premières minutes (Lee et al., 2002). En milieu acide, il surviendrait un changement structural au niveau des résidus de tryptophane (Lee et al., 2002), résultant en une destruction de la structure secondaire des IgY (Shimizu et al., 1992). Heureusement, le pH stomacal et duodéal des porcelets nouveau-nés est légèrement supérieur à celui retrouvé chez les animaux matures. À

titre de comparaison, les IgG ont une activité inchangée jusqu'à pH 2.0 (Shimizu et al., 1992). L'activité des IgY en milieu alcalin est mimée sur celle des IgG jusqu'à pH de 11.0, en diminuant dramatiquement à pH 12.0. Il serait possible que l'inactivation plus rapide des IgY face à divers traitements soit due au fait qu'elles ont une flexibilité réduite en vue du fait qu'elles ne possèdent pas de région charnière (Shimizu et al., 1992). Conséquemment, il est important d'utiliser différentes méthodes dans le but de stabiliser les IgY en milieu acide, c'est-à-dire lorsqu'elles se retrouvent dans l'estomac porcine. De plus, afin de rentabiliser cette approche en réduisant la dose requise ainsi que la fréquence d'administration, il est important de protéger les Ig, tout en permettant une concentration maximale au niveau de la muqueuse intestinale. On peut soit, encapsuler les IgY dans des liposomes (Shimizu et al., 1993), soit co-administrer des solutions permettant d'augmenter le pH de l'estomac (Bogstedt et al., 1997) ou encore enrober les IgY (Kovacs-Nolan et Mine, 2005).

La présence de certains sucres et acides aminés peuvent protéger les protéines de la dénaturation (Chang et al., 1999). Lee et al. (2002) ont démontré qu'en solution aqueuse, 30% de sorbitol (de la famille des polyols) ou de sucrose, permettait d'augmenter la stabilité des IgY, alors qu'une solution de 50% de sorbitol inhibait complètement l'inactivation se produisant à pH 3.0. Ces substances inhiberaient les changements structuraux, de façon dose-dépendante, qui se produisent près des résidus tryptophane par l'acidification, résultant en une amélioration de la stabilité des IgY. En fait, le sorbitol aurait un effet de solidification des interactions hydrophobes autour des résidus tryptophanes. Toutefois, puisque les polyols ont généralement un effet laxatif (Lee et al., 2002), leur usage en prophylaxie de la diarrhée porcine demeure limité. D'autres substances sont reconnues pour stabiliser les IgY, tel le maltose, le glycérol et 2% de glycine (Chang et al., 1999). De plus, l'ajout de 5% de poudre de gomme d'arabique aux œufs liquides devant être déshydratés peut augmenter leur stabilité face aux protéases (Chang et al., 1999).

Snoeck et al. (2003) ont démontré qu'un enrobage, fabriqué à partir d'Eudragit®, pouvait être bénéfique pour protéger des fimbriae F4 de la dégradation et l'inactivation par les enzymes et la bile. Kovacs-Nolan et Mine (2005) ont protégé des IgY *in vitro* ainsi que suite à un passage *in vivo* chez le porcelet à l'aide d'un copolymère méthacrylique. De plus, un enrobage composé de lipides a montré un relâchement lent et contrôlé d'acides organiques tout au long de l'intestin porcine (Piva et al., 2006).

Des recherches ont conclu que l'addition de SDPP, de protéine isolées de pois, de jaune d'œuf contenant des IgY anti-F4, et l'ajout d'oxyde de zinc ou d'acide fumarique à une diète peuvent être des alternatives efficaces dans la lutte aux dps causées par des ETEC (Owusu-Asiedu et al., 2003a; Owusu-Asiedu et al., 2003b). Effectivement, les porcelets nourris avec SDPP ou du SDE réagissaient de façon semblable quant à la durée d'excrétion des bactéries, à la sévérité des signes cliniques et au taux de mortalité. Ces données signifient que SDE pourrait remplacer le SDPP chez les porcelets en post-sevrage. De plus, Owusu-Asiedu A. et al. (2003b) affirment que la supplémentation de la diète avec le poudre d'œuf contenant des anticorps spécifiques de F4 et de SDPP peut procurer un contrôle passif contre les infections à ETEC en plus d'augmenter le gain de poids chez les porcelets sevrés hâtivement à 10 jours d'âge.

Des IgY spécifiques offrent une protection efficace contre une infection ETEC (Marquardt et al., 1999). Les porcelets sevrés et nourris avec du jaune d'œuf provenant de poules immunisées avec les fimbriae F4 purifiés ont montré une diarrhée plus faible et aucune mortalité suite à l'inoculation avec une souche hémolytique ETEC F4+ (Marquardt et al., 1999), comparé aux contrôles ne recevant que du jaune d'œuf provenant de poules non-immunisées. Le taux de diarrhée et la mortalité ont été significativement inférieurs chez les porcelets nourris avec une diète supplémentée en jaune d'œuf dans une ferme commerciale, soit en condition naturelle d'infection. Toutefois, Chernysheva et al. (2003) n'ont pas observé de différence au niveau de l'incidence de la diarrhée et de la mortalité des animaux, entre un groupe traité avec une nourriture commerciale contenant des IgY anti-F4 et un groupe contrôle, dans des conditions normales d'élevage. De plus, Friendship (2002) a mentionné que l'utilisation d'IgY n'était pas efficace pour le contrôle des dps à ETEC induites par une inoculation expérimentale.

Dans une autre optique, Ikemori et al. (1997) ont démontré que l'œuf entier provenant de poules immunisées est une meilleure source d'Ig que de la poudre de colostrum de vaches immunisées, pour la prévention d'une infection de coronavirus chez le bovin, basé sur la quantité nécessaire pour la neutralisation de l'agent pathogène. Les IgY pourraient également être utilisées dans le traitement d'infection à *Helicobacter pylori* (Shin et al., 2002a) ainsi que tous les autres pathogènes gastrointestinaux.

Puisque les résultats sont encore contradictoires, d'autres études sont nécessaires afin de démontrer l'efficacité et la rentabilité de l'utilisation des œufs contenant des Ig spécifiques

(Fairbrother et al., 2005) afin de prévenir la dps chez les porcelets sevrés à 17-21 jours dans les conditions d'élevage actuelles.

MÉTHODOLOGIES ET RÉSULTATS

**Article 1: Improvement of Adjuvant Systems to Obtain a Cost-Effective
Production of High Levels of Specific IgY**

S. Lévesque¹²

G. Martinez³

J. M. Fairbrother⁴

Article accepté le 6 décembre 2006 pour sa publication par Poultry Science

L'article sera publié dans le volume 86 en Avril 2007

Il est présenté ici sous sa forme d'origine, tel qu'il sera publié

¹ *Escherichia coli* Laboratory, GREMIP, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Sicotte C. P. 500, St-Hyacinthe, Quebec, Canada, J2S 7C6.

² First two authors contributed equally to this work

³ Laboratoire de santé publique du Québec, 20045 chemin Sainte-Marie, Sainte-Anne-de-Bellevue, QC, H9X 3R5.

⁴ Corresponding author : 

Abstract

Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) is used as standard adjuvant for the production of specific antibodies. In this study, we evaluated the ability of supplementation of IFA with 1 α ,25 dihydroxyvitamin D3 (1 α ,25(OH)₂D3) or Cytosine-phosphate-Guanosine-Oligodeoxynucleotide (CpG-ODN) to enhance the quantity of specific IgY found in the eggs of hyper-immunized laying hens. In this comparative study, the fimbrial adhesin F4 of porcine enterotoxigenic *E. coli* was used as prototype immunogen. Hens of three groups received by intramuscular injection 20 μ g of purified F4 adhesin emulsified with one of the following adjuvants: 0.5 ml of IFA alone (F4-IFA group), 0.5 ml of IFA supplemented with 285.6ng of 1 α ,25(OH)₂D3 (F4-IFA-D3 group), or 0.5 ml of IFA supplemented with 10 μ g of CpG-ODN (F4-IFA-CpG group). Hens of two control groups received PBS or purified F4 alone. Immunization was repeated after two and five or seven weeks. Eggs were collected at three to four day intervals from pre-immunization to day 79 and whole eggs were tested to measure the quantity of anti-F4 IgY by a standardized indirect ELISA. The quantity of specific anti-F4 IgY present in eggs from immunized hens of the F4-IFA group increased from day 13 to 79, corresponding to the end of the experiment. The values for this group at each time were considered as 100%. Results obtained for the other adjuvants were expressed in relation to this reference method. Supplementation if IFA with 1 α ,25(OH)₂D3 did not result in any enhancement of the quantity of anti-F4 IgY present in the eggs. On the other hand, supplementation of IFA with CpG-ODN resulted in an enhancement of yield up to 942% of the F4-specific antibody response. Moreover, the use of CpG-ODN is a cost-effective and ethical refinement for the production of specific antibodies, permitting a reduction in the number of immunizations needed. In conclusion, this study provides strong evidence for the use of IFA supplemented with CpG-ODN rather than IFA alone for the production of high levels of specific antibody in laying hens.

Key words:

Immunoglobulin Yolk (IgY);
Freund's adjuvant;
CpG-ODN;

1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3;
F4 (K88).

Introduction

Immunoglobulins (Ig) are widely used for a variety of purposes, such as in diagnostic tests, purification columns, and passive immunotherapy (Cook et al., 2005; Kim et al., 1999). The necessity to produce highly specific Ig in the most cost effective manner possible is key in both the research and diagnostic fields. Although most domestic animal species have been used to obtain specific Ig, the laying hen has only been considered in the last few decades. The use of the laying hen is an ethical alternative for the production of large amounts of specific antibodies at a low cost (Schade et al., 1996). Indeed, immunoglobulin Yolk (IgY) produced by hens transit to the egg yolk at high levels (100-250 mg per egg) (CCAC, 2002; Erhard et al., 2000; Hatta et al., 1990; Schade et al., 1996). Consequently, Ig could be recovered from the egg yolk, avoiding the bleeding of animals. Thus, the method provides a non-invasive and cost-effective way to obtain Ig.

Several aspects of hen immunization, including the inoculation route, have been studied in an effort to improve the IgY production and yolk deposition. For instance, (Chang et al., 1999) found that intramuscular inoculation resulted in a higher quantity of specific antibodies as compared to inoculation by the subcutaneous route. The most commonly used reference adjuvant eliciting a high specific immune response has been Complete Freund's Adjuvant (CFA), containing heat-killed and dried mycobacteria. However, in recent years, CFA has been less frequently used because of an associated severe inflammation causing necrosis and ulceration of the tissue (Wanke et al., 1996). The most effective substitute found to date is Incomplete Freund's Adjuvant (IFA), which is now the adjuvant most commonly used to produce specific Ig. Both IFA and CFA are oil-based adjuvants which create a depot at the injection site, thus protecting the antigen and releasing it at a low rate in the organism and allowing a sustained stimulation of the immune system. However, in IFA, the mycobacterial components were removed to eliminate the tissue necrosis, resulting in an accompanying loss of immunostimulatory effect. Thus, although IFA has been used to date as a substitute for CFA, there remains, nevertheless, the potential for improvement of its immunostimulatory effect.

Supplementation of IFA is one way to potentiate its immune stimulation. Previous studies demonstrated the high potential of $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), the active metabolite of vitamin D3, for the stimulation of the mammalian immune system (Van der Stede

et al., 2003). However, the use of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ as adjuvant gave rise to conflicting results, depending of the animal species examined (Ivanov et al., 2006; Kriesel and Spruance, 1999; Lemire, 1992; Van der Stede et al., 2003). Furthermore, there are no reports of the evaluation of this metabolite as an adjuvant in the avian species.

Oligodeoxynucleotides containing Cytosine-phosphate-Guanosine (CpG-ODN) motifs are also a promising adjuvant in mammals (Hemmi and Akira, 2005; Hemmi et al., 2000; Klinman et al., 1999). (Ioannou et al., 2002) observed that the use of IFA at reduced doses in combination with CpG-ODN resulted in attenuation of the tissue damage without compromising the magnitude of the immune response in mice. In the avian species, different *in vitro* studies demonstrated that CpG-ODN induced nitric oxide production in macrophage cell line HD11 and the recognition of CpG-ODN by avian heterophils in the presence of chicken serum resulted in their mobilization and induced a dose-dependant heterophil degranulation (He et al., 2005). The biological activity observed with CpG-ODN is motif-dependant and only a few studies have been done to determine the effective sequences in avian species (Gomis et al., 2004; He et al., 2003; Rankin et al., 2001). GTCGTT sequence was found to be the most active CpG motif to stimulate a response in an avian macrophage cell line (HD11), *in vitro* (He et al., 2003). Nevertheless, there have been no reports on the stimulatory effect of CpG-ODN on the induction of specific egg yolk antibodies *in vivo*, using laying hens.

The aim of this comparative study was to investigate the potential of the adjuvants $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and CpG-ODN to potentiate the immunostimulatory effect of IFA, thus maximising the production of specific antibodies in the egg yolks of hyper-immunized laying hens.

Materials and Methods

Laying Hens

Eighteen 18-week-old Lohmann white laying hens were obtained from a commercial breeding farm and were housed in cages with mesh floors, two hens per cage (Schade et al., 1996), in an environmentally controlled room. The room temperature was maintained at 23.9°C. The hens were subjected to 15 hours of artificial light each day (6am to 9pm). The hens were fed *ad libitum* with the commercial diet Natur-Aile (CO-OP, St-Hyacinthe, Canada). Hens were euthanized at the end of the experiment. The experimental procedure conformed to the *Guidelines on: antibody*

production, 2002, of the Canadian Council on Animal Care.

Monitoring of the Laying Hens

The laying hens were monitored daily to determine any secondary effects following the immunization. General appearance, behaviour, presence of local inflammation and any reaction to the injected adjuvant were evaluated on each examination.

Preparation of F4 Immunogen

The major subunit protein FaeG (27,5kDa) of enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbrial adhesin F4 was used as the prototype immunogen. FaeG protein had been cloned previously and was kindly provided by D. J. Pickard (Kehoe et al., 1981). The protein was produced from *E. coli* strain K12(pMK005) (designated EcL 1082) and purified as described by (Jacobs and Graaf, 1985) with some modifications. Briefly, after five hours of culture, bacteria were centrifuged. The pellet was homogenized twice for five minutes on ice at maximum speed using an X-120 homogenizer (Polyscience, Staufen, Germany), with cooling on ice for five minutes between each homogenization. Clear supernatant was obtained by centrifugation at 12 000 x g for 20 minutes at 4°C and subjected to ammonium sulphate (14%w/v) precipitation overnight at 4°C. The proteins were harvested by centrifugation at 12 000 x g for one hour at 4°C and resuspended in Tris-HCL 0,1M pH 7,8. Salt was removed by dialysis overnight in Tris-HCL 0,1M pH 7,8. The dialysate was precipitated with citric acid 0,1M at pH 4.0, being the isoelectric point of F4. After a centrifugation for 15 minutes at 14 000 x g at 4°C, the pellet was resuspended in Mc Ilvaine buffer (0.15M K₂HPO₄ and adjusted to pH 6.0 with 0,1M citric acid). The purified F4 migrated as a single band on electrophoresis using a 15% SDS-polyacrylamide gel. The presence of purified F4 protein was confirmed on Western blot using a specific monoclonal antibody against the fimbriae (data not shown). The purified F4 was quantified by the modified Lowry method (Markwell et al., 1978) using BSA as standard. A protein concentration of 1154µg/mL was obtained.

Experimental Design

Hens were each immunized intramuscularly (i.m.) at day 0 with one of the following immunogen-adjuvant preparations, in two sites in the breast muscle, when they reached twenty-two weeks of age. The injected volume per site was 0,5mL, for a total of 1mL per hen. Immunization was repeated on day 15 and subsequently during week 5 or week 7 of the

experiment, when specific anti-F4 IgY levels were no longer increasing. Both hens in any one cage received the same immunization regime.

Eggs were collected twice daily from day 0 until the end of experiment and stored at 4°C until testing by the indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), usually on the following day.

Immunogen-adjuvant preparations. Four hens were each immunized with 20µg of purified F4 resuspended in 0,5mL total of 0,1M PBS pH 7,4 and emulsified in a 2 way syringe in an equal volume of IFA alone (F4-IFA group), being considered as the reference group. Four hens were each immunized with purified F4 emulsified in IFA supplemented with 285,6ng of 1α,25(OH)₂D₃ (F4-IFA-D₃ group). The active metabolite of vitamin D₃, 1α,25(OH)₂D₃ (Sigma, Oakville, Canada), was dissolved at 1mg/mL in pure ethanol, aliquoted, and frozen at -20°C until use. An additional four hens were each immunized with purified F4 emulsified in IFA supplemented with 10µg CpG-ODN (F4-IFA-CpG group). The specific sequence #2135 of CpG-oligodeoxynucleotide (5'-TCGTCGTTTGTCTGTTTGTCTGTT-3', BioCorp Inc., Montréal, Canada), previously recognized to activate the immune system of hens *in vitro* (Rankin et al., 2001), was dissolved at 4,2mg/mL in distilled water, aliquoted, and frozen at -20°C until use. This non-methylated sequence has a phosphorothioate backbone that allows it to resist nuclease degradation (Sands et al., 1994). Hence, a relatively small amount of CpG oligonucleotide is required to stimulate the immune system (Sester et al., 2000).

Two hens were immunized with 0,1M PBS pH7,4. This was considered to be the negative-control group. Four hens, making up the F4-control group, were immunized with 20µg of purified F4 resuspended in 0,1M PBS pH 7,4. The latter group was used to determine the quantity of specific anti-F4 IgY present in eggs when no adjuvant was used.

Indirect ELISA test. The entire contents of all eggs belonging to the hens housed in the same cage were pooled and mixed in a Waring blender. The antibody response to F4 was measured twice weekly from day 0 until the end of the experiment by indirect ELISA, using 96 well microplates coated with 50ng of purified F4, as described previously (Girard et al., 2006). The detected absorbance in each sample of the F4-IFA group was considered as 100%. The absorbance values observed at each sampling time for each adjuvant system tested were initially expressed as the mean absorbance in the whole egg contents for the hens of that group. The

results were then compared to those of the F4-IFA group at each time and expressed as a percentage. This percentage value represents the increase or decrease observed at each time for each group relative to the standard group (F4-IFA group). Eggs collected before the first immunization were tested by ELISA to demonstrate that no specific anti-F4 IgY was present.

Statistical test

To compare the immune response to F4 between treatments, areas under the ELISA titration curves were compared using a one-way non-parametric ANOVA (Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test). Data were considered different when the probability level was $\alpha \leq 0,05$.

Results and Discussion

Effect of immunization with the different adjuvants on overall health and egg yield in the hens

Hens did not present discomfort or pain in response to the immunization procedure or to any adjuvant used to potentiate the response to the F4 fimbriae. The injection sites were always clean and no sign of tissue damage, necrosis, or ulceration was observed. Only one bird died during the experiment, at day 49 (week 7). The bird was in the $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ group. The hen had a severe leg injury with bleeding caused by a “foot trap” in the cage, occurring during night, followed by a reduction in food intake leading to its death. Furthermore, egg yield was monitored to evaluate the possible adverse effect of the adjuvant on the general health or laying capacity of the immunized birds. In general, no significant decrease in egg yield was observed during the experiment, for any of the adjuvants (Figure 1). However, a lower production of eggs was noted for several days after each immunization (e.g. week 7). This suggests that the decrease in egg laying is due to the stress caused to the animals by the immunization process rather than the negative effect of the adjuvants used.

Effect of different adjuvants on production of specific anti-F4 IgY

No significant difference was observed between individuals with respect to the concentration of specific IgY present for a same adjuvant (data not shown), on indirect ELISA. Consequently, the results for each hen, regardless of cage of origin, were pooled at each sampling time for each adjuvant system tested.

Specific anti-F4 IgY was first detected in hens on day 13 post-immunization. In hens of the F4-

IFA group, the mean of anti-F4 IgY deposition in eggs reached a first peak at day 30 post-immunization and stabilized for at least 20 days to reach a second peak at day 58 post-immunization. As IFA was considered to be the standard adjuvant, the anti-F4 IgY levels of the F4-IFA group at each testing time were set at 100% to facilitate comparison between groups.

When IFA was supplemented with CpG-ODN, an increase of greater than 500% in anti-F4 IgY levels was observed from 13 to 16 and 27 to 51 days after initial immunization, reaching a maximum of 942%, as compared to use of IFA alone (Figure 2). The mean specific anti-F4 IgY concentration for the former were always higher from day 13 until the end of the experiment on day 79, being 480% higher for the duration of the experiment. This difference was significant as determined by non-parametric ANOVA, Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test ($p=0,001356$). High egg levels of specific anti-F4 antibodies were obtained with this adjuvant mix, in spite of the low quantity of F4 protein used for immunization (20 μg) and its small size (27,5kDa).

In vitro studies have demonstrated the immunostimulatory effect of CpG-ODN sequence #2135 on avian cells (He et al., 2003; Rankin et al., 2001), including an increase in the number of B cells and their ability to produce antibodies (Krieg et al., 1999; Krieg et al., 1995). Such an effect, together with the synergism observed between CpG-ODN and a deposit-forming adjuvant (Ioannou et al., 2002), could explain the high egg levels of specific IgY observed in the present work.

(Vleugels et al., 2002) also observed an enhanced specific antibody response in broiler chickens following use of CpG-ODN as an adjuvant for immunization against BSA, although the appearance of this response was delayed. Here, we observed an enhancement in the levels of specific IgY in eggs, although no delay was observed following use of IFA with CpG-ODN as compared to IFA alone.

The hens of the F4-IFA-D3 group demonstrated a maximum of only 231% of the anti-F4 IgY levels observed in eggs for the F4-IFA group, at day 15 following the first immunization. This peak was followed by a rapid decrease until day 23 when levels reached those of birds belonging to the F4-IFA group (Figure 2). Non parametric ANOVA showed that the addition of $1\alpha,25-$

dihydroxyvitamin D3 to IFA did not have any significant effect on the quantity of anti-F4 IgY present in the eggs.

This is the first report on the use of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ as an adjuvant in avian species. Hence, we extrapolated the concentration used in this study from that used in pigs (Van der Stede et al., 2003; Van Der Stede et al., 2004). However, this concentration did not seem to be sufficient to enhance specific IgY production in birds in the present study. More investigation is needed before using this immunostimulant in birds.

The level of anti-F4 IgY was very low in the F4-control group, corresponding to a maximum of 31% of the quantity present in the F4-IFA group, throughout the experiment. This quantity of specific anti-F4 IgY corresponds to the minimal levels detected in eggs throughout the study and represents a maximum of specific antibodies produced when no adjuvant was used. F4-specific antibodies were not detected for the negative-control group throughout the entire experiment, as expected.

Recently, a novel approach was used for the production of anti-F4 antibodies in laying hens. Cho et al. (2004) immunized birds with a plasmid containing the gene encoding the F4 fimbrial subunit protein FaeG in tandem with the gene for chicken IL-6. This approach resulted in a prolonged deposition of specific antibodies in eggs. However, it required the optimization of dosages and injection times. Moreover, the side-effects of immunization with plasmid-encoded chicken IL-6 remain to be determined before its use on a large scale. We believe that the use of CpG-ODN would be more cost-effective and generally acceptable because of the extended time of deposition of anti-F4 IgY in eggs and the fact that this adjuvant system consists of a refinement of a time-proven approach for the production of specific antibodies.

Furthermore, we carried out a longer study of the use of F4-IFA-CpG in commercial farm conditions using 30 Lohmann hens separated in 5 cages. Hens received only eight booster immunizations, administered at five to seven week intervals, subsequent to the initial immunization with F4-IFA-CpG leading to a high rate of anti-F4 IgY deposition in eggs. Data were compared with those obtained in the shorter experiment and demonstrated an enhancement of 344%, in mean values, relative to the F4-IFA group. No adverse effect of immunization on the health of the birds or on the egg yield was observed, during one complete year. Moreover, the mortality rate was lower for the immunized hens than for the other non-immunized birds on the

farm (data not shown). Thus, our results suggest that CpG-ODN can be used safely in commercial conditions for the immunization of laying hens on a larger scale. In addition, we demonstrated that there was no difference in the concentrations of anti-F4 antibody, as determined by indirect ELISA, in eggs stored for 2 weeks at 10-12°C in a commercial farm refrigerator or at 4°C. This further underlines the suitability of carrying out large scale harvesting of eggs from immunized hens housed in commercial farm conditions.

Cost-effectiveness

Our findings show clearly that the use of CpG-ODN in the immunization protocol can result in an increase by as much as 480% of the concentration of specific antibody present in eggs, for a very small increase in immunization cost. Taking into consideration the cost of the synthesis of the CpG-ODN sequence and the quantity of specific antibodies produced, the use of CpG-ODN to supplement IFA translates to a cost-effective refinement for the production of specific antibodies using laying hens. Only ten percent of IgY in the egg are specific for the antigen injected, following immunization of chickens [Neural Notes, 1996]. Considering the increase of 480% in specific IgY following immunization with CpG-ODN, a recovery of about 96 mg of specific IgY per egg may be expected. This correspond to about 25 000 mg of specific IgY for an entire year (considering a conservative hypothesis of five eggs per week). Overall, a greater amount of specific IgY can be produced for a lower cost and in less time when IFA is supplemented with CpG-ODN. These criteria are of primary importance if large amounts of antibodies are required rapidly.

In conclusion, the enhancement of immune stimulation against F4 by supplementation of IFA with CpG-ODN resulted in a large and stable augmentation in the levels of specific IgY present in eggs. The immune stimulating properties of this mixture, associated with a reduction in the cost of immunization make for an attractive adjuvant formulation for the production of antibodies in laying hens.

Acknowledgment

The authors thank Federico De La Colina Flores for the statistical analysis. SL was supported in part by the Research Group on Infectious Diseases of Swine (GREMIP).

References

- CCAC (Canadian Consil on Animal Care). 2002. *CCAC Guideline On: Antibody Production*. Ottawa, Canada
- Chang, H. M., R. F. Ou-Yang, Y. T. Chen and C. C. Chen. 1999. *Productivity and some properties of immunoglobulin specific against Streptococcus mutans serotype C in chicken egg yolk (IgY)*. J Agric Food Chem. 47:1;61-6.
- Cho, S. H., P. C. Loewen and R. R. Marquardt. 2004. *A plasmid DNA encoding chicken interleukin-6 and Escherichia coli K88 fimbrial protein FaeG stimulates the production of anti-K88 fimbrial antibodies in chickens*. Poult Sci. 83:12;1973-8.
- Cook, S. R., S. J. Bach, S. M. L. Stevenson, R. DeVinney, A. A. Frohlich, L. Fang and T. A. McAllister. 2005. *Orally administered anti-Escherichia coli O157:H7 chicken egg yolk antibodies reduce fecal shedding of the pathogen by ruminants*. Canadian Journal of Animal Science. 85:291-299.
- Erhard, M. H., K. Mahn, P. Schmidt, S. Oltmar, R. Preisinger, P. Zinsmeister and M. Stangassinger. 2000. *Evaluation of Various Immunisation Procedures in Laying Hens to Induce High Amount of Specific Egg Yolk Antibodies*. ATLA. 28:63-80.
- Girard, F., I. Batisson, G. Martinez, C. Breton, J. Harel and J. M. Fairbrother. 2006. *Use of virulence factor-specific egg yolk-derived immunoglobulins as a promising alternative to antibiotics for prevention of attaching and effacing Escherichia coli infections*. FEMS Immunol Med Microbiol. 46:3;340-50.
- Gomis, S., L. Babiuk, B. Allan, P. Willson, E. Waters, N. Ambrose, R. Hecker and A. Potter. 2004. *Protection of neonatal chicks against a lethal challenge of Escherichia coli using DNA containing cytosine-phosphodiester-guanine motifs*. Avian Dis. 48:4;813-22.
- Hatta, H., M. Kim and T. Yamamoto. 1990. *A novel isolation method for hen egg yolk antibody, "IgY"*. Agric Biol Chem. 54:10;2531-5.
- He, H., T. L. Crippen, M. B. Farnell and M. H. Kogut. 2003. *Identification of CpG oligodeoxynucleotide motifs that stimulate nitric oxide and cytokine production in avian macrophage and peripheral blood mononuclear cells*. Dev Comp Immunol. 27:6-7;621-7.
- He, H., V. K. Lowry, P. J. Ferro and M. H. Kogut. 2005. *CpG-oligodeoxynucleotide-stimulated chicken heterophil degranulation is serum cofactor and cell surface receptor dependent*. Dev Comp Immunol. 29:3;255-64.
- Hemmi, H. and S. Akira. 2005. *TLR signalling and the function of dendritic cells*. Chem Immunol Allergy. 86:120-35.
- Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda and S. Akira. 2000. *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA*. Nature. 408:6813;740-5.

- Ioannou, X. P., S. M. Gomis, B. Karvonen, R. Hecker, L. A. Babiuk and S. van Drunen Littel-van den Hurk. 2002. *CpG-containing oligodeoxynucleotides, in combination with conventional adjuvants, enhance the magnitude and change the bias of the immune responses to a herpesvirus glycoprotein*. *Vaccine*. 21:1-2;127-37.
- Ivanov, A. P., E. M. Dragunsky and K. M. Chumakov. 2006. *1,25-dihydroxyvitamin D3 enhances systemic and mucosal immune responses to inactivated poliovirus vaccine in mice*. *J Infect Dis*. 193:4;598-600.
- Jacobs, A. A. C. and F. K. d. Graaf. 1985. *Production of K88, K99 and F41 fibrillae in relation to growth phase, and a rapid procedure for adhesin purification*. *FEMS Microbiol Lett*. 26:15-19.
- Kehoe, M., R. Sellwood, P. Shipley and G. Dougan. 1981. *Genetic analysis of K88-mediated adhesion of enterotoxigenic Escherichia coli*. *Nature*. 291:5811;122-6.
- Kim, H. O., T. D. Durance and E. C. Li-Chan. 1999. *Reusability of avidin-biotinylated immunoglobulin Y columns in immunoaffinity chromatography*. *Anal Biochem*. 268:2;383-97.
- Klinman, D. M., K. M. Barnhart and J. Conover. 1999. *CpG motifs as immune adjuvants*. *Vaccine*. 17:1;19-25.
- Krieg, A. M., A. K. Yi and G. Hartmann. 1999. *Mechanisms and therapeutic applications of immune stimulatory CpG DNA*. *Pharmacol Ther*. 84:2;113-20.
- Krieg, A. M., A. K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. A. Koretzky and D. M. Klinman. 1995. *CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation*. *Nature*. 374:6522;546-9.
- Kriesel, J. D. and J. Spruance. 1999. *Calcitriol (1,25-dihydroxy-vitamin D3) coadministered with influenza vaccine does not enhance humoral immunity in human volunteers*. *Vaccine*. 17:15-16;1883-8.
- Lemire, J. M. 1992. *Immunomodulatory role of 1,25-dihydroxyvitamin D3*. *Journal of Cellular Biochemistry* 49:1;26-31.
- Markwell, M. A., S. M. Haas, L. L. Bieber and N. E. Tolbert. 1978. *A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples*. *Anal Biochem*. 87:1;206-10.
- Neural Notes (1996) *IgY Polyclonal Antibodies*. *Neural Notes*; 1(4):14-15.
- Rankin, R., R. Pontarollo, X. Ioannou, A. M. Krieg, R. Hecker, L. A. Babiuk and S. van Drunen Littel-van den Hurk. 2001. *CpG motif identification for veterinary and laboratory species demonstrates that sequence recognition is highly conserved*. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*. 11:5;333-40.

- Sands, H., L. J. Gorey-Feret, A. J. Cocuzza, F. W. Hobbs, D. Chidester and G. L. Trainor. 1994. *Biodistribution and metabolism of internally 3H-labeled oligonucleotides. I. Comparison of a phosphodiester and a phosphorothioate*. Mol Pharmacol. 45:5;932-43.
- Schade, R., C. Staak, C. Hendriksen, M. Erhard, H. Hugl, G. Koch, A. Larsson, W. Pollmann, M. van Regenmortel, E. Rijke, H. Spielmann, H. Steinbusch and D. Straughan. 1996. *The Production of Avian (Egg Yolk) Antibodies:IgY. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 21*. ATLA. 24:925-934.
- Sester, D. P., S. Naik, S. J. Beasley, D. A. Hume and K. J. Stacey. 2000. *Phosphorothioate backbone modification modulates macrophage activation by CpG DNA*. J Immunol. 165:8;4165-73.
- Van der Stede, Y., E. Cox, F. Verdonck, S. Vancaeneghem and B. M. Goddeeris. 2003. *Reduced faecal excretion of F4+-E coli by the intramuscular immunisation of suckling piglets by the addition of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 or CpG-oligodeoxynucleotides*. Vaccine. 21:9-10;1023-32.
- Van Der Stede, Y., T. Verfaillie, E. Cox, F. Verdonck and B. M. Goddeeris. 2004. *1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 increases IgA serum antibody responses and IgA antibody-secreting cell numbers in the Peyer's patches of pigs after intramuscular immunization*. Clin Exp Immunol. 135:3;380-90.
- Vleugels, B., C. Ververken and B. M. Goddeeris. 2002. *Stimulatory effect of CpG sequences on humoral response in chickens*. Poult Sci. 81:9;1317-21.
- Wanke, R., P. Schmidt, M. H. Erhard, A. Sprick-Sanjose Messing, M. Stangassinger, W. Schmahl and W. Hermanns. 1996. *[Freund's complete adjuvant in the chicken: efficient immunostimulation with severe local inflammatory reaction]*. Zentralbl Veterinarmed A. 43:4;243-53.

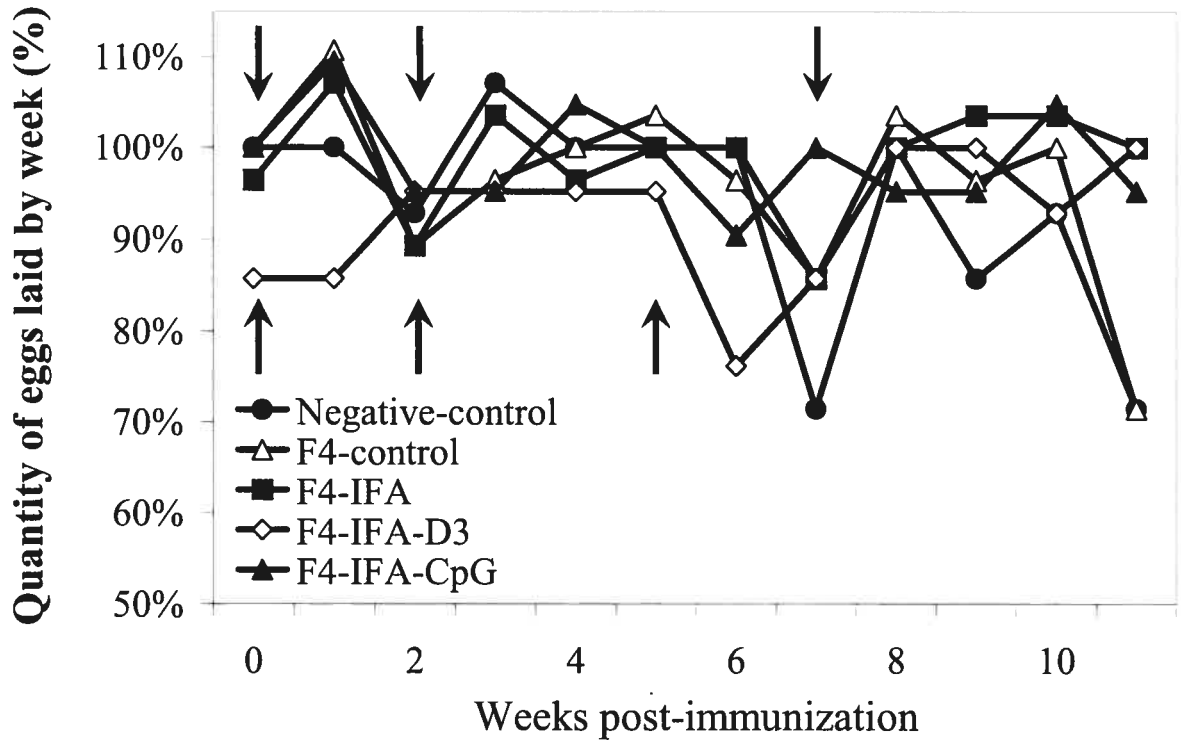


Figure 1. Mean number of eggs laid per week by hens after immunization with: enterotoxigenic *E. coli* fimbrial adhesin F4 emulsified in incomplete Freund's adjuvant (F4-IFA); F4 emulsified in IFA supplemented with $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (F4-IFA-D3); F4 emulsified in IFA supplemented with CpG-ODN (F4-IFA-CpG); F4 alone (F4-control); or PBS (negative-control). 100% corresponds to seven eggs per week per hen. Immunization days for all groups except F4-IFA-CpG are denoted by arrows pointing up. Arrows pointing down represent the days of immunization for the F4-IFA-CpG group only.

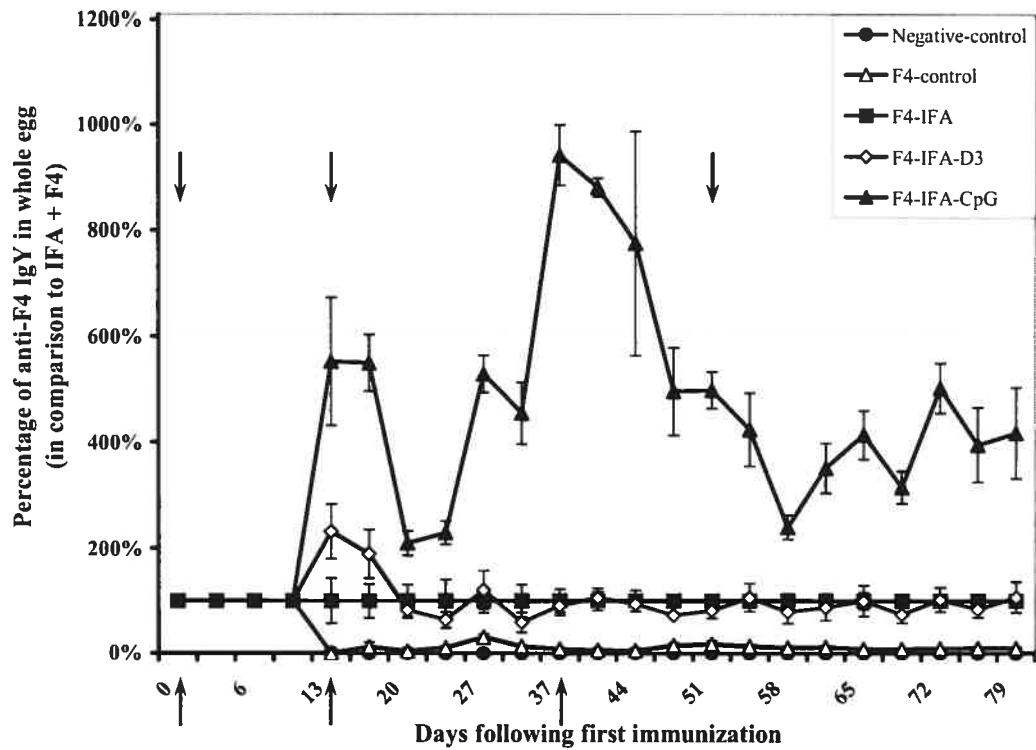


Figure 2. Effect of supplementation of enterotoxigenic *E. coli* fimbrial adhesin F4 emulsified in incomplete Freund's adjuvant with CpG-ODN (F4-IFA-CpG group) or $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (F4-IFA-D3 group) on specific anti-F4 IgY levels in the eggs of hens at different times after initial immunization. The quantity of specific anti-F4 IgY found by indirect ELISA for each adjuvant system was expressed as a percentage of the quantity of anti-F4 IgY found in whole eggs of the F4-IFA group, which was considered as 100%. Hens of the control groups were immunized with F4 alone (F4-control); or PBS (negative-control). Immunization days of all groups except F4-IFA-CpG are denoted by arrows pointing up. Arrows pointing down represent the days of immunization for the F4-IFA-CpG group only. All points represent the mean of duplicate results of ELISA. Error bars represent standard error.

**Article 2: Evaluation of Microencapsulated Anti-F4 IgY as a Feed Supplement
in the Prevention of Post-Weaning *Escherichia coli* Diarrhea in Pigs.**

S. Lévesque⁵⁶

G. Martinez⁷

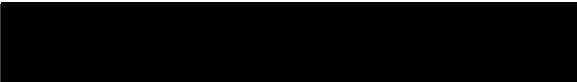
J. M. Fairbrother⁸

Manuscrit en préparation pour soumission à Journal of Animal Science

⁵ *Escherichia coli* Laboratory, GREMIP, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Sicotte C. P. 500, St-Hyacinthe, Quebec, Canada, J2S 7C6.

⁶ First two authors contributed equally to this work

⁷ Laboratoire de santé publique du Québec, 20045 chemin Sainte-Marie, Sainte-Anne-de-Bellevue, QC, H9X 3R5.

⁸ Corresponding author : 

Abstract

Post-weaning diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli* possessing the fimbrial adhesin F4 (K88) causes major losses to the swine industry. Current alternatives to antibiotic treatment for control of this problem include passive immunotherapy using egg yolk containing IgY antibodies derived from immunized laying hens, an approach for which equivocal results have been reported. In this study, the ability of lipid microencapsulated egg powder (EP), containing or not anti-F4 IgY and added as a pre-pelleting supplement to the feed, to prevent post-weaning diarrhea in pigs experimentally challenged with an F4-positive enterotoxigenic *Escherichia coli* strain was investigated. The pigs were divided into three groups with differing feed regimes: EP+ group receiving a pelleted antibiotic-free commercial feed containing lipid microencapsulated egg powder with specific anti-F4 IgY, added as a pre-pelleting ingredient; EP- group, receiving the same pelleted antibiotic-free commercial feed containing egg powder without specific anti-F4 IgY, added as a pre-pelleting ingredient; and a control group receiving the same pelleted antibiotic-free commercial feed with no egg powder. The piglets were fed *ad libitum*. Pigs were challenged with 5×10^8 CFU of a F4-positive ETEC strain. The results have clearly shown that lipid microencapsulation of egg powder protects the anti-F4 IgY during pelleting of feed and subsequently during passage through the stomach and intestine, thus resulting in detectable levels of specific anti-F4 IgY in most of the small intestine of pigs having received lipid microencapsulated egg powder containing anti-F4 IgY orally. Oral administration of microencapsulated egg powder containing anti-F4 IgY resulted in a reduction of severity and prevalence of diarrhea and reduced fecal shedding of the challenge strain in F4 receptor positive pigs challenged with an F4-positive ETEC as compared to challenged F4 receptor positive pigs not receiving egg powder, probably related to a decreased colonization of the intestine. Hence, passive immunotherapy using microencapsulated egg powder containing anti-F4 IgY as an ingredient in pelleted feed is a promising alternative for the prevention of post-weaning diarrhea due to F4-positive ETEC in large numbers of pigs, providing an efficacious, more cost effective, and minimal labour approach in the control of post-weaning diarrhea.



Key words

F4 (K88)

ETEC experimental challenge

Supplementation of pig feed

Passive immunotherapy

Microencapsulated IgY



Introduction

Intestinal disease is an important problem in weaned pigs, in part because of the sudden absence of maternal antibodies. About half of the deaths in pigs of this age worldwide are associated with enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) (Walters et Sellwood, 1982). F4 is a fimbrial adhesin associated with ETEC isolates from cases of post-weaning *E. coli* diarrhea (PWECD), mediating bacterial adherence to the intestinal epithelium. Frydendahl (2002) found that 44,7% of *E. coli* strains isolated from PWECD cases were positive for F4. F4-positive ETEC (F4+ ETEC) cause diarrhea associated with dehydration and a high rate of mortality of infected pigs. In surviving pigs, the loss of weight often results in a delay in the transition to the finishing barns. During an outbreak of PWECD, the mortality may increase from 2 to 7 percent, in average, leading to losses of more than Ca \$20 000 in a 500-sow herd (Amezcuca et al., 2002). Control measures for PWECD include better management practices, vaccines, and large spectrum antibiotics. However, in spite of these measures, a high rate of PWECD is still often observed in herds. Moreover, the use of large spectrum antibiotics, also used in human medicine, can result in an increased selection of resistant strains, complicating subsequent treatment strategies in pigs and humans. For these reasons, and in the face of consumer desire for food not containing any chemotoxic residues, researchers are seeking cost-effective alternatives for the prevention of PWECD (See Fairbrother et al. (2005) for a complete review of these strategies).

Oral passive immunotherapy is one of the most promising prevention strategies for intestinal disorders being investigated during the last several years. Effectively, this approach does not result in the development of bacterial resistance, is highly specific for the virulence factor being targeted, and is thus not harmful for the bacteria of the normal intestinal microflora. In addition, as it is a wholly natural treatment which does not lead to chemotoxic residues in the meat, no withdrawal period is needed prior to slaughter. Thus, as the antibodies are directed against a specific bacterial virulence factor, this strategy results in a highly specific response against only the appropriate pathogenic strains. For the prevention of PWECD, the antibodies could be directed against the fimbrial adhesin F4, in order to block the bacterial adherence to the intestinal epithelium. Because adherence is the first step of the infection (Fairbrother, 2004), its prevention would result in a greatly reduced intestinal colonization and rapid flushing of the bacteria out of the intestinal tract.

Animals of various species have been used for the production of the antibodies used in oral passive immunotherapy. More recently, the use of laying hens has been considered as an ethical refinement for the production of large amounts of specific antibody at low cost. Effectively, IgY (Immunoglobulin Yolk) can be harvested in large quantities from the eggs of immunized chickens, without carrying out any invasive procedures (Schade et al., 1996). However, IgY are less stable at high temperatures and in acidic conditions (Hatta et al., 1993; Lee et al., 2002; Shimizu et al., 1992), as compared to the mammalian IgG homologue. Many of the investigations of this approach have been carried out using the specific IgY purified from the egg yolks, a very time consuming and costly procedure. We have recently demonstrated that the use of CpG-ODN to supplement Incomplete Freund's Adjuvant greatly enhanced the quantities of specific anti-F4 IgY produced by chickens following immunization with F4 antigen (Lévesque et al., 2007).

Previous reports on the evaluation of the use of anti-F4 specific IgY to prevent PWECD have been equivocal. Owusu-Asiedu et al. (2002) and Owusu-Asiedu et al. (2003) reported the efficacy of this approach, whereas Chernysheva et al. (2003) were not able to demonstrate an efficacy for these same IgY in challenge and field experiments. It is probable that much of the orally administered IgY would be destroyed during passage through the stomach of the pigs, and this approach would thus not be very cost effective due to the high levels of IgY required. In addition, pigs are often fed a diet in which the ingredients are pelleted. Addition of egg yolk powder containing specific IgY to such diets pre-pelleting would greatly facilitate the use of this approach by pig producers. However, it is probable that much of the IgY would also be destroyed during the pelleting, which is carried out at temperatures exceeding 70°C.

Microencapsulation with a methacrylic copolymer appeared to protect IgY from gastrointestinal inactivation, both *in vitro* and in pigs (Kovacs-Nolan et Mine, 2005). In addition, lipid microencapsulation has been shown to allow the slow release of organic acids and natural flavours throughout the length of the intestinal tract (Piva et al., 2006). The aim of the present study was to investigate the ability of a lipid microencapsulated egg powder containing high levels of anti-F4 IgY to resist the effects of feed pelleting and passage through the stomach of weaned pigs and subsequently to prevent diarrhea in an F4+ ETEC challenge model.

Materials and Methods

Indirect ELISA

To quantify the IgY production in eggs and all samples used through the experiments, an indirect ELISA using 96 well microplates coated with 50 ng of purified F4 was used, as described previously (Girard et al., 2006). The absorbance detected was reported on a standard curve made with a purified and quantified IgY preparation (Lévesque et al., 2007).

Production of specific anti-F4 IgY

30 Lohmann white laying hens were purchased at 18 weeks of age from a commercial breeder and housed in commercial conditions. The birds were fed *ad libitum* with a commercial diet. All eggs were collected twice a day and stored at 10°C, and transferred to 4°C, the following week, until tested by indirect ELISA. We have previously demonstrated that levels of anti-F4 antibodies were not affected by storage of eggs at this temperature (10°C) for at least two weeks (Lévesque et al, 2007). This experimental protocol was approved by the local ethics committee and conformed to the *guidelines on: antibody production*, 2002 of the Canadian Council on Animal Care.

Pre-immunization eggs were tested by indirect ELISA to demonstrate that no specific anti-F4 IgY was present. Immediately prior to immunization, the injection sites were disinfected by alcohol 70% (v/v). Each hen was immunized intramuscularly (i.m.) in two sites in the breast muscle with 20 µg of the major subunit protein FaeG (27,5 kDa) of *Escherichia coli* fimbrial adhesin F4ac (diluted in 0,5 mL total volume of 0,1M PBS pH 7.4). The antigen production and purification was done as describe previously (Lévesque et al., 2007). The antigen preparation for immunization was emulsified with a 2-way syringe in 0,5 mL of incomplete Freund's adjuvant (IFA) supplemented with 10 µg of a synthetic specific sequence of Cytosine-phosphate-Guanosine oligodeoxynucleotide (CpG-ODN). The immunizations began 3 days after the purchase of birds. Immunizations were carried out on days 0 and 14 of the experiment. The antibody response to F4 was measured by a representative number of eight whole eggs once a week (white and yolk of each egg were mixed by waring blender) by indirect ELISA.

Preparation of spray dried whole egg powder (EP)

Contents of eggs from hens immunized with F4 were dehydrated by spray-drying (inlet temperature of 72°C and outlet temperature of 185°C as previously described (Girard et al., 2006) for production of whole egg powder (EP) containing anti-F4 IgY (EP+). Eggs of non-immunized chickens were obtained from Nutrioef (St-Hyacinthe, Québec, Canada), and did not contain any specific antibodies against F4, as detected by indirect ELISA. These eggs were similarly treated to produce whole egg powder containing no specific IgY against F4 (EP-).

Production of supplemented feed

Microencapsulation of EP

The EP was microencapsulated into beads using fatty acids of vegetable source, a JEFAGRO Technologies Inc. product, developed by JEFO Nutrition (JEFO Nutrition Inc., St-Hyacinthe, Québec, Canada), in a ratio of 1:2.29. To quantify the amount of anti-F4 IgY remaining after microencapsulation of the EP+, it was necessary to release the IgY from the microencapsulated beads. A quantity of 1,25g of beads of microencapsulated EP+ in 6 mL of 0,05% PBS-Tween 20 was incubated at 55°C in a water bath for 15 minutes. Beads were homogenized on ice at maximal speed with a X 120 homogenizer (Polyscience, Staufen, Germany) for 60 seconds. Samples were kept on ice until centrifugation (5900 x g for 10 minutes at 4°C). Pellets were discarded and the supernatant was examined for the presence of anti-F4 IgY by indirect ELISA.

In vitro evaluation of resistance of IgY in microencapsulated and non-microencapsulated EP+ to acidity

Samples of 1,25g of microencapsulated or non-microencapsulated IgY in lyophilised whole egg powder, were individually incubated in a volume of 1,9 ml of a solution of 0.1 M Tris at pH 2.0, 4.0, 7.0 or 0.1M PBS at pH 8.0, or 10.0, for different periods of time (0.5, 2, or 4 hours). Incubation was carried out at 39.2°C, the physiological temperature of pigs, with an orbital agitation of 50 RPM (Incubator Orbital Shaker, Forma Scientific Division, Marietta, Ohio, USA) to represent the intestinal peristalsis. After incubation, samples were neutralized by 0.1 M PBS at pH 5.8 or 2 M Tris. Then, IgY was released from microencapsulated beads as described above and remaining activity was measured by indirect ELISA. Results were expressed as a percentage of activity in an equivalent sample prior to the exposure of the microencapsulated or non-microencapsulated IgY to the different pHs.

Feed formulation

An antibiotic-free commercial feed (Shurgain, St-Romuald, Canada, Table 1) containing 0,5% (equivalent of 5 kg of whole egg powder before microencapsulation in 1 ton of food) of microencapsulated EP+ (Feed B) or EP- (Feed C), or not containing microencapsulated whole egg powder (Feed A), was pelleted by a commercial process.

Resistance of specific anti-F4 IgY in microencapsulated EP+ to the different steps leading to the production of supplemented feed

Samples were taken before and after each process carried out in the production of pelleted feed, that is, spray-drying, microencapsulation, and pelleting, and after storage of the pelleted feed for 10 months. These samples were examined by indirect ELISA to determine the quantity, expressed as a percentage, of specific anti-F4 IgY lost during each process and the remaining activity of anti-F4 IgY. The IgY was released from the microencapsulated beads by homogenization as described above.

Experimental challenge of pigs

Bacterial strain

ETEC strain ECL8559 (O149:STa:STb:LT:East1:F4:paa:hem β) was isolated at the Reference Laboratory for *Escherichia coli* (EcL) of the Faculté de médecine vétérinaire of the Université de Montréal (Saint-Hyacinthe, Québec, Canada) from the feces of a 42-day-old pig. Strain ECL8559 Nal^r is a variant of strain ECL8559 that was obtained by serial passage following growth in Luria-Bertani (LB) broth containing concentrations of nalidixic acid from 0 to 60 μ g ml⁻¹ at 37°C for 24 hours. Strain ECL7805 (O149:STa:STb:LT:F4) was used as positive control for the multiplex PCR.

Measurement by indirect ELISA of specific anti-F4 IgY in the intestine of pigs following oral administration of microencapsulated EP+

To examine the ability of the specific anti-F4 IgY in microencapsulated EP+ to withstand transit through the stomach and to reach the intestine, microencapsulated EP+ was administered orally to 17 to 21-day-old pigs which had been weaned on the same day. Pigs were deprived of feed and water for 12 hours prior to the administration. Each pig received 49 g of microencapsulated EP+ (corresponding to 3 g of EP+) mixed with the feed and water, to form a bolus, daily. Pigs were

fed a solid granular antibiotic-free diet containing 19% soy protein. Thirty pigs were used for this study. Pigs were euthanized on day 7 post-weaning (dpw), as described by (Girard et al., 2005). Briefly, pigs were sedated by intramuscular injection of a mixture of ketamine hydrochloride (10 mg kg⁻¹; Biomeda-MTC, Ontario, Canada) and xylazine (20 mg kg⁻¹; Bayer, Ontario, Canada) before being euthanized by pentobarbital overdose (540 mg kg⁻¹; Pharmacie, Faculté de médecine vétérinaire, Québec, Canada). A necropsy was performed and 20 mL of intestinal contents from the duodenal-jejunal (20 samples) and jejunal-ileal (25 samples) regions of the small intestine, and the cecum (10 samples), were taken and stored on ice. An equal volume of PBS supplemented with anti-protease cocktail (Pepstatin: 0,7 µg/mL, Aprotinin: 2,0 µg/mL, Leupeptine: 2,0 µg/mL, EDTA: 1 mM) was added to each sample to inhibit protease activity. Samples were mixed by inversion and vortexed, then centrifuged at 3830 x g for 10 minutes at 4°C. Samples were aliquoted in a volume of 1 mL and lyophilized overnight. Presence of anti-F4 IgY in samples after resuspension in 150 or 250 µl of PBS-T was examined by indirect ELISA. The results, expressed as absorbance values, were compared with those of pigs that had not received anti-F4 IgY, the latter being used to determine the negative threshold, which was considered as the mean value of absorbance plus two standard deviations. Five samples of each intestinal contents were used to establish this threshold.

Challenge experiment

A total of 79 weaned pigs (weight ranging from 4 to 7 kg) from conventional, certified PRRSV-negative herds with no recent ETEC infection were used. Pigs were housing in environmentally controlled containment level 2 rooms and randomly assigned, by systematic sampling, into one of the 3 groups. Pigs were weaned at 17 to 21 days of age, placed immediately in the containment rooms, and fed *ad libitum* throughout the experiment with one of the feed regimes A (twenty pigs, control-group), B (forty pigs, EP+ group), or C (twenty pigs, EP- group) (Table 2). At 4 days post-weaning, corresponding to 0 days post-challenge (dpc) all pigs received 5 x 10⁸ CFU of ETEC strain ECL8559 in 5 mL of Trypticase Soy broth (TSB; Difco Laboratories, Detroit, MI) following administration of 10 mL CaCO₃ 1,2% to neutralize gastric acid (Sarmiento et al., 1988), both inocula being given through an intraesophagic tube. Pigs were evaluated twice daily for general appearance, attitude, dehydration, food and water intake, and presence of diarrhea, in accordance to the Guidelines of the Canadian Council for Animal Care. Fecal consistency was noted daily using a scale of 0 to 4, where 0 corresponds to a normal consistency and 4 to watery

diarrhea. Animals were considered to have diarrhea if their fecal consistency score was 2 or greater. Fecal swabs were taken for bacteriological examination and for multiplex PCR at 0 and 4 days post-weaning and daily following challenge, until necropsy. Pigs were weighed on arrival and daily following challenge. All experiments were performed in a double-blind fashion.

Necropsy procedure

All surviving pigs were euthanized at 7 dpc as described above. Pigs were necropsied and a portion of the last 3 cm of the distal ileum was placed on ice for bacteriological examination and an additional portion of jejunum was placed on ice for an adhesion test as previously described (Baker et al., 1997) to determine the presence of F4 receptors (F4R) in the brush borders of each pig, as described below.

Bacteriological examination

Fecal swabs and necropsy tissue samples were weighed, suspended in 1 mL of phosphate-buffered saline (PBS), and tissues were homogenized at 5000 RPM using a CAT X-120 homogenizer (Polyscience, Nile, Ill). Ten-fold serial dilutions were carried out in sterile PBS and appropriate dilutions were inoculated onto 5% sheep blood agar medium containing 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ nalidixic acid, using a Spiral Plater apparatus (Spiral Plater Inc, Cincinnati, Ohio). NaI^r β -haemolytic *E. coli* colonies were counted and the concentration of CFU per gram of feces or tissue was calculated.

Multiplex PCR

Fecal swabs were incubated overnight in Luria-Bertani (LB) Broth. Twenty μl of the overnight culture in LB broth was mixed with 500 μl of sterile water. The mixture was agitated and placed in boiling water for 10 minutes to lysis cells and to perform the DNA extraction and initial denaturation. The multiplex PCR assay was performed on the genomic DNA isolated from fecal samples using 10 X PCR buffer (InterScience, Markham, Canada), 0,2 mM of each dNTP (Amersham Biosciences, Baie d'Urfe, Canada), 50 mM of MgCl_2 , 1 unit Biotools DNA Polymerase (InterScience, Markham, Canada), and the different primers (BioCorps, Montreal, Canada), as shown in Table 3. Thermocycling was initiated using 95°C for 2 minutes in a PTC-0200 DNA engine Thermal Cycler (MJ Research, Hayward, Canada). Subsequent 25 cycles were made at 94°C for 30 seconds followed by an alignment of primers at 60°C for 30 seconds and

extension at 72°C for 30 seconds. The PCR product obtained following migration on ethidium bromide agarose gel was noted in Table 3 for each detected gene.

F4 receptor detection in brush borders

Brush borders were prepared as previously described (Baker et al., 1997). Briefly, 7 cm of ileal tissue collected within the previous two hours was opened longitudinally and immersed in a cold hypotonic EDTA solution (5 mM EDTA, adjusted to pH 7.4 with 0.5 M Na₂CO₃). The epithelial cells were removed by scraping the mucosal surface of the tissue with a glass microscope slide and placed in 50 mL cold hypotonic EDTA solution. After incubation for 30 minutes at 4°C, the cells were homogenized in a tissue grinder and centrifuged at 1200 x g for 10 minutes at 4°C to pellet the brush border vesicles. The pellet was suspended in 50 mL of cold PBS pH 7.4 and the centrifugation was repeated using the same conditions. Pelleted brush borders were resuspended in 5 mL of cold PBS supplemented with 100 µL each of gentamicin sulphate (1 mg/mL) and sodium azide (3 mM) and stored at 4°C until the adhesion test was performed.

The presence of F4Rs on brush borders of pigs was evaluated as described previously (Baker et al., 1997; Sellwood et al., 1975). Adhesion tests were performed using ECL 8559 as the positive control strain for F4 and ECL 3463 (previously called 862B) (Ngeleka et al., 1993), as negative control strain. The strains were incubated in LB at 37°C overnight with agitation. The cultures were centrifuged at 2000 X g for ten minutes at room temperature. Pelleted bacteria were resuspended in 5 mL PBS pH 7.4 (containing 0,5% mannose). The previously prepared brush border suspensions were mixed by inversion. A volume of 100 µL of bacterial suspension was added to 200 µL of brush border suspension in a sterile eppendorf tube. After an hour of incubation at 37°C, 15 µL was dropped on a glass microscope slide and observed using a phase contrast microscope. Ten brush borders per pig were visualized for each strain. Individual brush border vesicles were considered adhesive (presence of F4R) when more than two bacteria adhere to the brush border membrane.

Statistical analysis

In vitro analysis of acidity resistance

The IgY protective effect offered to IgY by microcapsulation process to pHs was assessed with a stepwise forward multiple linear regression, where the proportion of the initial dose remaining in

the formulation was examined as a function of pH, time of incubation, and microencapsulation, and the pH*time interaction using $P=0.15$ as inclusion threshold for a given variable (Neter 1989). Data were analysed using the program SAS 9.0.

Results

Distribution among the groups formed

The table 2 shows the number of pigs in each group and their corresponding gender.

Anti-F4 IgY resists spray-drying and microencapsulation

Spray-drying, at the temperatures mentioned above, was well tolerated by anti-F4 IgY. Effectively, no reduction in levels of anti-F4 IgY was observed by indirect ELISA in comparison to samples taken before the process. Microencapsulation resulted in the formation of small beads (maximum size of 1 mm) of EP in the oil matrix. The EP, containing or not the anti-F4 IgY, was released from the microencapsulated beads and tested by indirect ELISA. No reduction in levels of specific anti-F4 IgY was observed following microencapsulation of EP+ and no specific anti-F4 IgY was found in EP- (data not shown).

Microencapsulation effectively protects anti-F4 IgY against acidity for at least 4 hours.

In microencapsulated EP+ held at pH 2.0, the level of anti-F4 IgY activity remained at 60% of the initial value after 30 minutes, an activity of 24% still being observed after 4 hours (Figure 1). In microencapsulated EP+ held at pH 4.0, the anti-F4 IgY activity remained at 60% even after 4 hours. A remaining anti-F4 IgY activity of more than 70% was observed after 4 hours at pH 7.0 and pH 8.0. On the other hand, the anti-F4 IgY activity remain at less than 10% for non-microencapsulated EP held at pH 2.0, and 20% after 30 minutes at pH 4.0, pH 7.0, and pH 8.0. As detected by statistical analysis, degradation of anti-F4 is proportional to time ($P<0.0001$), is increased with decreasing pH ($P=0.0026$), but microencapsulation dramatically lowers such degradation ($P<0.0001$). These results suggested that the anti-F4 IgY in microencapsulated EP+ would be able to withstand the pH conditions encountered during passage through the stomach and small intestine, following oral administration.

Anti-F4 IgY in microencapsulated EP+ is able to withstand passage through the stomach and to reach the small intestine following oral administration in weaned pigs

The ability of anti-F4 IgY to reach the small intestine was examined in weaned pigs following oral administration of microencapsulated EP+. Anti-F4 IgY was detected by indirect ELISA in 15 of the 20 duodenum-jejunum contents examined, in 22 of the 25 jejunum-ileum contents examined and in 0 of the ten cecum contents examined. These results provide strong evidence for an effective protection of the anti-F4 IgY by microencapsulation, throughout much of the small intestine.

Anti-F4 IgY in microencapsulated EP+ is able to withstand pelleting and storage of feed

Our *in vitro* results encouraged us to examine the ability of anti-F4 IgY in microencapsulated EP+ to protect against development of disease following challenge with a pathogenic ETEC. As many commercial feeds for pigs are pelleted, it would be desirable to carry out such a study using a pelleted feed. In order to determine the ability of the anti-F4 IgY in microencapsulated EP+ to withstand the pelleting process, microencapsulated EP+ or EP- was incorporated into a commercial feed prior to pelleting. Following release of the anti-F4 IgY from the microencapsulated beads in the pelleted feed, no reduction in activity of specific anti-F4 IgY was observed in Feed B in comparison to levels prior to pelleting, as detected by an indirect ELISA. No specific anti-F4 IgY was found in feed A or feed C. In addition, pelleted food B was stored at room temperature and humidity to determine the ability of the anti-F4 IgY to remain stable in these conditions. No reduction in the level of specific anti-F4 IgY activity was observed following up to 10 months of storage.

Effect of administration of a pelleted feed containing microencapsulated EP+ or EP- on induction of diarrhea in an F4-positive ETEC challenge model

None of the pigs demonstrated NaI^f β -hemolytic *E. coli* colonies on fecal culture prior to bacterial challenge. In F4R-positive animals of the control group not receiving microencapsulated EP, the median fecal consistency score increased to 3 at the second day post-challenge, and remained higher than 2 until at least day 7 post-challenge. Diarrhea was not observed in F4R-negative pigs, independently of the treatment group (Data not shown), although the median fecal consistency score increased to 2 at day 5 post-challenge. Since this increase was observed in F4R-negative animals, it was considered that this diarrhea was not ETEC-specific. On the other hand, the median fecal consistency score of F4R-positive pigs receiving microencapsulated EP+ or EP-

was lower than that of the control group at all observation times from day 2 post-challenge (Figure 2). Interestingly, only the F4R-positive pigs of the group receiving microencapsulated EP+ demonstrated a median score below 2 on the first day after challenge, suggesting an effective protection by specific anti-F4 IgY in the early steps of infection.

Most F4R-positive pigs in the control group manifested diarrhea on each day following challenge, until day 7 (Figure 3). On the other hand, less than 50% of the F4R-positive pigs receiving microencapsulated EP+ demonstrated diarrhea on each day following challenge. In F4R-positive pigs receiving microencapsulated EP-, the proportion of pigs demonstrating diarrhea on day 1 post-challenge was similar to that of the control group, but decreased to less than 40% from day 2 post-challenge and less after. This decrease was not constant. On the other hand, the cumulative percentage of F4R-positive pigs with diarrhea was significantly lower in pigs receiving microencapsulated EP+ or EP- than in control pigs, from day 2 post-challenge (Data not shown). Overall, no difference was observed between the 2 groups receiving microencapsulated EP, approximately 80% of F4R-positive animals developing diarrhea for both groups.

The mean number of days with diarrhea and duration of diarrhea were lower in both groups receiving microencapsulated EP+ or EP-, than in the control group, although this difference was not significant (Data not shown). The number of days with diarrhea corresponded to the sum of all days on which diarrhea was observed. The duration of the diarrhea corresponded to the sum of all days between the first day and the last day on which diarrhea was observed. Each observations was noted for a maximum of eight days of diarrhea following the F4+ ETEC challenge.

Effect of administration of a pelleted feed containing microencapsulated EP+ or EP- on fecal shedding and ileal colonization of the F4-positive ETEC challenge strain

When all pigs were considered, fecal shedding of the F4-positive ETEC challenge strain was observed at a high level (median bacterial count of $> 1 \times 10^8$) in pigs of the control group, from day 1 to day 5 post-challenge, with a gradual decrease beginning at day 5 post-challenge (Data not shown). On the other hand, the level of fecal shedding of the challenge strain in the pigs receiving microencapsulated EP+ or EP- was at least 2 log less than that of pigs of the control group, from day 2 post-challenge.

When only F4R-positive pigs were considered (Figure 4), the level of fecal shedding of the challenge strain in pigs of the control group was similar to that observed for all pigs. Pigs receiving microencapsulated EP- demonstrated a level of shedding of the challenge strain similar to that of the control group. On the other hand, pigs receiving microencapsulated EP+ demonstrated a level of shedding of the challenge strain of 1 to 2 log less than that of the control group, until 5 days post-challenge.

Little colonization of the ileum by the challenge strain was observed at the time of necropsy, a maximum median of 1×10^3 CFU/g of ileum being found for all groups. This correlates with the low level of fecal shedding of the challenge strain at the time of necropsy, 7 days post-challenge, reflecting the fact that peak colonization of the small intestine by ETEC occurs in the first several days following initial infection. There was no significant difference between the median for F4R-positive pigs of each group

Effect of administration of a pelleted feed containing microencapsulated EP+ or EP- on average weight gain in an F4-positive ETEC challenge model

No significant difference in weight gain was observed between groups, either when all pigs or only the F4R-positive pigs were considered (Data not shown).

Discussion

Oral passive immunotherapy using anti-F4 IgY has been used by several researchers for the control of PWECD in pigs. It appears to be effective in challenge studies, although results are equivocal in field studies. However, this approach is probably not very cost effective because relatively high amounts of egg yolk powder containing specific IgY are required to be efficacious, due to the loss of IgY during the passage through the stomach and upper small intestine. In addition, much of the IgY added to a diet pre-pelleting would be inactivated due to the high temperatures used during the pelleting. We have recently demonstrated that the use of CpG-ODN as an adjuvant in the immunization of hens with F4 antigen results in a greatly increased yield of specific anti-F4 IgY in the eggs. The results of the present paper have clearly shown that, in addition, lipid microencapsulation of egg powder protects anti-F4 IgY during pelleting of feed and subsequently during passage through the stomach and intestine, thus

resulting in detectable levels of specific anti-F4 IgY in most of the small intestine of pigs having received lipid microencapsulated egg powder containing anti-F4 IgY orally. Oral administration of microencapsulated egg powder containing anti-F4 IgY resulted in a reduction of severity and prevalence of diarrhea and reduced fecal shedding of the challenge strain in F4R-positive pigs challenged with an F4-positive ETEC as compared to challenged F4R-positive pigs not receiving egg powder, probably related to a decreased colonization of the intestine. In comparison, Chernysheva et al. (2004) did not detect an appreciable level of anti-F4 IgY in the small intestine contents of pigs having received powdered egg yolk containing non-protected anti-F4 IgY, suggesting that protection of IgY is essential to permit its release in sufficient quantities in the small intestine following oral administration.

Our initial *in vitro* experiment demonstrated that even at a pH as low as 2.0, about 25% activity of anti-F4 IgY, when lipid microencapsulated, remained after 4 hours. The proportion of activity remaining after 4 hours increased substantially to over 60% when a pH of 4.0 or higher was tested. Gastric pH in pigs ranges mostly from 3.0 to 4.0, depending on time of day and diet (Rice et al., 2002). Hence our results suggest that a high proportion of anti-F4 IgY lipid microencapsulated in egg powder would survive passage through the stomach. On the other hand, it was surprising to observe a decrease in remaining activity of anti-F4 IgY in non-microencapsulated egg powder held at a pH 7.0 and more basic, when other authors (Hatta et al., 1993; Shimizu et al., 1992) observed no drop in remaining activity of specific IgY held at these pHs. We subsequently found that anti-F4 IgY activity remained at 100% in non-microencapsulated egg powder incubated at pH 7.0 in the presence of a cocktail of protease inhibitors (Pepstatin: 0,7 µg/mL, Aprotinin: 2,0 µg/mL, Leupeptine: 2,0 µg/mL, EDTA: 1 mM), suggesting that the decreased level of anti-F4 IgY activity was due to proteases present in the whole egg preparation and active at neutral or basic pH.

Previous studies showed that specific IgY against rotavirus (anti-VP8) microencapsulated with a pH-sensitive methacrylic acid copolymer was better able to withstand passage through the acid conditions of the stomach and reach the distal small intestine than non-encapsulated IgY, and retained greater specific activity, when pigs were examined three hours after a single oral administration of the IgY (Kovacs-Nolan et Mine, 2005). We have now shown that lipid microencapsulated anti-F4 IgY given daily to pigs in the feed over a period of more than one week, as would occur in commercial conditions, is also able to reach the distal small intestine and

retains its specific activity, as determined by indirect ELISA. Similarly, in pigs fed a lipid microencapsulated blend of sorbic acid and vanillin, a slow release of both these ingredients was observed along the small intestine, whereas a more rapid decline in the concentration of these ingredients from the jejunum onwards was observed in pigs fed the non-encapsulated blend (Piva et al., 2006).

We have shown that the lipid microencapsulated anti-F4 IgY remains active following pelleting, possibly due to a sufficiently high lipid melting point which protects the IgY against the pelleting temperatures. The finding of a decreased fecal shedding of an F4-positive ETEC strain in challenged F4R-positive pigs receiving a pelleted feed containing lipid microencapsulated anti-F4 IgY-positive egg powder as compared those receiving a pelleted feed containing lipid microencapsulated anti-F4 IgY-negative egg powder suggests a role for the specific anti-F4 IgY in inhibiting intestinal colonization of the F4 ETEC. This could partially explain the decreased severity of diarrhea observed in the pigs receiving a pelleted feed containing lipid microencapsulated anti-F4 IgY-positive egg powder, as compared to the control challenged pigs receiving no microencapsulated egg powder. Unexpectedly, feeding of a pelleted feed containing lipid microencapsulated anti-F4 IgY-negative egg powder also resulted in a reduction of the severity and prevalence of diarrhea starting on the 2nd day after challenge, and led to a decreased fecal shedding of the challenge strain when all pigs were considered, although this was not observed when only F4R-positive pigs were considered. These results suggest that an additional factor in whole eggs, which may have been protected by microencapsulation and thus been delivered to the small intestine in functional quantities, may also inhibit the intestinal colonization of the F4-positive ETEC challenge strain. Possible constituents of whole eggs which may affect bacterial colonization include lysozyme, anti-*E. coli* IgY, or some high molecular components (Kassaify et al., 2005), and such constituents may also be effective in the control of other bacterial pathogens in the intestine. To be widely accepted for use by producers, a prophylactic PWECD treatment must be cost-effective and easy to administrate to pigs. The lipid microencapsulated anti-F4 IgY-positive egg powder meets these criteria, being easily incorporated into widely used pelleted feeds and resisting storage at ambient temperature and humidity for a prolonged period of time.

In addition, a smaller quantity of egg powder than described previously (Owusu-Asiedu et al., 2002; Owusu-Asiedu et al., 2003), was used in our studies. The comparative efficacy of this

preparation could be explained by one or more of the following differences between our preparation and those described previously: the more effective immunization of laying hens, and/or the microencapsulation of the IgY with an effective delivery system, and the use of whole egg powder instead of egg yolk powder, containing a wider array of anti-bacterial factors. The egg powder concentration usually reported for administration in pig feeds is 0,5% of egg yolk. In our experiments, we used 0,5% of whole egg powder corresponding to 0.16% of egg yolk (considering a yolk dilution factor of 1:3.15 in the whole egg) with a high anti-F4 IgY rate. The reduction of clinical signs observed in our study indicate a well formulated food supplementation. This decrease of quantity of EP in feed corresponds to an important reduction of production cost.

In other studies, a higher quantity of bacteria is usually used to challenge pigs than that used in our experiments, often associated with a much higher mortality rate (Jensen et al., 2006; Owusu-Asiedu et al., 2002; Owusu-Asiedu et al., 2003). We used a lower challenge dose to mimic more closely the usual situation in a natural infection, where the bacteria colonize the intestine more gradually, thus giving the IgY more time to be effective. This allowed us to follow the clinical signs during the entire experimental time, and to examine the effect of the microencapsulated egg powder containing or not anti-F4 IgY on bacterial colonization and fecal shedding. Moreover, a low infectious charge allowed a more complete observation of variation in clinical signs including a reduction of its severity by the microencapsulated egg powder.

No effect on weight gain was observed in our study. It is possible that the time between challenge and necropsy of pigs was not long enough for differences in the effect of the various treatments to be manifested. In addition, the feed, management, and intestinal flora conditions in this type of experimental challenge do not accurately reflect those of commercial production. A complementary study should be conducted in farm conditions where the treated pigs should be followed from weaning through to slaughter.

Conclusion

Passive immunotherapy using microencapsulated egg powder containing anti-F4 IgY as an ingredient in pelleted feed is a promising alternative for the prevention of PWECD due to F4-positive ETEC in large numbers of pigs, providing an efficacious, more cost effective, and minimal labour approach in the control of PWECD. However, since egg powder had good results, further studies should be carried out to determine the active component in eggs and to compare the cost of using whole eggs or purified components.

Acknowledgments

The authors thank Jérôme R.E. del Castillo for the statistical analysis of the pH resistance *in vitro* test. Sébastien Lévesque was supported in part by the Research Group on Infectious Diseases of Swine (GREMIP).

Literature cited

- Amezcuca, R., R. M. Friendship, C. E. Dewey, C. Gyles and J. M. Fairbrother (2002) *Presentation of postweaning Escherichia coli diarrhea in southern Ontario, prevalence of hemolytic E. coli serogroups involved, and their antimicrobial resistance patterns*, Can J Vet Res.66; (2): 73-78
- Baker, D. R., L. O. Billey and D. H. Francis (1997) *Distribution of K88 Escherichia coli-adhesive and nonadhesive phenotypes among pigs of four breeds*, Vet Microbiol.54; (2): 123-132
- Chernysheva, L. V., R. M. Friendship, C. E. Dewey and C. L. Gyles (2004) *The Effect of Dietary Chicken Egg-Yolk Antibodies on the Clinical Response in Weaned Pigs Challenged with a K88+ Escherichia coli Isolate*, J. Swine Health Prod.12; (3): 119-122
- Chernysheva, L. V., R. M. Friendship, C. L. Gyles and C. E. Dewey (2003) *Field trial assessment of the efficacy of specific egg-yolk antibody product for control of postweaning E. coli diarrhea*, Vet Ther.4; (3): 279-284
- Fairbrother, J. M., E. Nadeau and C. L. Gyles (2005) *Escherichia coli in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies*, Anim Health Res Rev.6; (1): 17-39
- Fairbrother, J. M. (2004) *Guide to Pathogenic Mechanisms and Virulence Determinants of Escherichia coli Causing Disease in Animals*,

- Frydendahl, K. (2002) *Prevalence of serogroups and virulence genes in Escherichia coli associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches*, Vet Microbiol.85; (2): 169-182
- Furrer, B., U. Candrian and J. Luthy (1990) *Detection and identification of E. coli producing heat-labile enterotoxin type I by enzymatic amplification of a specific DNA fragment*, Lett Appl Microbiol.10; (1): 31-34
- Girard, F., I. Batisson, G. Martinez, C. Breton, J. Harel and J. M. Fairbrother (2006) *Use of virulence factor-specific egg yolk-derived immunoglobulins as a promising alternative to antibiotics for prevention of attaching and effacing Escherichia coli infections*, FEMS Immunol Med Microbiol.46; (3): 340-350
- Girard, F., I. P. Oswald, I. Taranu, P. Helie, G. D. Appleyard, J. Harel and J. M. Fairbrother (2005) *Host immune status influences the development of attaching and effacing lesions in weaned pigs*, Infect Immun.73; (9): 5514-5523
- Hatta, H., K. Tsuda, S. Akachi, M. Kim and T. Yamamoto (1993) *Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG*, Biosci Biotechnol Biochem.57; (3): 450-454
- Jensen, G. M., K. Frydendahl, O. Svendsen, C. B. Jorgensen, S. Cirera, M. Fredholm, J. P. Nielsen and K. Moller (2006) *Experimental infection with Escherichia coli O149:F4ac in weaned piglets*, Vet Microbiol.
- Kassaify, Z. G., E. W. Li and Y. Mine (2005) *Identification of antiadhesive fraction(s) in nonimmunized egg yolk powder: in vitro study*, J Agric Food Chem.53; (11): 4607-4614
- Kovacs-Nolan, J. and Y. Mine (2005) *Microencapsulation for the gastric passage and controlled intestinal release of immunoglobulin Y*, J Immunol Methods.296; (1-2): 199-209
- Lee, K. A., S. K. Chang, Y. J. Lee, J. H. Lee and N. S. Koo (2002) *Acid stability of anti-Helicobacter pylori IgY in aqueous polyol solution*, J Biochem Mol Biol.35; (5): 488-493
- Lévesque, S., G. Martinez and J. M. Fairbrother (2007) *Improvement of Adjuvant Systems to Obtain a Cost-Effective Production of High Levels of Specific IgY*, Poultry Science.86; In Press
- Lortie, L. A., J. D. Dubreuil and J. Harel (1991) *Characterization of Escherichia coli strains producing heat-stable enterotoxin b (STb) isolated from humans with diarrhea*, J Clin Microbiol.29; (3): 656-659
- Neter, J., W. Wasseman and M. H. Kutner (1989) *Applied Linear Regression Models, Second Edition*.
- Ngeleka, M., M. Jacques, B. Martineau-Doize, F. Daigle, J. Harel and J. M. Fairbrother (1993) *Pathogenicity of an Escherichia coli O115:K"V165" Mutant Negative for F165(1)*

Fimbriae in Septicemia of Gnotobiotic Pigs, Infect Immun.61; (3): 836-843

- Noamani, B. N., J. M. Fairbrother and C. L. Gyles (2003) *Virulence Genes of O149 Enterotoxigenic Escherichia coli from Outbreaks of Postweaning Diarrhea in Pigs*, Vet Microbiol.97; (1-2): 87-101
- Ojeniyi, B., P. Ahrens and A. Meyling (1994) *Detection of fimbrial and toxin genes in Escherichia coli and their prevalence in piglets with diarrhoea. The application of colony hybridization assay, polymerase chain reaction and phenotypic assays*, Zentralbl Veterinarmed B.41; (1): 49-59
- Owusu-Asiedu, A., S. K. Baidoot, C. M. Nyachoti and R. R. Marquardt (2002) *Response of early-weaned pigs to spray-dried porcine or animal plasma-based diets supplemented with egg-yolk antibodies against enterotoxigenic Escherichia coli*, J Anim Sci.80; (11): 2895-2903
- Owusu-Asiedu, A., C. M. Nyachoti, S. K. Baidoo, R. R. Marquardt and X. Yang (2003) *Response of early-weaned pigs to an enterotoxigenic Escherichia coli (K88) challenge when fed diets containing spray-dried porcine plasma or pea protein isolate plus egg yolk antibody*, J Anim Sci.81; (7): 1781-1789
- Piva, A., V. Pizzamiglio, M. Morlacchini, M. Tedeschi and G. Piva (2006) *Lipid microencapsulation allows slow release of organic acids and natural identical flavors along the swine intestine*, J Anim Sci.
- Rice, P. (2002) *The Effects of Phytase and Citric Acid Addition to Pig Diets on Digestibility, Gastric pH, and Digesta Transit Time Through the Gut*. M.S. Thesis. Purdue University.
- Sarmiento, J. I., T. A. Casey and H. W. Moon (1988) *Postweaning diarrhea in swine: experimental model of enterotoxigenic Escherichia coli infection*, Am J Vet Res.49; (7): 1154-1159
- Schade, R., C. Staak, C. Hendriksen, M. Erhard, H. Hugl, G. Koch, A. Larsson, W. Pollmann, M. van Regenmortel, E. Rijke, H. Spielmann, H. Steinbusch and D. Straughan (1996) *The Production of Avian (Egg Yolk) Antibodies:IgY. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 21*, ATLA.24; 925-934
- Sellwood, R., R. A. Gibbons, G. W. Jones and J. M. Rutter (1975) *Adhesion of enteropathogenic Escherichia coli to pig intestinal brush borders: the existence of two pig phenotypes*, J Med Microbiol.8; (3): 405-411
- Shimizu, M., H. Nagashima, K. Sano, K. Hashimoto, M. Ozeki, K. Tsuda and H. Hatta (1992) *Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G*, Biosci Biotechnol Biochem.56; (2): 270-274
- Walters, J. and R. Sellwood (1982) *Aspects of genetic resistance to K88 E. coli in pigs* In: World Congress on Genetic Applied to Livestock Production. Madrid, Espagne. 362-367

Table 1) Composition of diets fed to pigs

Item		Feed A	Feed B	Feed C
		Ctl-group	EP+ group	EP- group
Total calcium	%	0,7322	0,7320	0,7320
Buffering value	meq	712,4745	710,5935	710,5935
Added copper	mg/kg	20,6823	20,6823	20,6823
Calculated digestible energy (DE)	MJ/KG	15,2704	15,1061	15,1061
Crude fiber	%	2,3262	2,3031	2,3031
Fat	%	7,3690	7,3313	7,3313
Dry matter	%	89,9447	88,9706	88,9706
Neutral detergent fiber (NDF)	%	6,3004	6,2038	6,2038
Total phosphorus	%	0,7046	0,7019	0,7019
Phytase	FTU/KG	499,9984	499,9984	499,9984
Crude protein	%	20,4599	20,3782	20,3782
Added selenium	mg/kg	0,3000	0,3000	0,3000
Total sodium	%	0,1999	0,1998	0,1998
Total lysine	%	1,4410	1,4384	1,4384
Added vitamin A	IU/kg	14564,4	14564,4	14564,4
Added vitamin D	IU/kg	1500,0	1500,0	1500,0
Added vitamin E	IU/kg	100,0001	100,0001	100,0001
Microencapsulated whole egg powder containing anti-F4 IgY	kg/ton		11,4000	
Microencapsulated whole egg powder not containing anti-F4 IgY	kg/ton			11,4000
Added zinc	mg/kg	156,7495	156,7495	156,7495

Table 2) Composition of treated groups

	F4R +		F4R -		Dead*	Total
	♀	♂	♀	♂		
Control group (A)	6	6	4	3	1♀	20
EP- group (C)	2	8	4	5	1♂	20
EP+ group (B)	8	10	7	14		39
Total	16	24	15	22	2	79

* Two pigs deceded before the end of the experiment.

Table 3) Multiplex PCR primers, PCR products and references for all the detected genes

Protein	Primers	PCR product (pb)	References
STa	For 5'-TCC CCT CTT TTA GTC AGT CAA CTG-3' Rev 5'-GCA CAG GCA GGA TTA CAA CAA AGT-3'	275	(Furrer et al., 1990)
STb	For 5'-GCA ATA AGG TTG AGG TGA T-3' Rev 5'-GCC TGC AGT GAG AAA TGG AC-3'	163	(Noamani et al., 2003)
LT	For 5'-TTA CGG CGT TAC TAT CCT CTC TA-3' Rev 5'-GGT CTC GGT CAG ATA TGT GAT TC-3'	368	(Lortie et al., 1991)
F4	For 5'-ATC GGT GGT AGT ATC ACT GC-3' Rev 5'-AAC CTG CGA CGT CAA CAA GA-3'	601	(Ojeniyi et al., 1994)

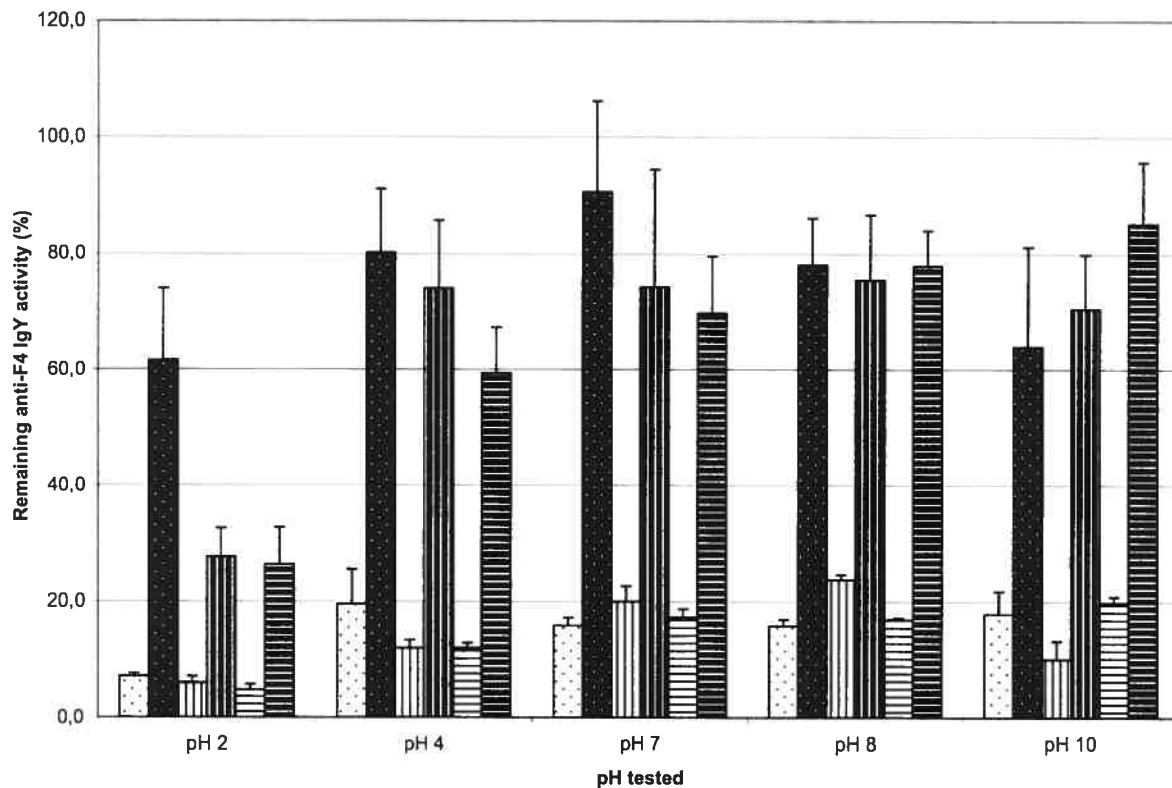


Figure 1. Remaining activity of anti-F4 IgY following incubation at different physiological pHs for various periods of time.

□ Non-microencapsulated EP incubated for 30 minutes,

■ Microencapsulated EP incubated for 30 minutes,

▨ Non-microencapsulated EP incubated for 2 hours,

▩ Microencapsulated EP incubated for 2 hours,

▧ Non-microencapsulated EP incubated for 4 hours, and

▦ Microencapsulated EP incubated for 4 hours.

All bars represent means of three to six independent indirect ELISA results. Error bars represent standard error.

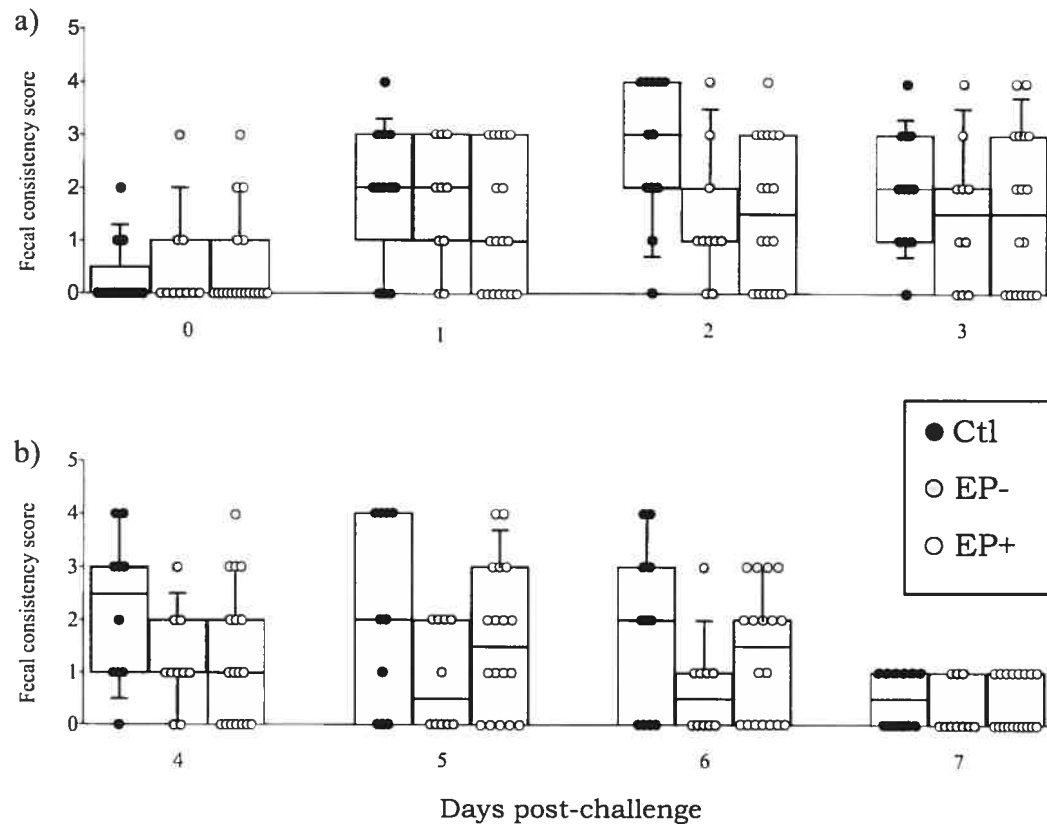


Figure 2. Severity of diarrhea in F4R-positive pigs following challenge with an F4-positive ETEC strain. Pigs received no microencapsulated egg powder (ctl-group, n= 12), microencapsulated egg powder containing anti-F4 IgY (EP+ group, n=18) or not containing anti-F4 IgY (EP- group, n=10). Each dot represents a pig. A box plot was added to visualize the median data (middle horizontal bar), which was used for further analyses.

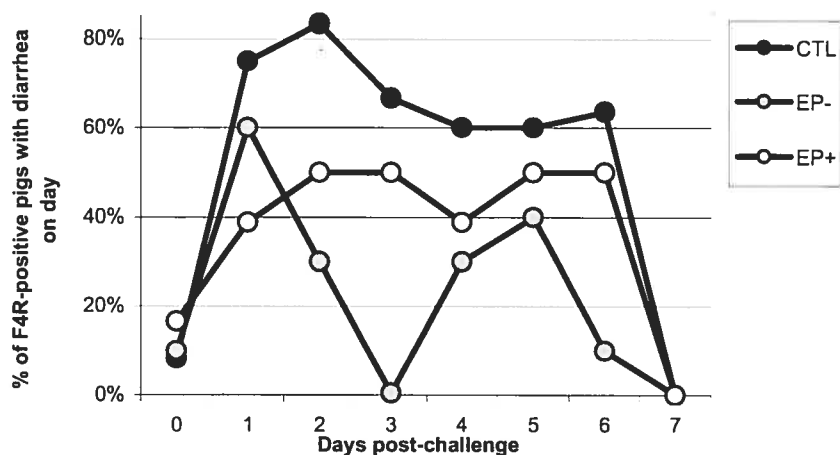


Figure 3. Proportion of F4R-positive pigs with diarrhea for each day after challenge with a F4-positive ETEC strain. Pigs received no microencapsulated egg powder (ctl-group, n= 12), microencapsulated egg powder containing anti-F4 IgY (EP+ group, n=18) or not containing anti-F4 IgY (EP- group, n=10). Pigs with a fecal consistency score of 2 or more were considered to have diarrhea.

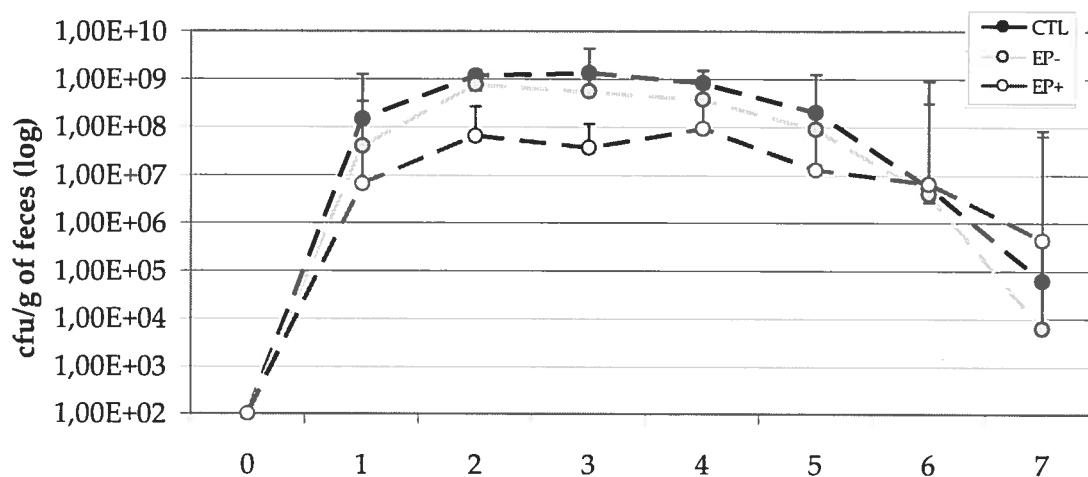


Figure 4. Median bacterial counts of shedding of challenge F4-positive ETEC strain in the feces for F4R-positive pigs, in log. Pigs received no microencapsulated egg powder (ctl-group, n= 12), microencapsulated egg powder containing anti-F4 IgY (EP+ group, n= 18), or not containing anti-F4 IgY (EP-group, n= 10). Error bars represent standard error.

DISCUSSION ET CONCLUSION

7. Discussion

Actuellement, la majorité des auteurs s'entendent sur le potentiel théorique de l'approche par immunothérapie passive. La technique peut s'avérer utile en administrant par voie orale les immunoglobulines IgY spécifiques provenant de jaunes d'œufs de poules immunisées avec des antigènes appropriés dans la prévention des infections intestinales. Toutefois, plusieurs études se sont heurtées à un échec thérapeutique de la stratégie dans le cas de la diarrhée post-sevrage (dps) due à *E. coli* entérotoxigène (ETEC) chez le porc. Plusieurs facteurs peuvent être responsables de ces résultats. Notamment, l'administration d'IgY spécifiques pour l'adhésine F4 des ETEC, purifiées plutôt que l'œuf entier, et le manque de protection envers l'acidité gastrique menant à une inactivation d'une grande portion des IgY lors de leur passage par l'estomac. De plus, plusieurs des modèles expérimentaux d'infection avec des souches ETEC utilisées jusqu'à maintenant pour évaluer l'efficacité d'une telle stratégie pour la prévention de la dps ne miment pas l'infection naturelle. Effectivement, ce type d'infection peut mener rapidement à la mortalité de la majorité des animaux infectés, il est donc difficilement concevable que ces infections miment une dps naturelle, puisqu'en milieu d'élevage, la mort survient suite à une colonisation de la souche ETEC infectante se manifestant par une période de déshydratation et de dépression pouvant durer plusieurs jours.

À la vue des difficultés rapportées dans la littérature, nous avons tenté, dans ce projet, de rentabiliser l'approche de prévention de la dps par l'immunothérapie passive, tout en obtenant des données qui valident l'approche.

Une attention particulière a été apportée au protocole d'immunisation des poules avec l'adhésine F4 comme immunogène, développé lors de ce projet. Effectivement, ce protocole a été créé en prenant soin de réduire les coûts ainsi que la manipulation des animaux, sans toutefois négliger la réponse immunitaire. C'est ainsi que cette amélioration a limité au minimum les rappels d'immunisations nécessaires, soit une à 14 jours ainsi qu'à 35 ou 49 jours (5-7 semaines). Cette réduction a une importance primordiale puisque la manipulation des poules pondeuses crée un stress important à l'animal diminuant ainsi leur ponte dans les jours suivant l'injection de l'immunogène. Donc, en réduisant le nombre de rappels, la diminution du nombre d'œufs pondus est minimale résultant en une augmentation de la quantité globale d'IgY spécifiques produites.

La réduction des coûts d'immunisation se manifeste principalement par la supplémentation de l'immunogène F4 et l'adjuvant incomplet de Freund avec une séquence spécifique de CpG-ODN non-méthylé comportant une modification phosphorothioate entre les nucléotides. Cette modification permet au CpG-ODN de résister à la dénaturation par les nucléases lorsqu'il est injecté (Sands et al., 1994) et donc de réduire la dose utilisée et ainsi les coûts reliés tout en obtenant une stimulation immunitaire soutenue. Effectivement, la combinaison de deux substances immunogènes permettant une potentialisation de la réponse immune a créé un effet synergique qui a permis d'augmenter de 480%, en moyenne, la quantité d'IgY spécifiques pour F4 transférées dans les œufs.

De nouvelles approches d'immunisation tentent d'augmenter la quantité d'Ig produits (Cho et al., 2004) en utilisant un plasmide contenant le gène codant la sous unité majeure FaeG du fimbria F4 en tandem avec le gène de IL-6 de poule. Toutefois, une mise au point ainsi qu'un ajustement de la dose sont encore requis avant que de tels protocoles soient efficaces. Le protocole développé ici ne nécessite aucun ajustement supplémentaire et peut donc être utilisé par des utilisateurs possédant peu d'expérience et de connaissances immunologiques puisqu'il s'agit du raffinement d'une technique éprouvée depuis plus d'une décennie.

De plus, il était primordial de vérifier que les IgY produits ne seraient pas affectées, tant au niveau de la quantité qu'au niveau de leur activité immunologique, suite à la conservation des œufs dans les conditions de production. Effectivement, les œufs produits en ferme de production sont conservés à des températures légèrement supérieures à celles obtenues par un réfrigérateur traditionnel. Ce dernier test réitère que le protocole d'immunisation est fonctionnel en ferme de production, afin d'obtenir rapidement une grande quantité d'IgY spécifiques et ce, pour la durée totale de la ponte, soit une année, si l'immunisation est maintenue de façon constante.

Dans la même expérience, les résultats obtenus suite à la supplémentation de l'immunogène F4 et l'adjuvant incomplet de Freund par $1\alpha,25$ -dihydroxivitamine D3 n'ont pas été positifs. Il est vraisemblable que la dose utilisée n'était pas adéquate à la potentialisation de la stimulation immunitaire. Effectivement, la concentration d' $1\alpha,25$ -dihydroxivitamine D3 utilisée dans ce protocole a été choisie de façon très conservatrice en extrapolant la quantité utilisée dans des

protocoles d'immunisation chez l'espèce porcine (Van der Stede et al., 2003; Van Der Stede et al., 2004). La concentration n'a pas été augmentée puisque ce dérivé de la vitamine D est très toxique et qu'il s'agit de sa première utilisation documentée chez la poule afin de produire des anticorps spécifiques. Notamment, il doit être notifié qu'aucun signe d'effet secondaire n'a été observé à la concentration utilisée.

L'enrobage lipidique utilisé dans le présent projet permet notamment de protéger les IgY envers l'acidité gastrique tout en servant de véhicule de livraison directement au niveau de l'intestin, soit au site d'infection. Ces deux caractéristiques découlant de l'enrobage des IgY permettent d'en réduire la quantité incorporée à la nourriture afin de prévenir la dps à ETEC chez le porc. C'est ainsi qu'en tenant compte du ratio de conversion de 3.15 entre le jaune et l'œuf entier, la quantité de poudre de jaune œuf utilisée ici est trois fois inférieure à la quantité utilisée par d'autres chercheurs dans les essais d'efficacité (Owusu-Asiedu et al., 2002; Owusu-Asiedu et al., 2003a; Owusu-Asiedu et al., 2003b), augmentant la rentabilité de la production du produit.

De plus, l'enrobage lipidique utilisé dans le présent projet permet de protéger les IgY envers le procédé utilisé dans le cubage des aliments, facilitant ainsi l'administration du produit. Effectivement, aucune manipulation des animaux n'est requise puisque le traitement prophylactique est intégré à leur moulée cubée. Cet avantage est indéniable, puisqu'aucune main d'œuvre supplémentaire n'est requise. De plus, puisque la technique de cubage des aliments est standard, l'ajout d'immunoglobulines spécifiques enrobées pourrait servir pour la prévention d'une multitude de maladies affectant tous les animaux consommant une moulée cubée.

Afin d'évaluer la capacité des IgY anti-F4 enrobées incorporées à la moulée des porcelets de prévenir le développement de la dps due aux souches ETEC F4-positif, notre modèle d'infection expérimentale a été raffiné. La littérature recense des infections expérimentales pouvant utiliser jusqu'à quatre inoculums de 10^{10} UFC. Puisque cette charge provoque un haut taux de mortalité rapide chez les animaux, les signes cliniques de la dps causée sont difficilement observés sur une longue période. Notre modèle a été optimisé en utilisant une charge bactérienne réduite afin de permettre une colonisation moins rapide de l'intestin et par conséquent un développement plus lent des signes cliniques. La réduction de la charge bactérienne permet d'obtenir une infection expérimentale mimant l'infection naturelle. Dans ces circonstances et puisque les animaux sont nourris avec la moulée contenant les IgY anti-F4 pour toute la période de l'expérience, il pourrait

exister, pour une période prolongée, un équilibre entre la quantité de IgY anti-F4 et les bactéries ETEC F4-positives présentes dans l'intestin, permettant un blocage efficace de l'adhérence des bactéries F4-positives aux récepteurs spécifiques dans la bordure en brosse des cellules épithéliales de la muqueuse intestinale et la prévention de l'infection.

L'excrétion bactérienne dans les fèces a subi une chute radicale à partir du cinquième jour suivant l'infection expérimentale. Toutefois, puisque la nécropsie a été effectuée à 7 jours après cette infection, la différence de colonisation dans l'iléon observée a été négligeable. Il serait donc souhaitable de rapprocher le moment de la nécropsie des animaux afin d'observer une colonisation plus forte par la souche infectante. Toutefois, la diminution de la colonisation intestinale se manifestant également par une chute de l'excrétion dans les fèces, limite la dissémination des bactéries dans l'environnement immédiat des porcelets réduisant ainsi leur possibilité de ré-infection et de propagation à l'intérieur du troupeau. Donc, en élevage, l'ajout de poudre d'œuf à la nourriture des porcelets avantagerait ceux-ci, puisqu'une réduction de la charge bactérienne présente dans l'environnement augmenterait leur chance de survie.

Cette diminution de l'excrétion fécale de la souche infectante ajoutée à la présence des IgY anti-F4 tout au long de l'intestin porcin suggère que les IgY anti-F4 ont bloqué de façon efficace l'adhésion des fimbriae à leurs récepteurs spécifiques de la bordure en brosse. La diminution subséquente des signes cliniques, tant au niveau de la sévérité que de la prévalence de la diarrhée mène au même constat. Toutefois, puisque les animaux nourris avec de la poudre d'œuf ne contenant pas d'IgY anti-F4 ont eu aussi une diminution de la sévérité et de la prévalence de leur diarrhée, cela indique que l'enrobage des œufs a protégé un composé additionnel qui a transité jusqu'au petit intestin en quantité fonctionnelle afin d'inhiber la colonisation ainsi que l'apparition des signes cliniques. Il serait souhaitable d'isoler ce composant afin d'établir ses caractéristiques menant à la protection observée.

L'expérimentation présentée ici ne durait que 7 jours suivant l'infection, elle n'a donc pas permis d'observer d'effet significatif au niveau du gain de poids des animaux. Une telle augmentation serait sûrement observable sur une période prolongée d'expérimentation soit en condition réelle d'élevage avec une contamination naturelle par les ETEC F4+, où la période post-sevrage dure environ 5 semaines, avant que les porcelets ne soient déplacés en engraissement.

Des études subséquentes approfondies pourraient confirmer si la protection offerte par la poudre d'œuf ne contenant pas d'IgY anti-F4 semble être constante, peu importe la provenance des œufs. De plus, elles pourraient indiquer s'il est préférable d'isoler le composé contenu dans la poudre d'œuf sans IgY spécifique et ayant l'effet de réduction des signes cliniques afin de l'administrer aux animaux en concomitance avec les IgY spécifiques, ou seul. Conjointement à ces études, il serait intéressant d'observer l'effet de la dose des IgY anti-F4, en augmentant leur concentration dans l'aliment au fil de la progression de l'expérience et ainsi tenter de réduire davantage les signes cliniques liés à la dps.

8. Conclusion

L'optimisation de la production d'Ig spécifiques à F4 chez la poule pondeuse utilisant CpG-ODN a permis une augmentation considérable et stable de leur transfert dans les œufs, rentabilisant ainsi une technique éprouvée depuis plusieurs années. Les propriétés immunostimulantes du mélange d'adjuvant développé, associées avec une réduction du coût et du nombre d'immunisations rendent la formulation incontournable pour la production d'Ig en grande quantité chez la poule pondeuse.

Le projet a permis le raffinement d'un modèle d'infection expérimental à ETEC chez les porcelets utilisé depuis plus d'une décennie dans notre laboratoire. Ce modèle évite une mortalité aiguë tout en permettant le développement d'une infection plus lente et l'évaluation de signes cliniques de diarrhée chez la majorité des porcelets possédant les récepteurs de F4 au niveau de leur muqueuse intestinale, suivant une infection unique avec une charge bactérienne réduite. Cette diminution de la quantité de bactéries ingérée permet l'observation de signes cliniques sur une période prolongée en limitant la mort des animaux. Ce protocole est donc propice à l'étude de l'efficacité d'un traitement prophylactique de la diarrhée post-sevrage.

L'enrobage à l'aide d'un lipide a permis aux composants actifs des œufs de transiter jusqu'au petit intestin en quantité suffisante pour réduire les signes cliniques associés à la diarrhée post-sevrage suite à une infection expérimentale avec une souche ETEC F4+. Un tel enrobage constitue donc un véhicule efficace permettant la protection ainsi que la livraison des IgY et tous les autres constituants retrouvés dans les œufs jusqu'à l'intestin porcin. Cette protection accrue permet donc la réduction de la quantité de substance active à utiliser, réduisant ainsi les coûts de production.

En conclusion, les résultats obtenus lors du présent travail laissent entrevoir un avenir prometteur à l'immunisation passive des porcelets par l'ingestion de poudre d'œufs enrobée dans la prévention de la diarrhée post-sevrage. Toutefois, il demeure que l'utilisation d'une telle stratégie deviendra possible avec une meilleure compréhension de l'effet de la poudre d'œuf ainsi qu'une expérience d'efficacité en condition réelle d'élevage incluant une infection naturelle en champs.

RÉFÉRENCES CITÉES

- Adorini, L., G. Penna, M. Casorati, A. M. Davalli and S. Gregori (2001) *Induction of Transplantation Tolerance by 1,25-dihydroxyvitamin D3*, *Transplant Proc.*33; (1-2): 58-59
- Alexa, P., K. Stouracova, J. Hamrik and I. Rychlik (2001) *Gene Typing of the Colonisation Factor K88 (F4) in Enterotoxigenic Escherichia coli Strains Isolated from Diarrhoeic Piglets*, *Veterinary Medicine Czech.*46; 46-49
- Ameiss, K. A., J. E. Attrache, A. Barri, A. P. McElroy and D. J. Caldwell (2006) *Influence of Orally Administered CpG-ODNs on the Humoral Response to Bovine Serum Albumin (BSA) in Chickens*, *Vet Immunol Immunopathol.*110; (3-4): 257-267
- Amezcuca, R., R. M. Friendship, C. E. Dewey, C. Gyles and J. M. Fairbrother (2002) *Presentation of Postweaning Escherichia coli Diarrhea in Southern Ontario, Prevalence of Hemolytic E. coli Serogroups Involved, and their Antimicrobial Resistance Patterns*, *Can J Vet Res.*66; (2): 73-78
- Andren, B. and P. S. (1983) *Acid-Base and Electrolyte Change in 1-3 Days Old Piglets Infected With Enteropathogenic Escherichia coli and in Spontaneous Cases of Piglets Diarrhoea*, *Acta Vet. Scand.*24; 84-98
- Audibert, F. M. and L. D. Lise (1993) *Adjuvants: Current Status, Clinical Perspectives and Future Prospects*, *Immunol Today.*14; (6): 281-284
- Bakker, D., P. T. Willemsen, L. H. Simons, F. G. van Zijderveld and F. K. de Graaf (1992) *Characterization of the Antigenic and Adhesive Properties of FaeG, the Major Subunit of K88 Fimbriae*, *Mol Microbiol.*6; (2): 247-255
- Ballas, Z. K., W. L. Rasmussen and A. M. Krieg (1996) *Induction of NK Activity in Murine and Human Cells by CpG Motifs in Oligodeoxynucleotides and Bacterial DNA*, *J Immunol.*157; (5): 1840-1845
- Barker, I., A. van Dreumel and N. Palmer (1993) *Edema Disease and Postweaning Escherichia coli Enteritis*. *Pathology of Domestic Animal*. 4e. Academic Press. 208-211
- Beachey, E. H. (1981) *Bacterial Adherence: Adhesin-Receptor Interactions Mediating the Attachment of Bacteria to Mucosal Surface*, *J Infect Dis.*143; (3): 325-345
- Beausoleil, H. E., F. Lepine and J. D. Dubreuil (2002) *LC-MS Analysis of Pig Intestine Sulfatides: Interaction with Escherichia coli STb Enterotoxin and Characterization of Molecular Species Present*, *FEMS Microbiol Lett.*209; (2): 183-188
- Belloc, C., D. N. Lam, V. Peron, R. Cariolet and A. Laval (2003) *Antibiorésistance en élevage*

porcins à faible niveau d'utilisation d'antibiotiques In: Journées de la Recherche Porcine. Paris. 35: 415-418

- Bianchi, A. T., J. W. Scholten, A. M. van Zijderveld, F. G. van Zijderveld and B. A. Bokhout (1996) *Parenteral Vaccination of Mice and Piglets with F4+ Escherichia coli Suppresses the Enteric Anti-F4 Response Upon Oral Infection*, *Vaccine*.14; (3): 199-206
- Blanco, M., J. E. Blanco, E. A. Gonzalez, A. Mora, W. Jansen, T. A. Gomes, L. F. Zerbini, T. Yano, A. F. de Castro and J. Blanco (1997) *Genes Coding for Enterotoxins and Verotoxins in Porcine Escherichia coli Strains Belonging to Different O:K:H Serotypes: Relationship with Toxic Phenotypes*, *J Clin Microbiol*.35; (11): 2958-2963
- Bogstedt, A. K., L. Hammarstrom and A. K. Robertson (1997) *Survival of Immunoglobulins from Different Species Through the Gastrointestinal Tract in Healthy Adult Volunteers: Implications for Human Therapy*, *Antimicrob Agents Chemother*.41; (10): 2320
- Bosi, P., I. Han, H. Jung, K. Heo, S. Perini, A. Castellazi, L. Casini, D. Creston and C. Gremokolini (2001) *Effect of Different Spray Dried Plasma on Growth, Ileal Digestibility, Nutrient Deposition, Immunity and Health of Early-Weaned Pigs Challenged with E. coli K88*, *Asian-Aust. J. Anim. Sci*.14; (8): 1138-1143
- Bouillon, R., M. Garmyn, A. Verstuyf, S. Segaeert, K. Casteels and C. Mathieu (1995) *Paracrine Role for Calcitriol in the Immune System and Skin Creates New Therapeutic Possibilities for Vitamin D Analogs*, *Eur J Endocrinol*.133; (1): 7-16
- Calinescu, C., J. Mulhbacher, E. Nadeau, J. M. Fairbrother and M. A. Mateescu (2005) *Carboxymethyl High Amylose Starch (CM-HAS) as Excipient for Escherichia coli Oral Formulations*, *Eur J Pharm Biopharm*.60; (1): 53-60
- Campbell, J., J. Crenshaw, J. Quigley, J. Polo and L. Russell (2003) *Effect of Spray-Dried Plasma Protein on Pig Performance, Carcass value, and Production Economics in a Wean-to-finish Trial* In: Allen D. Lemans Swine Conference.
- Campellone, K. G. and J. M. Leong (2003) *Tails of Two Tirs: Actin Pedestal Formation by Enteropathogenic E. coli and Enterohemorrhagic E. coli O157:H7*, *Curr Opin Microbiol*.6; (1): 82-90
- Cardinal, F. (2002) *Épidémiologie de la diarrhée colibacillaire compliquée de choc chez le porcelet en période postsevrage*. Département de Sciences Cliniques. Université de Montréal. M.Sc.
- Carlander, D. (2002) *Avian IgY Antibody. In vitro and In vivo*. Faculty of Medicine. Acta Universitatis Upsaliensis.
- Carlander, D., H. Kollberg, P. Wejaker and A. Larsson (2000) *Peroral Immunotherapy with Yolk Antibodies for Prevention and Treatment of Enteric Infections*, *Immun. Res*.21; (1): 1-6
- Carlander, D. and A. Larsson (2001) *Avian Antibodies Can Eliminate Interference Due to*

Complement Activation In ELISA, Upsala J. Med. Sci.106; 189-195

- Carlander, D., M. Wilhelmsson and A. Larsson (2001) *Limited Day to Day Variation of IgY Levels in Eggs from Individual Laying Hens*, Food and Agricultural Immunology.13; 87-92
- Carlson, M. S., G. M. Hill and J. E. Link (1999) *Early- and Traditionally Weaned Nursery Pigs Benefit from Phase-feeding Pharmacological Concentrations of Zinc Oxide: Effect on Metallothionein and Mineral Concentrations*, J Anim Sci.77; (5): 1199-1207
- Case, C. L. and M. S. Carlson (2002) *Effect of Feeding Organic and Inorganic Sources of Additional Zinc on Growth Performance and Zinc Balance in Nursery Pigs*, J Anim Sci.80; (7): 1917-1924
- CCAC, (2002) *CCAC Guideline On: Antibody Production*.
Consultée [En ligne]: 2nd March 2006.
http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/GDLINES/Antibody/antibody.pdf
- Chandler, D., T. Mynott, R. Luke and J. Craven (1994) *The Distribution and Stability of Escherichia coli K88 Receptor in the Gastrointestinal Tract of the Pig*, Vet. Microbiol.38; 203-215
- Chang, H. M., R. F. Ou-Yang, Y. T. Chen and C. C. Chen (1999) *Productivity and Some Properties of Immunoglobulin Specific Against Streptococcus mutans Serotype C in Chicken Egg Yolk (IgY)*, J Agric Food Chem.47; (1): 61-66
- Chauvel, J. (2000) *Intérêt comparé du cuivre, du zinc et d'un facteur de croissance en post-sevrage. Impact sur les performances de croissance et les rejets*, TechniPorc.23; (1): 11-16
- Chernysheva, L. V., R. M. Friendship, C. L. Gyles and C. E. Dewey (2003) *Field Trial Assessment of the Efficacy of Specific Egg-yolk Antibody Product for Control of Postweaning E. coli Diarrhea*, Vet Ther.4; (3): 279-284
- Cho, S. H., P. C. Loewen and R. R. Marquardt (2004) *A Plasmid DNA Encoding Chicken Interleukin-6 and Escherichia coli K88 Fimbrial Protein FaeG Stimulates the Production of Anti-K88 Fimbrial Antibodies in Chickens*, Poult Sci.83; (12): 1973-1978
- Choi, C. and C. Chae (1999) *Genotypic Prevalence of F4 Variants (ab, ac, and ad) in Escherichia coli Isolated from Diarrheic Piglets in Korea*, Vet Microbiol.67; (4): 307-310
- Choi, C., D. Kwon and C. Chae (2001) *Prevalence of the Enteraggregative Escherichia coli Heat-stable Enterotoxin 1 Gene and its Relationship with Fimbrial and Enterotoxin Genes in E. coli Isolated from Diarrheic Piglets*, J Vet Diagn Invest.13; (1): 26-29
- Cox, E., V. Cools, H. Thoonen, J. Hoorens and A. Houvenaghel (1988) *Effect of Experimentally-induced Villus Atrophy on Adhesion of K88ac-positive Escherichia coli in Just-weaned*

Piglets, Vet Microbiol.17; (2): 159-169

- Cox, E., E. Schrauwen, V. Cools and A. Houvenaghel (1991) *Experimental Induction of Diarrhoea in Newly-weaned Piglets*, Zentralbl Veterinarmed A.38; (6): 418-426
- Docic, M. and G. Bilkei (2003) *Differences in Antibiotic Resistance in Escherichia coli, Isolated from East-European Swine Herds with or without Prophylactic Use of Antibiotics*, J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.50; (1): 27-30
- Erickson, A. K., D. R. Baker, B. T. Bosworth, T. A. Casey, D. A. Benfield and D. H. Francis (1994) *Characterization of Porcine Intestinal Receptors for the K88ac Fimbrial Adhesin of Escherichia coli as Mucin-type Sialoglycoproteins*, Infect Immun.62; (12): 5404-5410
- Erickson, A. K., J. A. Willgohs, S. Y. McFarland, D. A. Benfield and D. H. Francis (1992) *Identification of Two Porcine Brush Border Glycoproteins that Bind the K88ac Adhesin of Escherichia coli and Correlation of these Glycoproteins with the Adhesive Phenotype*, Infect Immun.60; (3): 983-988
- Evans, D. J. and D. Evans (1996) *Escherichia coli in Diarrheal Disease*. In: Book. Medical Microbiology, Fourth Edition, Ch.25 Ed: S. Baron. The University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Fairbrother, J. M., E. Nadeau and C. L. Gyles (2005) *Escherichia coli in Postweaning Diarrhea in Pigs: an Update on Bacterial Types, Pathogenesis, and Prevention Strategies*, Anim Health Res Rev.6; (1): 17-39
- Fairbrother, J. M. (2004) *Guide to Pathogenic Mechanisms and Virulence Determinants of Escherichia coli Causing Disease in Animals*,
- Fairbrother, J. M., J. Harel, S. D'Allaire and M. Bonneau (1994) *Characterization of Escherichia coli Isolated from Postweaning Piglets with and Without Diarrhea* In: 13th Int. Pig Vet. Sci. Congress. Bangkok, Thailand. 26-30
- Fairbrother, J. M. (1999) *Neonatal Escherichia coli Diarrhea*. In: Book. Ed: B. E. Straw, S. D'Allaire, W. L. Mengeling and D. J. Taylor. Chapter 32: 441-454.
- Fairbrother, J. M. (2000) *Identification, Nomenclature, and Diagnosis of Pathogenic Escherichia coli* In: Western Canadian Association of Swine Practitioners. Saskatoon, Canada. 21-31
- Fang, L., Z. Gan and R. R. Marquardt (2000) *Isolation, Affinity Purification, and Identification of Piglet Small Intestine Mucosa Receptor for Enterotoxigenic Escherichia coli k88ac+ Fimbriae*, Infect Immun.68; (2): 564-569
- Flores-Abuxapqui, J. J., G. J. Suarez-Hoil, M. A. Puc-Franco, M. R. Heredia-Navarrete, M. L. Vivas-Rosel and R. A. Oberhelman (1997) *Frequency of Adhesive Factors and Enterotoxins in Strains of Escherichia coli Isolated from Piglets with Diarrhea*, Rev Latinoam Microbiol.39; (3-4): 145-151

- Francis, D. H., A. K. Erickson and P. A. Grange (1999) *K88 Adhesins of Enterotoxigenic Escherichia coli and their Porcine Enterocyte Receptors*, *Adv Exp Med Biol.*473; 147-154
- Freytag, L. C. and J. D. Clements (2005) *Mucosal Adjuvants*, *Vaccine.*23; (15): 1804-1813
- Friendship, R. M. (2002) *Swine Research at Guelph: Exploring Alternatives to Antibiotics*. In: London Swine Conference Proceedings. London, Canada. 77-81
- Frydendahl, K. (2002) *Prevalence of Serogroups and Virulence Genes in Escherichia coli Associated with Postweaning Diarrhoea and Edema Disease in Pigs and a Comparison of Diagnostic Approaches*, *Vet Microbiol.*85; (2): 169-182
- Fuentes, M., C. Pijoan, L. Becton, B. Morrison and M. Pieters (2004) *Inoculation of Non Pathogenic Escherichia coli to Control Disease and Reduce Antibiotic Usage* In: The 18th Congress IPVS. Hamburg, Germany. 18: 258
- Gaastra, W. and F. K. de Graaf (1982) *Host-specific Fimbrial Adhesins of Noninvasive Enterotoxigenic Escherichia coli Strains*, *Microbiol Rev.*46; (2): 129-161
- Gauthier, R. (2002) *Le mode d'action des acidifiants et leur intérêt en engraissement*. Publication de JEFO Nutrition Inc.
- Gomis, S., L. Babiuk, D. L. Godson, B. Allan, T. Thrush, H. Townsend, P. Willson, E. Waters, R. Hecker and A. Potter (2003) *Protection of Chickens Against Escherichia coli Infections by DNA Containing CpG Motifs*, *Infect Immun.*71; (2): 857-863
- Grange, P. A., A. K. Erickson, S. B. Lavery and D. H. Francis (1999) *Identification of an Intestinal Neutral Glycosphingolipid as a Phenotype-specific Receptor for the K88ad Fimbrial Adhesin of Escherichia coli*, *Infect Immun.*67; (1): 165-172
- Grange, P. A. and M. A. Mouricout (1996) *Transferrin Associated with the Porcine Intestinal Mucosa is a Receptor Specific for K88ab Fimbriae of Escherichia coli*, *Infect Immun.*64; (2): 606-610
- Grange, P. A., M. A. Mouricout, S. B. Lavery, D. H. Francis and A. K. Erickson (2002) *Evaluation of Receptor Binding Specificity of Escherichia coli K88 (F4) Fimbrial Adhesin Variants Using Porcine Serum Transferrin and Glycosphingolipids as Model Receptors*, *Infect Immun.*70; (5): 2336-2343
- Guerin, G., Y. Duval-Iflah, M. Bonneau, M. Bertaud, P. Guillaume and L. Ollivier (1993) *Evidence for Linkage Between K88ab, K88ac Intestinal Receptors to Escherichia coli and Transferrin Loci in Pigs*, *Anim Genet.*24; (5): 393-396
- Guillot, J. and J. Lafont (1989) *Antibiotics and the Intestinal Microflora*, *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*8; (2): 533-549
- Gustafsson, L., D. Nordling, M. S. Andersson, B. C. Sheldon and A. Qvarnstrom (1994)

Infectious Diseases, Reproductive Effort and the Cost of Reproduction in Birds, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.346; (1317): 323-331

- Gyles, C. L. and J. M. Fairbrother (2004) *Escherichia coli*. In: Book. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals Ed: C. L. Gyles, J. F. Prescott, J. G. Songer and C. O. Thoen. Blackwell Publishing. 193-223
- Hadge, D. and H. Ambrosius (1984) *Evolution of Low Molecular Weight Immunoglobulins--IV. IgY-like Immunoglobulins of Birds, Reptiles and Amphibians, Precursors of Mammalian IgA*, Mol Immunol.21; (8): 699-707
- Hardy, B. (2003) *Effect of Various Trace Minerals on the Growth of E. coli K88 in Vitro* In: 9th Biennial Conference of the Australasian Pig Science Association (Manipulating Pig Production IX).
- Harmon, B., M. Latour and S. Norberg (2002) *Sprayed Dried Eggs as a Source of Immune Globulins for SEW Pigs* In: 2002 Swine Research Report. Indiana. 31-35
- Harms, N., W. C. Oudhuis, E. A. Eppens, Q. A. Valent, M. Koster, J. Luirink and B. Oudega (1999) *Epitope Tagging Analysis of the Outer Membrane Folding of the Molecular Usher FaeD Involved in K88 Fimbriae Biosynthesis in Escherichia coli*, J Mol Microbiol Biotechnol.1; (2): 319-325
- Hatta, H., K. Tsuda, S. Akachi, M. Kim and T. Yamamoto (1993) *Productivity and Some Properties of Egg Yolk Antibody (IgY) Against Human Rotavirus Compared with Rabbit IgG*, Biosci Biotechnol Biochem.57; (3): 450-454
- He, H., T. L. Crippen, M. B. Farnell and M. H. Kogut (2003) *Identification of CpG Oligodeoxynucleotide Motifs that Stimulate Nitric Oxide and Cytokine Production in Avian Macrophage and Peripheral Blood Mononuclear Cells*, Dev Comp Immunol.27; (6-7): 621-627
- He, H. and M. H. Kogut (2003) *CpG-ODN-induced Nitric Oxide Production is Mediated Through Clathrin-dependent Endocytosis, Endosomal Maturation, and Activation of PKC, MEK1/2 and p38 MAPK, and NF-kappaB Pathways in Avian Macrophage Cells (HD11)*, Cell Signal.15; (10): 911-917
- Hemmi, H. and S. Akira (2005) *TLR Signalling and the Function of Dendritic Cells*, Chem Immunol Allergy.86; 120-135
- Hemmi, H., T. Kaisho, K. Takeda and S. Akira (2003) *The Roles of Toll-like Receptor 9, MyD88, and DNA-dependent Protein Kinase Catalytic Subunit in the Effects of Two Distinct CpG DNAs on Dendritic Cell Subsets*, J Immunol.170; (6): 3059-3064
- Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda and S. Akira (2000) *A Toll-like Receptor Recognizes Bacterial DNA*, Nature.408; (6813): 740-745
- Huyghebaert, N., V. Snoeck, A. Vermeire, E. Cox, B. M. Goddeeris and J. P. Remon (2005)

Development of an Enteric-coated Pellet Formulation of F4 Fimbriae for Oral Vaccination of Suckling Piglets Against Enterotoxigenic Escherichia coli Infections, Eur J Pharm Biopharm.59; (2): 273-281

- Ikemori, Y., M. Ohta, K. Umeda, F. C. Icatlo, Jr., M. Kuroki, H. Yokoyama and Y. Kodama (1997) *Passive Protection of Neonatal Calves Against Bovine Coronavirus-induced Diarrhea by Administration of Egg Yolk or Colostrum Antibody Powder*, Vet Microbiol.58; (2-4): 105-111
- Ioannou, X. P., S. M. Gomis, B. Karvonen, R. Hecker, L. A. Babiuk and S. van Drunen Littel-van den Hurk (2002) *CpG-containing Oligodeoxynucleotides, in Combination with Conventional Adjuvants, Enhance the Magnitude and Change the Bias of the Immune Responses to a Herpesvirus Glycoprotein*, Vaccine.21; (1-2): 127-137
- Ioannou, X. P., P. Griebel, A. Mena, S. M. Gomis, D. L. Godson, G. Mutwiri, R. Hecker, L. A. Babiuk and S. van Drunen Littel-van den Hurk (2003) *Safety of CpG Oligodeoxynucleotides in Veterinary Species*, Antisense Nucleic Acid Drug Dev.13; (3): 157-167
- Ivanov, A. P., E. M. Dragunsky and K. M. Chumakov (2006) *1,25-dihydroxyvitamin D3 Enhances Systemic and Mucosal Immune Responses to Inactivated Poliovirus Vaccine in Mice*, J Infect Dis.193; (4): 598-600
- Jacobs, A. A. C. and F. K. d. Graaf (1985) *Production of K88, K99 and F41 Fibrillae in Relation to Growth Phase, and a Rapid Procedure for Adhesin Purification*, FEMS Microbiol Lett.26; 15-19
- Jensen, G. M., K. Frydendahl, O. Svendsen, C. B. Jorgensen, S. Cirera, M. Fredholm, J. P. Nielsen and K. Moller (2006) *Experimental Infection with Escherichia coli O149:F4ac in Weaned Piglets*, Vet Microbiol.1; (3): 243-249
- Jeyasingham, M. D., P. Butty, T. P. King, R. Begbie and D. Kelly (1999) *Escherichia coli K88 Receptor Expression in Intestine of Disease-susceptible Weaned Pigs*, Vet Microbiol.68; (3-4): 219-234
- Jiang, R., X. Chang, B. Stoll, K. J. Ellis, R. J. Shypailo, E. Weaver, J. Campbell and D. G. Burrin (2000a) *Dietary Plasma Protein is Used More Efficiently than Extruded Soy Protein for Lean Tissue Growth in Early-weaned Pigs*, J Nutr.130; (8): 2016-2019
- Jiang, R., X. Chang, B. Stoll, M. Z. Fan, J. Arthington, E. Weaver, J. Campbell and D. G. Burrin (2000b) *Dietary Plasma Protein Reduces Small Intestinal Growth and Lamina Propria Cell Density in Early Weaned Pigs*, J Nutr.130; (1): 21-26
- Jin, L. Z., S. K. Baidoo, R. R. Marquardt and A. A. Frohlich (1998) *In vitro Inhibition of Adhesion of Enterotoxigenic Escherichia coli K88 to Piglet Intestinal Mucus by Egg-yolk Antibodies*, FEMS Immunol Med Microbiol.21; (4): 313-321
- Jin, L. Z., R. R. Marquardt and X. Zhao (2000) *A Strain of Enterococcus faecium (18C23) Inhibits Adhesion of Enterotoxigenic Escherichia coli K88 to Porcine Small Intestine*

Mucus, Appl Environ Microbiol.66; (10): 4200-4204

- Jones, G. W. and J. M. Rutter (1972) *Role of the K88 Antigen in the Pathogenesis of Neonatal Diarrhea Caused by Escherichia coli in Piglets*, Infect Immun.6; (6): 918-927
- Jorgensen, C. B., S. Cirera, A. L. Archibald, L. Anderson, M. Fredholm and I. Edforfs-Lilja (2004) *Porcine Polymorphisms and Methods for Detecting Them.*, International application published under the patent cooperation treaty (PCT).
- Kassaify, Z. G., E. W. Li and Y. Mine (2005) *Identification of Antiadhesive Fraction(s) in Nonimmunized Egg Yolk Powder: In Vitro Study*, J Agric Food Chem.53; (11): 4607-4614
- Kehoe, M., R. Sellwood, P. Shipley and G. Dougan (1981) *Genetic Analysis of K88-mediated Adhesion of Enterotoxigenic Escherichia coli*, Nature.291; (5811): 122-126
- Klinman, D. M., K. M. Barnhart and J. Conover (1999) *CpG Motifs as Immune Adjuvants*, Vaccine.17; (1): 19-25
- Kovacs-Nolan, J. and Y. Mine (2005) *Microencapsulation for the Gastric Passage and Controlled Intestinal Release of Immunoglobulin Y*, J Immunol Methods.296; (1-2): 199-209
- Krieg, A. M. (2001) *Now I know my CpGs*, Trends Microbiol.9; (6): 249-252
- Krieg, A. M. and H. Wagner (2000) *Causing a Commotion in the Blood: Immunotherapy Progresses from Bacteria to Bacterial DNA*, Immunol Today.21; (10): 521-526
- Krieg, A. M., A. K. Yi and G. Hartmann (1999) *Mechanisms and Therapeutic Applications of Immune Stimulatory CpG DNA*, Pharmacol Ther.84; (2): 113-120
- Krieg, A. M., A. K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. A. Koretzky and D. M. Klinman (1995) *CpG Motifs in Bacterial DNA Trigger Direct B-Cell Activation*, Nature.374; (6522): 546-549
- Krsnik, B., R. Yammine, Z. Pavicic, T. Balenovic, B. Njari, I. Vrbanac and I. Valpotic (1999) *Experimental Model of Enterotoxigenic Escherichia coli Infection in Pigs: Potential for an Early Recognition of Colibacillosis by Monitoring of Behavior*, Comp Immunol Microbiol Infect Dis.22; (4): 261-273
- Labrie, V., H. E. Beausoleil, J. Harel and J. D. Dubreuil (2001) *Binding to Sulfatide and Enterotoxicity of Various Escherichia coli STb Mutants*, Microbiology.147; (Pt 11): 3141-3148
- Larsson, A. and D. Carlander (2003) *Oral Immunotherapy with Yolk Antibodies to Prevent Infections in Humans and Animals*, Upsala J. Med. Sci.108; 129-140
- Larsson, A., D. Carlander and M. Wilhelmsson (1998) *Antibody Response in Laying Hens with Small Amount of Antigen*, Food and Agricultural Immunology.10; 29-36

- Larsson, A., A. Karlsson-Parra and J. Sjoquist (1991) *Use of Chicken Antibodies in Enzyme Immunoassays to Avoid Interference by Rheumatoid Factors*, Clin Chem.37; (3): 411-414
- Larsson, A. and H. Mellstedt (1992) *Chicken Antibodies: a Tool to Avoid Interference by Human Anti-mouse Antibodies in ELISA After In Vivo Treatment with Murine Monoclonal Antibodies*, Hybridoma.11; (1): 33-39
- Larsson, A., P. Wejaker and P. Forsberg (1999) *Peroxidase-labelling of Chicken Antibodies*, Food and Agricultural Immunology.11; 43-49
- Lee, K. A., S. K. Chang, Y. J. Lee, J. H. Lee and N. S. Koo (2002) *Acid Stability of Anti-Helicobacter pylori IgY in Aqueous Polyol Solution*, J Biochem Mol Biol.35; (5): 488-493
- Leenaars, P. P., C. F. Hendriksen, A. F. Angulo, M. A. Koedam and E. Claassen (1994) *Evaluation of Several Adjuvants as Alternatives to the Use of Freund's Adjuvant in Rabbits*, Vet Immunol Immunopathol.40; (3): 225-241
- Lemire, J. M., J. S. Adams, R. Sakai and S. C. Jordan (1984) *1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 Suppresses Proliferation and Immunoglobulin Production by Normal Human Peripheral Blood Mononuclear Cells*, J Clin Invest.74; (2): 657-661
- Leslie, G. A. and L. W. Clem (1969) *Phylogen of Immunoglobulin structure and Function. 3. Immunoglobulins of the Chicken*, J Exp Med.130; (6): 1337-1352
- Lima, K. M., S. A. dos Santos, J. M. Rodrigues, Jr. and C. L. Silva (2004) *Vaccine Adjuvant: it Makes the Difference*, Vaccine.22; (19): 2374-2379
- Losonczy, S., C. Szabo, Z. Kiss and L. Bardo (2000) *Elisa for the Measurment of IgY Concentration of Hen's and Quail's Serum and Yolk* In: 6th Internet World Congress for Biomedical Science.
- Madec, F., N. Bridoux, S. Bounaix, R. Cariolet, Y. Duval-Iflah, D. J. Hampson and A. Jestin (2000) *Experimental Models of Porcine Post-weaning Colibacillosis and their Relationship to Post-weaning Diarrhoea and Digestive Disorders as Encountered in the Field*, Vet Microbiol.72; (3-4): 295-310
- Marouby, H. (2000) *Suppression des Farines et Graisses Animale: Conséquences et Enjeux pour l'Alimentation Animale*, TechniPorc.23; (6): 3-8
- Marquardt, R. R., L. Z. Jin, J. W. Kim, L. Fang, A. A. Frohlich and S. K. Baidoo (1999) *Passive Protective Effect of Egg-yolk Antibodies Against Enterotoxigenic Escherichia coli K88+ Infection in Neonatal and Early-weaned Piglets*, FEMS Immunol Med Microbiol.23; (4): 283-288
- Mavromichalis, I., C. M. Peter, T. M. Parr, D. Ganessunker and D. H. Baker (2000) *Growth-promoting Efficacy in Young Pigs of Two Sources of Zinc Oxide Having Either a High*

or a Low Bioavailability of Zinc, J Anim Sci.78; (11): 2896-2902

- Maynard, C., J. M. Fairbrother, S. Bekal, F. Sanschagrín, R. C. Levesque, R. Brousseau, L. Masson, S. Larivière and J. Harel (2003) *Antimicrobial Resistance Genes in Enterotoxigenic Escherichia coli O149:K91 Isolates Obtained Over a 23-year Period from Pigs*, Antimicrob Agents Chemother.47; (10): 3214-3221
- McCluskie, M. J. and H. L. Davis (1998) *CpG DNA is a Potent Enhancer of Systemic and Mucosal Immune Responses Against Hepatitis B Surface Antigen with Intranasal Administration to Mice*, J Immunol.161; (9): 4463-4466
- McCluskie, M. J., R. D. Weeratna and H. L. Davis (2001) *The Potential of Oligodeoxynucleotides as Mucosal and Parenteral Adjuvants*, Vaccine.19; (17-19): 2657-2660
- Mercer, J. F. and A. Grimes (1986) *Variation in the Amounts of Hepatic Copper, Zinc and Metallothionein mRNA During Development in the Rat*, Biochem J.238; (1): 23-27
- Mol, O., W. C. Oudhuis, R. P. Oud, R. Sijbrandi, J. Luirink, N. Harms and B. Oudega (2001) *Biosynthesis of K88 Fimbriae in Escherichia coli: Interaction of Tip-subunit FaeC with the Periplasmic Chaperone FaeE and the Outer Membrane Usher FaeD*, J Mol Microbiol Biotechnol.3; (1): 135-142
- Morgan, J. W., D. J. Sliney, D. M. Morgan and A. L. Maizel (1999) *Differential Regulation of Gene Transcription in Subpopulations of Human B Lymphocytes by Vitamin D3*, Endocrinology.140; (1): 381-391
- Morrison, B. and J. Deen (2003) *Balancing the Benefits and Risks of Antibiotic Use in Swine* In: Allen D. Leman Swine Conference. 243-247
- Nagy, B., T. A. Casey, S. C. Whipp and H. W. Moon (1992) *Susceptibility of Porcine Intestine to Pilus-mediated Adhesion by Some Isolates of Piliated Enterotoxigenic Escherichia coli Increases with Age*, Infect Immun.60; (4): 1285-1294
- Nagy, B., S. C. Whipp, H. Imberechts, H. U. Bertschinger, E. A. Dean-Nystrom, T. A. Casey and E. Salajka (1997) *Biological Relationship Between F18ab and F18ac Fimbriae of Enterotoxigenic and Verotoxigenic Escherichia coli from Weaned Pigs with Oedema Disease or Diarrhoea*, Microb Pathog.22; (1): 1-11
- Nataro, J. P. and J. B. Kaper (1998) *Diarrheagenic Escherichia coli*, Clin Microbiol Rev.11; (1): 142-201
- NeuralNotes (1996) *IgY Polyclonal Antibodies: Generation, Purification and Available Neuroscience Reagents*, Neural Notes.1; (4): 14-15
- Noamani, B. N., J. M. Fairbrother and C. L. Gyles (2003) *Virulence Genes of O149 Enterotoxigenic Escherichia coli from Outbreaks of Postweaning Diarrhea in Pigs*, Vet Microbiol.97; (1-2): 87-101

- Nollet, H., P. Deprez, E. Van Driessche and E. Muylle (1999) *Protection of Just Weaned Pigs Against Infection with F18+ Escherichia coli by Non-immune Plasma Powder*, Vet Microbiol.65; (1): 37-45
- Olovsson, M. and A. Larsson (1993) *Biotin Labelling of Chicken Antibodies and Their Subsequent Use in ELISA and Immunohistochemistry*, Comp Immunol Microbiol Infect Dis.16; (2): 145-152
- Orskov, F. and I. Orskov (1992) *Escherichia coli Serotyping and Disease in Man and Animals*, Can J Microbiol.38; (7): 699-704
- Osek, J. (1999) *Genetic Diversity Among Escherichia coli O149:K91 Strains Isolated from Pigs with Diarrhoea Determined by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis*, Res Vet Sci.67; (2): 197-198
- Owusu-Asiedu, A., S. K. Baidoot, C. M. Nyachoti and R. R. Marquardt (2002) *Response of Early-weaned Pigs to Spray-dried Porcine or Animal Plasma-based Diets Supplemented with Egg-yolk Antibodies Against Enterotoxigenic Escherichia coli*, J Anim Sci.80; (11): 2895-2903
- Owusu-Asiedu, A., C. M. Nyachoti, S. K. Baidoo, R. R. Marquardt and X. Yang (2003a) *Response of Early-weaned Pigs to an Enterotoxigenic Escherichia coli (K88) Challenge when Fed Diets Containing Spray-dried Porcine Plasma or Pea Protein Isolate Plus Egg Yolk Antibody*, J Anim Sci.81; (7): 1781-1789
- Owusu-Asiedu, A., C. M. Nyachoti and R. R. Marquardt (2003b) *Response of Early-weaned Pigs to an Enterotoxigenic Escherichia coli (K88) Challenge when Fed Diets Containing Spray-dried Porcine Plasma or Pea Protein Isolate Plus Egg Yolk Antibody, Zinc Oxide, Fumaric Acid, or Antibiotic*, J Anim Sci.81; (7): 1790-1798
- Piva, A., V. Pizzamiglio, M. Morlacchini, M. Tedeschi and G. Piva (2007) *Lipid Microencapsulation Allows Slow Release of Organic Acids and Natural Identical Flavors Along the Swine Intestine*, J Anim Sci.85; (2): 486-493
- Penel, S., I. R. Nagy and J. D. Dubreuil. *Les voies d'endocytose de STb*. Manuscript en préparation.
- Pettigrew, J. E. (2003) *Denmark, Antibiotic Alternatives, and US Industry* In: Leman Swine Conference. CD-ROM: 248-251
- Popoff, M. R. (1998) *Interactions Between Bacterial Toxins and Intestinal Cells*, Toxicol.36; (4): 665-685
- Poulsen, H. and L. T (1995) *Zinc excretion and retention in growing pigs fed increasing levels of zinc oxide*, Livest. Prod. Sci.43; 235-242
- Post, K. W., B. T. Bosworth and J. L. Knot (2000) *Frequency of Virulence Factors in Escherichia coli Isolated from Pigs with Postweaning Diarrhea Edema Disease in North Carolina*, Swine Health and Production.8; 119-120

- Rankin, R., R. Pontarollo, X. Ioannou, A. M. Krieg, R. Hecker, L. A. Babiuk and S. van Drunen Littel-van den Hurk (2001) *CpG Motif Identification for Veterinary and Laboratory Species Demonstrates that Sequence Recognition is Highly Conserved*, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*11; (5): 333-340
- Rapacz, J. and J. Hasler-Rapacz (1986) *Polymorphism and Inheritance of Swine Small Intestinal Receptors Mediating Adhesion of Three Serological Variants of Escherichia coli-producing K88 Pilus Antigen*, *Anim Genet.*17; (4): 305-321
- Roselli, M., A. Finamore, I. Garaguso, M. S. Britti and E. Mengheri (2003) *Zinc Oxide Protects Cultured Enterocytes from the Damage Induced by Escherichia coli*, *J Nutr.*133; (12): 4077-4082
- Rousset, E., J. Harel and J. D. Dubreuil (1998) *Sulfatide from the Pig Jejunum Brush Border Epithelial Cell Surface is Involved in Binding of Escherichia coli Enterotoxin B*, *Infect Immun.*66; (12): 5650-5658
- Rutter, J. M., G. W. Jones, G. T. Brown, M. R. Burrows and P. D. Luther (1976) *Antibacterial Activity in Colostrum and Milk Associated with Protection of Piglets Against Enteric Disease Caused by K88-positive Escherichia coli*, *Infect Immun.*13; (3): 667-676
- Sands, H., L. J. Gorey-Feret, A. J. Cocuzza, F. W. Hobbs, D. Chidester and G. L. Trainor (1994) *Biodistribution and Metabolism of Internally 3H-labeled Oligonucleotides. I. Comparison of a Phosphodiester and a Phosphorothioate*, *Mol Pharmacol.*45; (5): 932-943
- Sarmiento, J. I., T. A. Casey and H. W. Moon (1988) *Postweaning Diarrhea in Swine: Experimental Model of Enterotoxigenic Escherichia coli Infection*, *Am J Vet Res.*49; (7): 1154-1159
- Savarino, S. J., A. McVeigh, J. Watson, A. Cravioto, J. Molina, P. Echeverria, M. K. Bhan, M. M. Levine and A. Fasano (1996) *Enteraggative Escherichia coli Heat-stable Enterotoxin is Not Restricted to Enteraggative E. coli*, *J Infect Dis.*173; (4): 1019-1022
- Schade, R., C. Staak, C. Hendriksen, M. Erhard, H. Hugl, G. Koch, A. Larsson, W. Pollmann, M. van Regenmortel, E. Rijke, H. Spielmann, H. Steinbusch and D. Straughan (1996) *The Production of Avian (Egg Yolk) Antibodies:IgY. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 21*, *ATLA.*24; 925-934
- Scott, M. (1972) *Trace Element in Animal Nutrition*. In: *Soil Sci. Soc of Am. Inc. Ed: J. Mortverdt, P. Giordano and L. W. (eds).* 22: 555-591
- Sellwood, R., R. A. Gibbons, G. W. Jones and J. M. Rutter (1975) *Adhesion of Enteropathogenic Escherichia coli to Pig Intestinal Brush Borders: the Existence of Two Pig Phenotypes*, *J Med Microbiol.*8; (3): 405-411
- Sester, D. P., S. Naik, S. J. Beasley, D. A. Hume and K. J. Stacey (2000) *Phosphorothioate*

Backbone Modification Modulates Macrophage Activation by CpG DNA, J Immunol.165; (8): 4165-4173

- Shimizu, M., R. Fitzsimmons and S. Nakai (1988) *Anti-E.coli Immunoglobulin Y Isolated from Egg Yolk of Immunized Chicken as a Potential Food Ingredient*, J. Food Sci.53; (5): 1360-1366
- Shimizu, M., Y. Miwa, K. Hashimoto and A. Goto (1993) *Encapsulation of Chicken Egg Yolk Immunoglobulin G (IgY) by Liposomes*, Biosci Biotechnol Biochem.57; (9): 1445-1449
- Shimizu, M., H. Nagashima, K. Sano, K. Hashimoto, M. Ozeki, K. Tsuda and H. Hatta (1992) *Molecular Stability of Chicken and Rabbit Immunoglobulin G*, Biosci Biotechnol Biochem.56; (2): 270-274
- Shin, J. H., M. Yang, S. W. Nam, J. T. Kim, N. H. Myung, W. G. Bang and I. H. Roe (2002a) *Use of Egg yolk-derived Immunoglobulin as an Alternative to Antibiotic Treatment for Control of Helicobacter pylori Infection*, Clin Diagn Lab Immunol.9; (5): 1061-1066
- Shin, N. R., I. S. Choi, J. M. Kim, W. Hur and H. S. Yoo (2002b) *Effective Methods for the Production of Immunoglobulin Y Using Immunogens of Bordetella bronchiseptica, Pasteurella multocida and Actinobacillus pleuropneumoniae*, J Vet Sci.3; (1): 47-57
- Snoeck, V., N. Huyghebaert, E. Cox, A. Vermeire, S. Vancaeneghem, J. P. Remon and B. M. Goddeeris (2003) *Enteric-coated Pellets of F4 Fimbriae for Oral Vaccination of Suckling Piglets Against Enterotoxigenic Escherichia coli Infections*, Vet Immunol Immunopathol.96; (3-4): 219-227
- Solano-Aguilar, G., H. Dawson, T. Ledbetter, T. Shea-Donohue, N. Schoene, J. Call, E. Beshah, W. Hare and J. Urban (2003) *The Effect of Human-Derived Probiotic Bacteria on the Immune and Intestinal Function of Pigs* In: Allen D. Lemam Swine Conference. CD-ROM.
- Spyridon, K. K. and R. B. Morrison (2003) *A Critical Review of Feeding Probiotics to Pigs* In: Allen D. Lemam Swine Conference. 252-255
- Sun, R., T. J. Anderson, A. K. Erickson, E. A. Nelson and D. H. Francis (2000) *Inhibition of Adhesion of Escherichia coli K88ac Fimbria to its Receptor, Intestinal Mucin-type Glycoproteins, by a Monoclonal Antibody Directed Against a Variable Domain of the Fimbria*, Infect Immun.68; (6): 3509-3515
- Sun, S., W. Mo, Y. Ji and S. Liu (2001) *Preparation and Mass Spectrometric Study of Egg Yolk Antibody (IgY) Against Rabies Virus*, Rapid Commun Mass Spectrom.15; (9): 708-712
- Svendsen, J., H. J. Riising and S. Christensen (1977) *Studies of the Pathogenesis of Enteric E. coli Infections in Weaned Pigs: Bacteriological and Immunofluorescent Studies*, Nord Vet Med.29; (4-5): 212-220
- Tournut, J. (1989) *Les Probiotiques en élevage: applications*, Rev. Sci. Tech. Off. Epiz.8; (2): 533-549

- Van den Broeck, W., E. Cox and B. M. Goddeeris (1999) *Induction of Immune Responses in Pigs Following Oral Administration of Purified F4 Fimbriae*, Vaccine.17; (15-16): 2020-2029
- Van den Broeck, W., E. Cox, B. Oudega and B. M. Goddeeris (2000) *The F4 Fimbrial Antigen of Escherichia coli and its Receptors*, Vet Microbiol.71; (3-4): 223-244
- van der Peet-Schwering, C., G. Binnendijk and P. Vesseur (1996) *Effect of Spray-Dried Porcine Plasma in Diets with Different Protein Source on the Performance and Occurrence of Post-Weaning Diarrhoea of Piglets* In: 14th Int. Pig Vet. Soc. Congress. Bologna, Italy:420
- Van der Stede, Y., E. Cox, F. Verdonck, S. Vancaeneghem and B. M. Goddeeris (2003) *Reduced Faecal Excretion of F4+-E coli by the Intramuscular Immunisation of Suckling Piglets by the Addition of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 or CpG-oligodeoxynucleotides*, Vaccine.21; (9-10): 1023-1032
- Van Der Stede, Y., T. Verfaillie, E. Cox, F. Verdonck and B. M. Goddeeris (2004) *1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 Increases IgA Serum Antibody Responses and IgA Antibody-secreting Cell Numbers in the Peyer's Patches of Pigs After Intramuscular Immunization*, Clin Exp Immunol.135; (3): 380-390
- Verdonck, F., V. Snoeck, B. M. Goddeeris and E. Cox (2005) *Cholera Toxin Improves the F4(K88)-specific Immune Response Following Oral Immunization of Pigs with Recombinant FaeG*, Vet Immunol Immunopathol.103; (1-2): 21-29
- Vleugels, B., C. Ververken and B. M. Goddeeris (2002) *Stimulatory Effect of CpG Sequences on Humoral Response in Chickens*, Poult Sci.81; (9): 1317-1321
- Vollmer, J., R. Weeratna, P. Payette, M. Jurk, C. Schetter, M. Laucht, T. Wader, S. Tluk, M. Liu, H. L. Davis and A. M. Krieg (2004) *Characterization of Three CpG Oligodeoxynucleotide Classes with Distinct Immunostimulatory Activities*, Eur J Immunol.34; (1): 251-262
- Walters, J. and R. Sellwood (1982) *Aspects of Genetic Resistance to K88 E. coli in Pigs* In: World Congress on Genetic Applied to Livestock Production. Madrid, Espagne. 362-367
- Wanke, R., P. Schmidt, M. H. Erhard, A. Sprick-Sanjose Messing, M. Stangassinger, W. Schmahl and W. Hermanns (1996) *[Freund's Complete Adjuvant in the Chicken: Efficient Immunostimulation with Severe Local Inflammatory Reaction]*, Zentralbl Veterinarmed A.43; (4): 243-253
- Weeratna, R. D., M. J. McCluskie, Y. Xu and H. L. Davis (2000) *CpG DNA Induces Stronger Immune Responses with Less Toxicity than Other Adjuvants*, Vaccine.18; (17): 1755-1762
- Weill, J. C. and C. A. Reynaud (1987) *The Chicken B Cell Compartment*, Science.238; (4830):

1094-1098

- Wittig, W., H. Klie, P. Gallien, S. Lehmann, M. Timm and H. Tschape (1995) *Prevalence of the Fimbrial Antigens F18 and K88 and of Enterotoxins and Verotoxins Among Escherichia coli Isolated from Weaned Pigs*, Zentralbl Bakteriol.283; (1): 95-104
- Yamamoto, T. and M. Nakazawa (1997) *Detection and Sequences of the Enteraggregative Escherichia coli Heat-stable Enterotoxin 1 Gene in Enterotoxigenic E. coli Strains Isolated from Piglets and Calves with Diarrhea*, J Clin Microbiol.35; (1): 223-227
- Zhao, Y., H. Rabbani, A. Shimizu and L. Hammarstrom (2000) *Mapping of the Chicken Immunoglobulin Heavy-chain Constant Region Gene Locus Reveals an Inverted alpha Gene Upstream of a Condensed Upsilon Gene*, Immunology.101; (3): 348-353

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Nom de l'étudiant Sébastien Lévesque		Code permanent [REDACTED]
Stipe du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Microbiologie

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Levesque, S., Gabriela Martinez, John M. Fairbrother	
Titre Improvement of Adjuvant System to Obtain a Cost-Effective Production of High Specific IgY	
Revue Poultry Science	Date de publication Soumis

DÉCLARATION 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 Sébastien Lévesque inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Immunothérapie passive. Une alternative pour la protection des infections dues à Escherichia coli enterotoxinogènes (ETEC) chez les porcelets en post-sevrage.</i>		
Coauteur John M. Fairbrother	Stipe [REDACTED]	Date Novembre 06
Coauteur Gabriela Martinez	Stipe [REDACTED]	Date Novembre 06

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

Nom de l'étudiant Sébastien Lévesque		Code étudiant [REDACTED]
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Microbiologie

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Lévesque S., Gabriela Martinez, John M. Fairbrother	
Titre <i>Evaluation of microcapsulated anti-F4 IgY as a feed supplement in the prevention of post-weaned Escherichia coli diarrhea in pigs.</i>	
Revue Article non soumis pour le moment	Date de publication En rédaction

DÉCLARATION 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 Sébastien Lévesque inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Immunothérapie passive. Une alternative pour la protection des infections dues à Escherichia coli entérotoxigènes (ETEC) chez les porcelets en post-sevrage</i>	
Coauteur John M. Fairbrother	Date Novembre 06
Coauteur Gabriela Martinez	Date Novembre 06



Windows Live™ Mail
Beta

Imprimer Fermer la fenêtre



26 février 2007 19:43:18

Objet : RE: Permission of microfilling for PS-06-00175

Dear Mr. Levesque:

The Poultry Science Association grants you nonexclusive permission to reprint (and microfilm) the Poultry Science article "Improvement of Adjuvant Systems to Obtain a Cost-Effective Production of High Levels of Specific IgY" by S. Levesque, G. Martinez, and J. M. Fairbrother, scheduled to be published in the April 2007 issue of Poultry Science (vol 86), provided that appropriate credit is given to the original publication in the journal.

If you require the page range of the article, please contact our office after March 2.

Best regards,

Susan Pollock

FASS Director of Publications
and Managing Editor
-Journal of Animal Science
-Journal of Applied Poultry Research
-Journal of Dairy Science
-Poultry Science

1111 N. Dunlap Ave.
Savoy, IL 61874

217.356.7641
FAX: 217.378.4083

From: Sébastien Lévesque [mailto: [REDACTED]]
Sent: Friday, February 23, 2007 9:22 PM
To: Susan Pollock
Subject: RE: Permission of microfilling for PS-06-00175

Hi Ms Pollock,

After discussion with Micheline St-Germain, the representative of the University of Montreal, you can send an e-mail to me, indicating that you authorize the microfilling of the article of M. Sébastien Lévesque.

I will forward it to Ms St-Germain. and add it to my thesis.

This e-mail will act like the form.

Thank you

