

Université de Montréal

**Étude de l'effet d'une pré-infection avec *Mycoplasma hyopneumoniae*
et/ou *Mycoplasma hyorhinis* sur la pathogénèse de *Streptococcus suis*
sérotipe 2**

Par Héloïse Pageaut

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de *Maîtrise ès sciences* (M. Sc.)
en sciences vétérinaires option microbiologie

Décembre 2022

© Pageaut, 2022

Université de Montréal

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

**Étude de l'effet d'une pré-infection avec *Mycoplasma hyopneumoniae*
et/ou *Mycoplasma hyorhinis* sur la pathogénèse de *Streptococcus suis*
sérotypage 2**

Présenté par

Héloïse Pageaut

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

M. Nahuel Fittipaldi

Président-rapporteur

M. Marcelo Gottschalk

Directeur de recherche

Mme Mariela Segura

Codirectrice

Mme Corinne Marois-Créhan

Codirectrice

M. Christopher Fernandez Prada

Membre du jury

Résumé

Le « porcine respiratory disease complex » (PRDC) est un trouble multifactoriel dû à une infection simultanée ou séquentielle de divers micro-organismes pouvant intensifier ou prolonger les signes cliniques des porcs. On retrouve dans ce complexe *Mycoplasma hyopneumoniae*, un des agents initiateurs du PRDC et agent primaire de la pneumonie enzootique (EP) chez les porcs. *Streptococcus suis* est l'un des agents pathogènes secondaires du PRDC, c'est également un agent pathogène important induisant principalement des méningites, des septicémies et la mort subite des porcelets post-sevrés. *Mycoplasma hyorhinis* est également l'un des agents pathogènes secondaires du PRDC, et va induire des inflammations sérofibrineuses chez les porcelets. Comme ces trois pathogènes sont retrouvés au sein du PRDC et au niveau des voies respiratoires supérieures des porcs, il pourrait exister un effet positif des mycoplasmes sur la pathogénèse de *S. suis*. C'est pourquoi différentes expériences *in vitro* ont été réalisées avec les cellules épithéliales porcines (NPTr), les macrophages alvéolaires porcins (PAMs) et les cellules dendritiques porcines (BM-DCs) qui ont été pré-infectés par les mycoplasmes puis infectés avec *S. suis*. Il a été observé que la cytotoxicité et l'inflammation des cellules porcines ont été significativement augmentées lorsqu'elles ont été pré-infectées par les mycoplasmes puis infectées par *S. suis*. Cependant, la pré-infection des cellules n'a pas joué de rôle sur l'adhésion et l'invasion de *S. suis*, sur la phagocytose et la survie intracellulaire de la bactérie. Cette étude semble montrer que la pré-infection des mycoplasmes pourraient induire un contexte inflammatoire favorisant la pathogénèse de *S. suis*.

Mots-clés : *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, co-infection, cellules épithéliales, macrophages alvéolaires, cellules dendritiques, cytotoxicité, inflammation

Abstract

Porcine respiratory disease complex (PRDC) is a multifactorial disorder due to simultaneous or sequential infection with various microorganisms that can intensify or prolong clinical signs in pigs. Included in this complex is *Mycoplasma hyopneumoniae*, one of the initiating agents of PRDC and the primary agent of enzootic pneumonia (EP) in pigs. *Streptococcus suis* is one of the secondary pathogens of PRDC and is also an important pathogen, mainly causing meningitis, septicemia, and sudden death in post-weaned piglets. *Mycoplasma hyorhinis* is also one of the secondary pathogens of PRDC and will also induce serofibrinous inflammation in piglets. As all three pathogens are found in the PRDC and in the upper respiratory tract of pigs there may be a positive effect of mycoplasma on the pathogenesis of *S. suis*. Therefore, different *in vitro* experiments were performed with newborn pig tracheal cells (NPTr), primary porcine alveolar macrophages (PAMs) and porcine bone-marrow-derived dendritic cells (BM-DCs) that were pre-infected with mycoplasma and then infected with *S. suis*. It was observed that cytotoxicity and inflammation of pig cells were significantly increased when they were pre-infected with mycoplasma and then infected with *S. suis*. However, pre-infection of the cells did not play a role in the adhesion and invasion of *S. suis* and in the phagocytosis and intracellular survival of the bacteria. This study suggests that pre-infection with mycoplasma may induce an inflammatory context favoring the pathogenesis of *S. suis*.

Keywords: *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, co-infection, epithelial cells, alveolar macrophages, dendritic cells, cytotoxicity, inflammation

Table des matières

Résumé	3
Abstract	4
Table des matières	5
Liste des figures	9
Liste des tableaux.....	11
Liste des sigles et abréviations.....	12
Remerciements	16
I. Introduction.....	17
II. Revue de littérature.....	21
1. <i>Streptococcus suis</i>	22
1.1 Caractéristiques générales	22
1.2 Sérotypage et distribution géographique	23
1.2.1. Classification de <i>S. suis</i>	23
1.2.2. "Sérotypage" moléculaire de <i>S. suis</i>	23
1.2.3. Distribution mondiale des sérotypes	25
1.2.4. Distribution mondiale des séquences types (ST).....	25
1.3 Détection directe de <i>S. suis</i>	26
1.4 Infection et transmission de <i>S. suis</i>	27
1.4.1. Chez le porc	28
1.4.2. Chez l'humain	28
1.5 Pathogénèse de <i>S. suis</i>	29
1.5.1. Colonisation : adhérence et invasion des surfaces muqueuses et épithéliales	30
1.5.2. Dissémination dans la circulation sanguine	32
1.5.3. Inflammation exacerbée	33
1.5.4. Apoptose	34
1.5.5. Passage dans le système nerveux central (SNC)	35
1.6 Facteurs de virulence	36
1.6.1. Capsule polysaccharidique	36
1.6.2. Suilysine.....	37
1.6.3. EF et MRP	38
1.6.4. Autres facteurs de virulence	39

1.7	Traitements des infections à <i>S. suis</i>	39
2.	Mycoplasmes porcins.....	40
2.1	Caractéristiques générales	40
2.2	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	41
2.2.1	Infection et transmission.....	41
2.2.2	Diversité génétique de <i>M. hyorhinis</i>	42
2.2.3	Méthode de détection	43
2.2.4	Pathogénèse de <i>M. hyorhinis</i>	44
a.	Adhésion cellulaire de <i>M. hyorhinis</i>	44
b.	Échappement de <i>M. hyorhinis</i> au système immunitaire	45
c.	Induction de médiateurs de l'inflammation par <i>M. hyorhinis</i>	46
d.	Apoptose	46
2.2.5	Facteurs de virulence	46
2.2.6	Traitement des infections à <i>M. hyorhinis</i>	48
2.3	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	49
2.3.1	Infection et transmission.....	49
2.3.2	Diversité génétique de <i>M. hyopneumoniae</i>	50
2.3.3	Méthode de détection	51
2.3.4	Pathogénèse	52
a.	Adhésion de <i>M. hyopneumoniae</i>	52
b.	Immunomodulation du système immunitaire.....	54
2.3.5	Facteurs de virulence	56
2.3.6	Traitements des infections	58
3.	Immunité innée	59
3.1	Principe général du système immunitaire innée	59
3.2	Reconnaissance des micro-organismes par le système immunitaire innée	60
3.2.1.	« Pattern recognition receptors » (PRR)	60
a.	« Toll-like receptors » ou TLR	60
b.	Motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs)	61
c.	Voie de signalisation des TLR	62
•	Voie de signalisation MyD88	62
•	Voie de signalisation TRIF.....	62
3.3	Cellules du système immunitaire innée	63
3.3.1.	Macrophages.....	63

a.	Origine des macrophages tissulaires.....	63
b.	Plasticité des macrophages.....	64
c.	Fonctions des macrophages.....	64
d.	Distribution tissulaire des macrophages.....	65
•	Macrophages alvéolaires.....	65
3.3.2	Cellules dendritiques.....	66
a.	Origine et maturation des DC.....	66
b.	Fonctions des DC.....	67
c.	Complexe majeur d'histocompatibilité.....	68
3.3.3	Marqueurs cellulaires.....	69
a.	Récepteurs/marqueurs cellulaires des macrophages alvéolaires.....	69
•	Le marqueur sialoadhésine.....	70
•	Le marqueur CD163.....	71
b.	Récepteurs/marqueurs cellulaires des DC porcins.....	71
3.3.4	Cytokines.....	72
a.	Maturation des cellules.....	72
b.	Migration des cellules.....	73
3.3.5	Rôle de la réponse immunitaire innée à la suite d'une infection à <i>S. suis</i>	74
a.	Colonisation de <i>S. suis</i>	74
b.	<i>S. suis</i> et les cellules du système immunitaire innée.....	74
•	<i>S. suis</i> et les macrophages.....	74
•	<i>S. suis</i> et les cellules dendritiques.....	76
3.3.6	Rôle de la réponse immunitaire innée à la suite d'une infection à <i>M. hyopneumoniae</i> et <i>M. hyorhinis</i>	77
a.	<i>M. hyopneumoniae</i> / <i>M. hyorhinis</i> et les macrophages.....	77
b.	<i>M. hyopneumoniae</i> / <i>M. hyorhinis</i> et les cellules dendritiques.....	79
c.	Production de médiateurs de l'inflammation.....	79
4.	Co-infection.....	80
4.1	Maladies respiratoires porcines complexes.....	80
4.2	Co-infection entre <i>S. suis</i> et virus.....	81
a.	PRRSV.....	81
b.	SIV.....	83
c.	PCV2.....	84
4.3	Co-infection entre <i>S. suis</i> et bactéries.....	85
a.	<i>A. pleuropneumoniae</i>	85

b.	<i>G. parasuis</i>	86
c.	<i>B. bronchiseptica</i>	86
4.4	Co-infection entre <i>S. suis</i> , <i>M. hyopneumoniae</i> et/ou <i>M. hyorhinis</i>	87
4.5	Co-infection <i>M. hyopneumoniae</i> et virus	88
a.	<i>PRRSV</i>	88
b.	<i>SIV</i>	89
c.	<i>PCV2</i>	89
4.6	Co-infection <i>M. hyorhinis</i> et virus	90
a.	<i>PRRSV</i>	90
b.	<i>PCV2</i>	90
4.7	Co-infection <i>M. hyopneumoniae</i> et autres bactéries.....	91
a.	<i>P. multocida</i>	91
b.	<i>A. pleuropneumoniae</i>	92
4.8	Co-infection <i>M. hyorhinis</i> et autres bactéries	92
a.	<i>M. hyopneumoniae</i>	92
b.	<i>G. parasuis</i>	93
III.	Article scientifique.....	94
IV.	Discussion.....	130
V.	Conclusion et perspectives.....	144
	Références bibliographiques.....	147
	Annexes.....	159

Liste des figures

Revue de la littérature :

Figure 1 : Distribution mondiale des séquences types du sérotype 2 de <i>S. suis</i>	26
Figure 2 : Représentation schématique du processus de pathogénèse des infections à <i>S. suis</i>	29
Figure 3 : Représentation schématique de la pénétration de <i>S. suis</i> sérotype 2 à travers la barrière épithéliale.....	32
Figure 4 : Représentation schématique des VlpB et C de <i>M. hyorhinis</i>	48
Figure 5 : Représentation schématique de l'adhésion de <i>M. hyopneumoniae</i> à l'épithélium respiratoire porcin modifié.....	53
Figure 6 : Représentation schématique modifié de la réponse immunitaire de l'hôte après une infection à <i>M. hyopneumoniae</i>	55
Figure 7 : Représentation schématique de la voie de signalisation MyD88 et TRIF.....	61
Figure 8 : Représentation schématique de marqueurs cellulaires présents à la surface des macrophages.....	70
Figure 9 : Observation pathologique des poumons de porcs co-infectés avec <i>PRRSV</i> et <i>S. suis</i>	82

Article scientifique :

Figure 1 : Adhesion and invasion of NPTrs by <i>S. suis</i> serotype 2 strain P1/7 or strain $\Delta cps2F$	108
Figure 2 : Phagocytosis of <i>S. suis</i> serotype 2 strain P1/7 and $\Delta cps2F$ mutant by PAMs and BM-DCs.....	109
Figure 3 : Intracellular survival of <i>S. suis</i> serotype 2 strain P1/7 and $\Delta cps2F$ mutant PAMs and BM-DCs.....	111
Figure 4 : Percentage cytotoxicity of NPTr and PAMs BM-DCs.....	113

Figure 5 : Relative expression of IL-6 and IL-8 cytokines expressed by NPTr cells, PAMs and BM-DCs by RT-qPCR.....116

Figure 1 supplémentaire: Percent cytotoxicity of BM-DCs.....123

Annexes :

Figure 1 : Adhésion de *S. suis* après la pré-infection des cellules NPTr par *M. hyopneumoniae* pendant 48 h.....159

Figure 2 : Phagocytose de *S. suis* sans sérum en présence des PAMs et des BM-DCs.....160

Figure 3 : Apoptose précoce et tardive des cellules NPTr, des PAMs et des BM-DCs.....161

Figure 4 : Exemple d'images obtenus par FACS montrant l'apoptose des BM-DCs.....162

Liste des tableaux

Article scientifique :

Tableau 1: List of strains used in this study.....	100
Tableau 2: List of primers and probes for qPCR for mycoplasma.....	100
Tableau 3: List of primers for RT-qPCR used in this study.....	106
Tableau 1 supplementary: Titration of <i>M. hyopneumoniae</i> and <i>M. hyorhinis</i> expressed in color-changing units per milliliter (CCU/mL).....	122

Liste des sigles et abréviations

AFLP : Amplified fragment length polymorphism

AFSV : African swine fever virus

ARNr : ARN ribosomique

Atl : Autolysine

BALT : Bronchus-associated lymphoid tissue

BALF : Bronchoalveolar lavage fluid

BBB : Blood-brain barrier

BCSFB : Blood-cerebrospinal fluid barrier

BMEC : Brain microvascular endothelial cell

BM-DC: Bone-marrow-derived dendritic cells

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : Cellules présentatrices de l'antigènes

CPEC : Choroid plexus epithelial cells

CPS : Capsule polysaccharidique

EF : Extracellular factor

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

EP : Pneumonie enzootique

FACS : Fluorescence-activated cell sorting

GAG : Glycosaminoglycanes

HLA : Human leukocyte antigen

IFN : Interféron

IL-6/IL-8: Interleukines-6/8

LacCer : Lactosylcéramide

LAMP : Loop isothermal amplification

LAMPs : Lipid-associated membrane proteins

LPS : Lipopolysaccharide

LTA : Acide lipotéichoïque

MAC : Membrane attack complex

MAMA-PCR : Mismatch amplification mutation assay-polymerase chain reaction

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MEC : Matrice extracellulaire

MET : Macrophages extracellular traps

MLST: Multilocus sequence typing

MLVA : Multiple-locus variable number tandem repeats

MRP : Muramidase-release protein

NET : Neutrophil extracellular traps

NK : Natural killer

NO : Nitric oxide

NPTr : Newborn pig tracheal cells

PAMs : Porcin alveolar macrophages

PAMPs : Pathogen-associated molecular patterns

PCR : Polymerase chain reaction

PCR-RFLP : PCR restriction fragment length polymorphism

PCLS : Porcine precision-cut lung slice

PCVAD : Maladie associée au circovirus porcin

PCV2 : Porcine circovirus type 2

PFGE : Pulsed-field gel electrophoresis

PG : Peptidoglycane

PMWS : Postweaning multisystemic wasting syndrome

PRDC : Porcine respiratory disease complex

PRR : Pattern recognition receptors

PRRSV : Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

PS : Phosphatidylsérine

RAPD : Random amplified polymorphic DNA

ROM : Reactive oxygen metabolites

ROS : Reactive oxygen species

SIV : Swine influenza virus

SLA : Swine leukocyte antigen

SNC : Système nerveux central

ST: Sequence type

STEC : Cellules épithéliales trachéales porcines

STSLs : Streptococcal toxic shock-like syndrome

TGF- β 1 : Transforming growth factor

TLR : Toll-like receptors

TNF : Tumor necrosis factor

Remerciements

- Je souhaite remercier infiniment mon directeur de maitrise, Dr. Marcelo Gottschalk, pour m'avoir d'abord accueillie en stage de master et par la suite en maitrise. Merci pour tous vos conseils et votre patience. Je vous remercie de m'avoir épaulé durant cette maitrise et de m'avoir appris énormément de choses ce qui m'a permis de grandir en tant que scientifique. Merci également pour votre soutien financier.
- Je remercie chaleureusement ma co-directrice de maitrise, Dre. Mariela Segura pour ses nombreux conseils sur le FACS qui m'ont été d'une grande aide. Merci pour vos encouragements et merci pour votre expertise qui m'ont permis d'en apprendre davantage. Merci d'avoir pris le temps de toujours corriger mes séminaires ou mes affiches de congrès. Merci pour votre gentillesse et votre joie de vivre.
- Je tiens à remercier ma co-directrice, Dre. Corinne Marois-Créhan pour m'avoir accueillie dans son laboratoire pour mon stage de maitrise. Merci infiniment pour votre expertise sur les mycoplasmes porcins qui m'a permis d'en apprendre énormément sur ce sujet, pas vraiment simple à maîtriser. Merci pour tous ces conseils, votre amabilité et votre disponibilité. Merci à Véronique Tocqueville pour ton expertise et ta disponibilité.
- Merci infiniment à Sonia Lacouture, agente de recherche du Dr. Marcelo Gottschalk qui a toujours été là pour moi. Merci de m'avoir soutenu, de m'avoir épaulé et écouté dans les bons comme dans les mauvais moments. Je te remercie pour tous tes conseils très utiles, ta patience et ta bienveillance.
- Je tiens également à remercier Mélanie Lehoux, agente de recherche de la Dre. Mariela Segura, pour m'avoir énormément aidé avec mes expériences de FACS. Merci beaucoup pour ton temps, tes conseils et ta sympathie.
- Merci également à Servane Payen qui m'a fait passer d'excellents moments en dehors comme au laboratoire. Tu m'as beaucoup aidé et toujours soutenu, au fil des années tu es devenu plus qu'une collègue, mais une véritable amie. Je tiens également à remercier Mareva Bleuzé, Dominic Dolbec pour avoir passé de merveilleux moments en votre compagnie. Merci aux membres de nos laboratoires Annie Gaudreau, Alexis Asselin de Beauville, Justine Lacasse, Katerine Aubé et Mélanie Gilbert.
- Je remercie ma famille et mon mari pour leur soutien sans failles au fils de mes études et pendant cette maitrise.
- Enfin je tiens à remercier tous les organismes subventionnaires soient le GRÉMIP, le CRIPA et la Faculté de Médecine Vétérinaire.

I. Introduction

Streptococcus suis est une bactérie Gram positive, encapsulée qui colonise le tractus respiratoire des porcs. C'est un agent pathogène important au niveau mondial, qui est responsable de pertes économiques majeures dans les élevages. C'est également un agent pathogène zoonotique émergent dans le monde entier. En effet, il est responsable chez l'humain de méningites et de chocs septiques principalement. Des cas d'arthrites, d'endocardites (1, 2) et d'autres infections ont également été rapportées (3, 4). Dans les pays d'Asie, *S. suis* est souvent à l'origine de méningites sévères chez l'adulte, et au Vietnam il est décrit comme étant le principal agent pathogène causant des méningites chez l'adulte (1, 5, 6). À ce jour, *S. suis* est divisé en 29 sérotypes et le sérotype 2 est considéré comme le plus virulent et il est le plus fréquemment rencontré dans les cas cliniques (7).

Les maladies retrouvées à la suite d'une infection à *S. suis* chez le porc se traduisent par des méningites, des arthrites, des endocardites, des septicémies avec la mort subite des animaux (1, 2, 5). Quand cette bactérie est retrouvée chez le porc comme agent pathogène secondaire, il peut parfois être responsable de pneumonie (4, 5, 8). La bactérie pénètre au niveau des voies respiratoires supérieures du porc et colonise les amygdales. Elle est capable de traverser la barrière épithéliale des muqueuses de l'hôte (par des mécanismes encore peu connus) pour ensuite se retrouver dans la circulation sanguine où elle peut survivre et se multiplier provoquant des septicémies avec parfois la mort subite des porcs (1, 6, 9). Sa multiplication dans la circulation sanguine, lui permet également de diffuser à travers tout l'organisme et de traverser la barrière hémato-encéphalique (BBB) et/ou la barrière hémato-céphalo-rachidienne (BCSFB) induisant des méningites (1, 2, 5). De plus, *S. suis* engendre une réponse inflammatoire importante chez l'hôte (inflammation exacerbée) et celui-ci ne sera pas en mesure de la contrôler, ce qui peut provoquer la mort subite des porcs (6). La reconnaissance de *S. suis* par les TLR-2 induit la libération de médiateurs pro-inflammatoires ainsi que l'expression des molécules co-stimulantes *via* des voies de signalisation intracellulaires (10, 11).

Il est supposé que *S. Suis* pourrait ne pas agir seul et profiter d'une infection concomitante ou antérieure afin d'induire une plus forte pathogénèse. En effet, il est rapporté plusieurs cas d'un effet synergique entre *S. suis* et d'autres micro-organismes, entres autres avec le « porcine

reproductive and respiratory syndrome virus » (*PRRSV*) et le « swine influenza virus » (*SIV*) (12-14).

Dans les élevages porcins on retrouve de nombreux cas d'infections mixtes (bactérie-virus ; virus-virus et/ou bactérie-bactérie) qui affectent le système immunitaire et sont la cause la plus fréquente des pertes économiques observées sur le terrain. On retrouve dans ces élevages le complexe respiratoire porcin : PRDC. Il prédispose les animaux à des infections concomitantes avec des agents pathogènes respiratoires comme des bactéries, des virus ou des parasites (15-17). Le PRDC survient principalement à la suite d'une co-infection bactérienne et/ou virale qui peut intensifier ou prolonger les signes cliniques (18, 19). Les pathogènes « primaires » les plus fréquemment rencontrés, mis en cause dans le PRDC, sont le *PRRSV*, le « porcine circovirus type 2 » (*PCV2*), *Actinobacillus pleuropneumoniae* et *M. hyopneumoniae* (16, 19). Les agents pathogènes « secondaires » retrouvés dans le PRDC, qui ont besoin de l'aide des agents « primaires » pour induire la maladie respiratoire, sont *S. suis*, *M. hyorhinis*, *Glaesserella parasuis*, *Actinobacillus suis* et *Pasteurella multocida* (14, 18, 20).

M. hyopneumoniae est l'agent étiologique de la EP, qui est une maladie respiratoire chronique chez le porc. Ce mycoplasme est capable d'échapper aux défenses de l'hôte lors des premiers stades de la pneumonie (21). Les porcs infectés vont ensuite enclencher une forte réponse immunitaire qui va provoquer des lésions tissulaires observées dans le tissu pulmonaire (15, 22). Ce pathogène est donc capable de moduler et d'altérer la réponse immunitaire de l'hôte favorisant les surinfections par des agents associés au PRDC (15, 17). *M. hyorhinis* est principalement décrit comme provoquant une inflammation des séreuses, la polysérosite. Ce pathogène peut également être retrouvé dans le tractus respiratoire des porcs sans que l'animal ne manifeste de signes cliniques (17, 23). Cette bactérie a également été identifiée dans des cas de co-infections avec *PRRSV* ou *PCV2* et pourrait jouer un rôle dans l'établissement des maladies respiratoires porcines induites par ces virus (16, 17).

De nombreux éléments d'incompréhension subsistent dans la pathogénèse de *S. suis* et également dans les réponses immunitaires de l'hôte mises en place lors d'une infection avec cette bactérie. Notamment quand *S. suis* est retrouvé dans des cas de co-infection avec d'autres

bactéries lors de pneumonie chez le porc. À ce jour aucune étude n'a mis en évidence une potentielle interaction entre *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* et *S. suis*.

Donc, l'hypothèse générale de ce projet est qu'une pré-infection par *M. hyopneumoniae* et/ou *M. hyorhinis* favorise une infection causée par *S. suis*.

L'objectif général de ce projet est de mieux comprendre les premières étapes de la pathogénèse de *S. suis*, quand la bactérie pourrait être retrouvée dans des cas de co-infection avec *M. hyopneumoniae* et/ou *M. hyorhinis* et de mettre en évidence et de comprendre la réponse inflammatoire induite lors de ces co-infections.

Des objectifs spécifiques ont été définis :

L'objectif spécifique n°1 est d'étudier *in vitro* l'effet de la pré-infection de *M. hyopneumoniae* et/ou *M. hyorhinis* sur les interactions de *S. suis* avec les NPTr.

- Étudier l'effet de la pré-infection sur l'adhésion et l'invasion de *S. suis*.
 - Mettre en évidence l'effet cytotoxique de la pré-infection sur les NPTr.
 - Déterminer le mécanisme mis en place induisant la mort des NPTr.
 - Étudier l'effet de la pré-infection sur la production de médiateurs inflammatoires.
- **L'objectif spécifique n°2** est d'étudier *in vitro* l'effet de la pré-infection de *M. hyopneumoniae* et/ou *M. hyorhinis* sur l'interaction de *S. suis* avec les cellules du système immunitaire innée : les PAMs et les BM-DCs.
- Étudier l'effet de la pré-infection sur la phagocytose et la survie intracellulaire de *S. suis*.
 - Mettre en évidence l'effet cytotoxique de la pré-infection sur les PAMs et des BM-DCs.
 - Déterminer le mécanisme mis en place induisant la mort des cellules immunitaires.
 - Étudier l'effet de la pré-infection sur la production de médiateurs inflammatoires.

II. Revue de littérature

1. *Streptococcus suis*

1.1 Caractéristiques générales

S. suis est une bactérie encapsulée, de forme ronde (coque) à coloration de Gram positive. La bactérie est le plus souvent retrouvée isolée, ou par paire. Elle peut également être retrouvée en courte chaînette (3, 7). La majorité des souches de *S. suis* présentent une α -hémolyse sur les géloses Columbia supplémentées avec du sang de mouton ou du sang de bovin après 24h d'incubation à 37°C (3, 7, 24). La bactérie croit en condition aérobie, mais la croissance est renforcée en condition microaérophile (3).

S. suis est principalement retrouvé au niveau des amygdales et des cavités nasales des porcs. La bactérie peut également être retrouvée au niveau du tractus digestif et génital porcin (5, 25). Les porcs et les sangliers sont considérés comme les réservoirs naturels de la bactérie et peuvent être porteurs sains mais celle-ci a été retrouvée chez d'autres espèces animales comme les oiseaux, les lapins de garenne, les ruminants, les chiens et les chats (2). La plupart des porcs présents dans les élevages du monde entier sont porteurs de *S. suis*, faisant de cette bactérie un agent pathogène majeur des industries porcines induisant une importante baisse économique (1, 2). En effet, à la suite d'une infection à *S. suis* les porcs peuvent développer de nombreuses pathologies dont la méningite, la septicémie, l'arthrite, l'endocardite et la pneumonie. La mort subite des porcelets et des porcs en croissance peut également être observée. *S. suis* est également un agent zoonotique qui peut causer des méningites, un choc septique désigné sous le nom de « streptococcal toxic shock-like syndrome » (STSLs) qui n'est pas dû à des super-antigènes et d'autres pathologies moins courantes (1-5, 8, 26). Il existe une grande diversité génotypique et phénotypique au sein du taxon de *S. suis* ce qui augmente la complexité de l'étude de ce pathogène (2, 25).

1.2 Sérotypage et distribution géographique

1.2.1. Classification de *S. suis*

Initialement, 35 sérotypes de *S. suis* (sérotypes 1 à 34 et le sérotypes 1/2) ont été décrits sur la base d'une réaction sérologique dirigée contre la capsule polysaccharidique (CPS) grâce aux tests de coagglutination, de réaction capsulaire et de précipitation capillaire (2, 7). Cependant, plus récemment, il a été proposé que les sérotypes 20, 22, 26, 33, 32 et 34 appartiennent à de nouvelles espèces bactériennes (1, 7, 25). En effet, une analyse de séquence basée sur les gènes codant pour l'ARN ribosomique (ARNr) 16S et le gène *cpn60* suggère que les sérotypes 32 et 34 sont divergents de *S. suis* et font partie de l'espèce *Streptococcus orisratti* (27). Une analyse récente de l'ARNr 16S a également révélé que les sérotypes 20, 22 et 26 de *S. suis* sont génétiquement différents des autres souches de *S. suis*. Par conséquent, la définition d'une nouvelle espèce *Streptococcus parasuis* a été proposée pour ces trois sérotypes (28). À la suite d'analyses phylogénétiques basées sur les gènes de l'ARNr 16S, du gène *sodA* et d'une méthode d'hybridation ADN-ADN, l'espèce *Streptococcus ruminantium* a été proposé pour remplacer le sérotypes 33 de *S. suis* (29).

1.2.2. « Sérotypage » moléculaire de *S. suis*

Le sérotypage de *S. suis* permet de surveiller les souches potentiellement pathogènes et de mettre en avant la diversité de cette espèce bactérienne (30, 31). Le sérotypage des souches était basé sur trois méthodes : la réaction capsulaire, la précipitation capillaire et le test de coagglutination sur lame (32, 33). Ce dernier était le test le plus fréquemment utilisé en Amérique du Nord et il est parfois encore utilisé (7, 32).

Cependant, peu de laboratoires possèdent l'intégralité des antisérums de références dirigés contre la totalité des sérotypes de *S. suis* (34). Il existe également des réactions croisées entre les sérotypes 1 et 14 et le sérotypes 1/2 qui réagit avec les antisérums dirigés contre le sérotypes 1 et 2 indiquant que ces sérotypes possèdent des déterminants antigéniques communs (31, 34, 35). De plus, certains isolats de terrains n'expriment pas de CPS lors de la culture bactérienne alors qu'ils possèdent dans leurs génomes les loci *cps* (34). Par conséquent, il a été développé des

méthodes de « polymerase chain reaction » (PCR) qui se sont révélées être spécifiques, rapides et sensibles pour déterminer le sérotype des souches de *S. suis*. Ces techniques de PCR sont basées sur l'amplification des gènes *cps* des différents sérotypes de *S. suis* qui sont généralement regroupés dans un même locus (31, 35).

Par exemple, il a été développé une technique de PCR en multiplexe en quatre étapes permettant l'identification des 29 sérotypes de *S. suis* à partir d'isolats humains et porcins, par l'amplification des différents gènes *cps* (allant du sérotype 1 à 19, le sérotype 21, du sérotype 23 à 25, du sérotype 27 à 31 et le sérotype 1/2) (36). Okura et al. (30), ont développé une technique de PCR multiplexe en deux étapes permettant de cibler les 35 sérotypes de *S. suis* par l'amplification des différents gènes *cps*. La technique a été validée par des isolats de *S. suis* issus de porcs malades et sains, de bovins malades et sains, de moutons malades et de patients humains (30). Cependant, ces techniques de PCR ne permettaient pas de faire la distinction entre les sérotypes 1 et 14 et les sérotypes 2 et 1/2 car ces sérotypes présentent des similitudes importantes au niveau de leurs loci *cps*. Très récemment, il a été décrit une nouvelle technique basée sur l'amplification d'une mutation par mésappariement nommé « mismatch amplification mutation assay » (MAMA-PCR) ce qui permet de faire la distinction entre les sérotypes 1 et 14 et les sérotypes 2 et 1/2 (33).

Cependant, il existe des souches de *S. suis* dites « non-typables », c'est-à-dire qu'elles ne réagissent avec aucun antisérum de référence (dirigé contre les 34 sérotypes décrits). Ces souches peuvent soit être des bactéries véritablement encapsulées appartenant à de nouveaux types capsulaires de *S. suis* soit être des souches de *S. suis* appartenant à des sérotypes connus qui ne présentent pas de capsule (7). Plusieurs de ces bactéries dites « non-typables » ont été retrouvées chez des porcs malades et donc leurs pouvoirs pathogènes ne doivent pas être ignorés (7, 25).

1.2.3. Distribution mondiale des sérotypes

Parmi les 35 sérotypes anciennement décrits de *S. suis*, les sérotypes prédominants retrouvés chez les porcs malades au niveau mondial sont dans l'ordre croissant (du plus retrouvé au moins retrouver) : sérotype 2, 9, 3, 1/2 et 7 (7, 25). Cependant, il est observé une distribution des sérotypes de *S. suis* qui diffère selon la localisation géographique (1, 2, 7). En effet, au Canada le sérotype 2 est le plus prévalent alors qu'aux États-Unis c'est le sérotype 1/2 (1, 7, 25, 36). En

Amérique du Sud, les études épidémiologiques rapportent que le sérotype 2 est le plus fréquemment rencontré suivi des sérotypes 1/2, 14, 7 et 9. En Asie, il est également fréquemment retrouvé chez les porcs le sérotype 2 suivi des sérotypes 3, 4, 7 et 8. Depuis les années 2000, la prédominance du sérotype 2 dans plusieurs pays d'Europe a été remplacé par le sérotype 9 dans les élevages porcins (1, 2, 7, 25). Alors, la distribution des sérotypes en Europe est la suivante par ordre d'importance le 9, 2, 7, 8 et 3 (7). Pour les infections humaines à *S. suis*, le sérotype 2 a également été le plus fréquemment rapporté dans le monde entier avec une prévalence d'environ 75 % suivi du sérotype 14, loin derrière, avec une prévalence de 2 %. Dans les pays asiatiques (comme la Thaïlande, le Vietnam et la Chine), le plus grand nombre de cas de méningites humaines sont dues à *S. suis* sérotype 2 (7). Cependant, il a été rapporté en Thaïlande un cas d'infection humaine à *S. suis* sérotype 9 (37). En Europe, des cas d'infections humaines dues à *S. suis* ont été signalées pour la première fois au Danemark en 1968 (6, 7). Le sérotype 2 est considéré historiquement comme le sérotype le plus virulent et le plus fréquemment rencontré lors des cas de maladies porcines et humaines dans la majorité des pays du monde et par conséquent, la plupart des études portant sur le pathogène ont utilisé des souches de sérotype 2 (1, 2, 7, 25).

1.2.4. Distribution mondiale des séquences types (ST)

La technique « multiLocus sequence typing » (MLST) est basée sur le séquençage de plusieurs gènes nommés de « ménage » qui permet de classer les différentes souches de *S. suis* en séquence type (ST). En 2002, King et *al.* déterminent un modèle de MLST pour *S. suis* en utilisant sept gènes de ménage : *cpn60*, *dpr*, *recA*, *aroA*, *thrA*, *gki* et *mutS* (1, 2, 7). Cette technique a été utilisée par de nombreux laboratoires pour déterminer les STs responsables des infections porcines et humaines de *S. suis* à travers le monde et permet également de recueillir des informations sur la diversité génétique de *S. suis*. Plus de 1100 STs ont été recensés chez la bactérie (1, 2, 25, 36). La majorité des études MLST mondiales des cas porcins et humains se sont portées sur le sérotype 2 car c'est le sérotype le plus fréquemment rencontré. Comme pour les sérotypes, la distribution mondiale des STs de *S. suis* diffère selon la localisation géographique (voir la figure n°1). En effet, les souches présentent principalement en Amérique du Nord sont les types ST25 (humain et porcine) et ST28 (porcine uniquement) et très peu de cas ont été retrouvés

avec le type ST1 (1, 2, 7, 36). En revanche, les souches de ST1 du sérotype 2 sont principalement associées aux maladies porcines et humaines en Europe, en Argentine et dans certains pays d'Asie comme le Cambodge, la Chine continentale, le Vietnam, le Japon et la Thaïlande (2, 7). On retrouve en Thaïlande et au Japon les types ST104 et ST28, respectivement (7). Le type ST7 du sérotype 2 est à l'origine des épidémies de méningites chez l'adulte de 1998 et de 2005, et a aussi été retrouvée de façon endémique en Chine continentale (2, 7). L'hypothèse d'une virulence inférieure des souches nord-américaines reposant sur des gènes différents a été confirmée en montrant que les souches de ST1 sont significativement plus virulentes que les souches de ST28, tandis que les souches de ST25 présentent une virulence intermédiaire (2, 38).

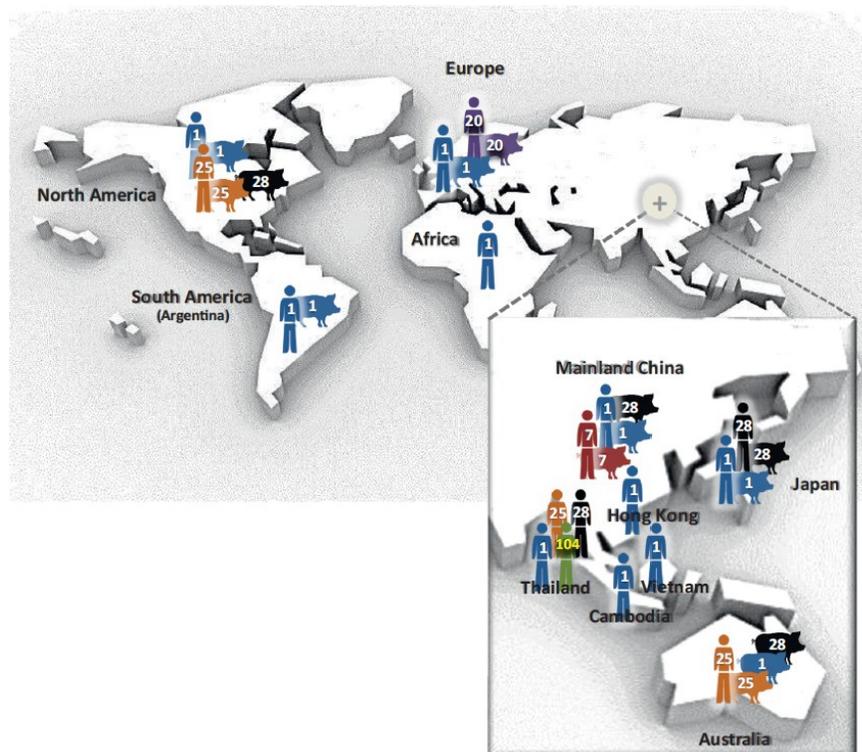


Figure 1: Distribution mondiale des « sequences types » (ST) du sérotype 2 de *S. suis* de cas cliniques porcins et humains déterminés par la technique MLST (Segura et al., 2017)

1.3 Détection directe de *S. suis*

Auparavant, les isolats de *S. suis* issus d'animaux malades étaient identifiés sur la base de quatre tests biochimiques qui se résument par une absence de croissance sur un milieu contenant 6,5% de NaCl, un test Voges-Proskauer négatif et une production d'acide à partir de tréhalose ou salicine (3, 25). Par la suite, des tests biochimiques commerciaux nommés API 20 STREP ont été

développés, mais ces tests ne sont pas fiables à 100 %, certaines souches peuvent être mal identifiées (7). Il est également difficile d'identifier *S. suis* sur la seule base des tests biochimiques, car la microflore buccale des porcs présente d'autres espèces appartenant au genre *Streptococcus* qui sont phénotypiquement similaires à *S. suis* (7, 39, 40). Les isolats cliniques peuvent également être identifiés par coagglutination en utilisant des antisérums de références (7). Cependant, la technique nécessite l'usage d'anticorps préalablement produits avec des animaux et dirigés contre les 35 sérotypes (anciennement) de *S. suis*, ce qui engendre un coût pour le laboratoire de diagnostic (25).

Pour remédier à cela, des techniques de PCR ont été développées en simplexe ou multiplexe pour permettre l'identification des sérotypes de *S. suis* responsable de la maladie (41, 42). La plupart des techniques de PCR ont pour cible le sérotype 2. L'une des méthodes de PCR la plus utilisée, est basée sur l'amplification du gène de ménage *gdh* qui code la glutamate déshydrogénase (7, 25, 43). Cependant, cette technique présente un risque d'identification erronée de *Streptococcus gallolyticus* comme *S. suis* et elle est applicable seulement pour détecter les isolats de *S. suis* sur des cultures pures, mais pas à partir d'échantillons de terrains (7, 25, 42). En 2004, l'équipe de recherche de Marois et *al.* (42), a mis au point une technique de PCR multiplexe pour détecter *S. suis* (plus précisément les sérotypes 2 et 1/2) dans des échantillons amygdaliens de porcs, sans passer par une étape de culture bactérienne. Le test PCR était basé sur l'amplification d'un fragment de gène codant pour l'ARNr 16S de *S. suis* et un fragment de gène codant pour le gène *cps2J* impliqué dans la biosynthèse de la capsule de *S. suis* sérotype 2 et 1/2 (42). Maintenant les cultures suspectes de *S. suis* sont identifiées principalement par « matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry » (MALDI-TOF MS) (25, 44). D'autres techniques plus récentes ont aussi été développées comme la technique « loop isothermal amplification » (LAMP) (25).

1.4 Infection et transmission de *S. suis*

Les études sur la pathogénèse de *S. suis* se sont surtout focalisées sur les souches hautement virulentes chinoises de type ST7 ou les souches virulentes européennes de type ST1 de sérotype

2. Malgré un nombre important d'études, la pathogénèse de l'infection à *S. suis* n'est pas encore complètement comprise.

1.4.1. Chez le porc

S. suis est un agent pathogène important retrouvé chez les porcs de tous âges. Cependant, la maladie est plus fréquemment rencontrée chez les porcelets post-sevrés, âgés de 5 à 10 semaines, dans la mesure où ceux-ci sont fragilisés par une diminution de l'immunité maternelle et une mise en place progressive de leurs propres immunités (6). La principale voie de transmission de la bactérie d'un porc à un autre se fait par voie aérienne (oro-nasale) (1, 2, 5). La bactérie peut également être transmise pendant la mise bas *via* les sécrétions vaginales des truies vers les porcelets, au niveau de la cavité buccale et nasale. Les porcelets sont donc colonisés par *S. suis* au niveau des amygdales peu après leurs naissances (1, 2, 5, 6). La transmission horizontale (6), entre la truie et les porcelets, a été décrite et se produit également par voie aérienne (1, 5). La transmission par aérosol a également été démontrée (1, 45). Des études *in vivo* chez le porc, menées dans le but de reproduire la maladie et d'observer les signes cliniques dans des conditions naturelles, ont permis de mettre en évidence que les voies d'inoculation intranasale ou par aérosolisation ne sont pas efficaces. Il a été montré qu'il fallait au préalable porter atteinte à la muqueuse nasale par de l'acide acétique pour permettre une colonisation optimale de *S. suis* au niveau de la cavité nasale (46).

1.4.2. Chez l'humain

S. suis est un agent pathogène zoonotique. Dans certains endroits d'Asie, comme le Vietnam, la Thaïlande et la Chine, les infections à *S. suis* induisant des méningites sont fréquemment rencontrées (1, 2, 5, 7). Les personnes étant en contact avec les porcs, avec de la viande de porc ou encore avec des produits dérivés du porc sont davantage susceptibles de développer une infection à *S. suis* (2, 5, 9). La voie d'entrée du micro-organisme chez l'humain se fait par de petites blessures provoquant une atteinte à l'intégrité de la peau ou par l'ingestion de viande de porc crue ou mal cuite (2, 5, 6, 9). Il a été prédit que des prédispositions chez l'humain pourraient faciliter le passage de la bactérie de l'intestin à la circulation sanguine. En effet, des études

menées avec des souris, qui étaient au préalable atteintes de cirrhoses, ont été inoculées par voie orale avec *S. suis* et présentaient une bactériémie et une méningite à la suite de l'infection (47). À ce jour, aucune transmission d'humain à humain n'a été observée (5).

1.5 Pathogénèse de *S. suis*

S. suis est une bactérie invasive qui est capable d'adhérer et de coloniser les différentes barrières (muqueuses, épithéliales et endothéliales) de son hôte, de disséminer à travers l'organisme grâce à sa survie dans la circulation sanguine infectant plusieurs organes (comme le cœur, le foie et la rate). *S. suis* peut également traverser la barrière hémato-encéphalique du système nerveux central (SNC) induisant des méningites avec une réponse inflammatoire exacerbée (voir la figure n°2). Les études sur la pathogénèse se sont concentrées particulièrement sur le sérotype 2 et malgré toutes les données obtenues à ce jour, certains points ne sont pas encore très bien élucidés.

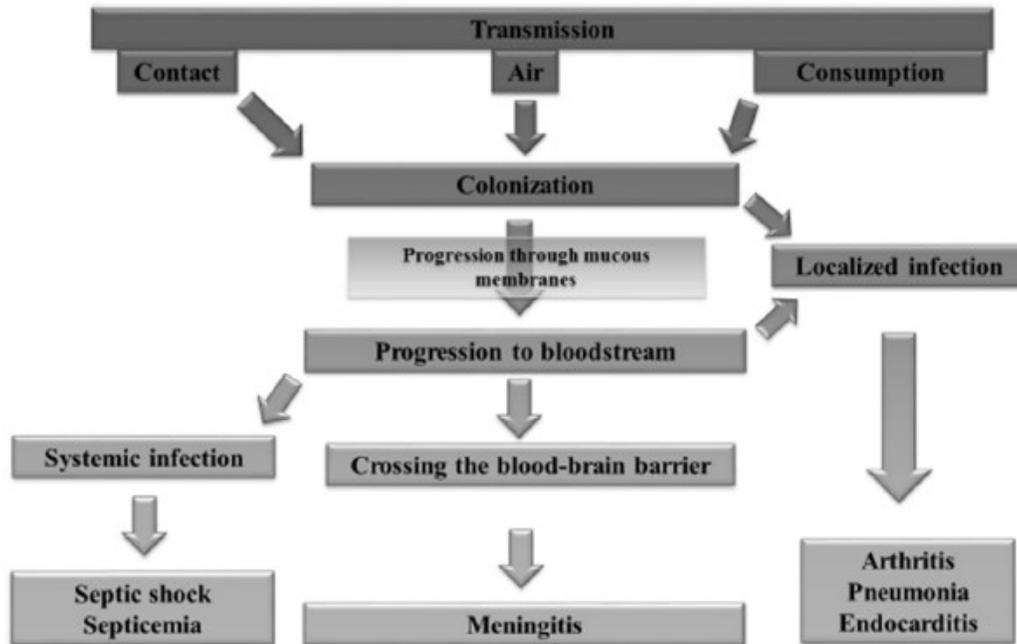


Figure 2 : Représentation schématique du processus de pathogénèse des infections à *S. suis* (Haas et al., 2017)

1.5.1. Colonisation : adhérence et invasion des surfaces muqueuses et épithéliales

S. suis est retrouvé au niveau de la surface palatine des amygdales et des invaginations profondes du tissu épithélial et lymphoïde qui forment de nombreuses cryptes (5). Il est donc possible que *S. suis* puisse se cacher au niveau de ces cryptes, échapper au système immunitaire inné et persister au niveau de ces cryptes ramifiées (5, 6). Lors d'une infection à *S. suis* chez le porc et chez l'humain, l'adhésion et l'invasion des muqueuses respiratoires et intestinales/épidermiques sont les premières étapes dans le développement d'une maladie invasive (5, 6).

Le mucus composé principalement de glycoprotéines de haut poids moléculaire, de lipides et d'immunoglobulines est retrouvé au niveau du tractus respiratoire (5). Une étude chez le porc a mis en évidence l'interaction de *S. suis* avec les glucides présents dans le mucus. Il a également été montré que *S. suis* peut se lier *in vitro* au mucus gastrique porcin via une enzyme nommée ApuA, mais la capacité de pénétrer et dégrader la couche de mucus n'a jamais été étudiée (48). La capsule semble également jouer un rôle protecteur pour *S. suis* dans cette étape de la pathogénèse (9).

S. suis est capable de se lier aux composants de la matrice extracellulaire (MEC) présente autour des cellules. Différentes molécules présentes chez *S. suis* peuvent adhérer à la fibronectine, à la fibrine, à la laminine, à différents types de collagènes, à la vitronectine et aux protéoglycanes (1, 5, 6, 9). Les principales molécules bactériennes impliquées dans ces interactions comprennent l'énolase, la protéine libérée par la muramidase (MRP), la protéine de liaison de la fibronectine (Ssa) et l'autolysine (Atl) (9). Il a également été décrit que la plupart de ces molécules d'adhésion sont en partie couvertes par la CPS (5). L'adhésion de *S. suis* aux différents composants de la MEC pourrait faciliter son interaction avec les cellules de l'hôte (1, 5, 9). Par exemple, *S. suis* peut se lier au plasminogène qui pourrait favoriser l'invasion tissulaire des bactéries. En effet, le plasminogène activé en plasmine est une protéase ayant la capacité de détruire les composés de la MEC comme la fibronectine/fibrine et le collagène (9).

Après le passage du mucus et de la MEC, *S. suis* peut adhérer aux cellules épithéliales du tractus respiratoire. Dans une revue de Segura et al. (5), il est énuméré plus de 30 protéines de *S. suis* responsables de l'adhésion bactérienne à différentes lignées cellulaires épithéliales chez le porc et chez l'humain (NPT_r, Hep-2, HeLa). Il a été observé que les liaisons de *S. suis* aux cellules seraient de nature hydrophobe, cationiques et spécifiques par un ligand se liant à un récepteur avec une affinité importante (5). Au début, beaucoup d'études se sont intéressées à l'adhésion de *S. suis* avec les cellules laryngées humaines, mais la voie d'entrée, par les voies respiratoires, n'a jamais été clairement démontrée pour l'humain. Par la suite, l'utilisation des cellules trachéales épithéliales de porc semblaient plus adéquates pour les études de pathogénèse (5). Des études ont permis de mettre en évidence que la CPS pouvait cacher partiellement les protéines impliquées dans l'adhésion de *S. suis* ce qui suggère que la CPS pourrait réduire l'adhésion de *S. suis* à la surface des cellules (5, 6, 49, 50). L'hypothèse de la régulation de l'expression de la CPS, en fonction des étapes de colonisation, a été émise. La CPS pourrait être régulée à la hausse pendant les étapes précoces de la colonisation (traversée du mucus) et pourrait être régulée à la baisse pendant les étapes tardives de la colonisation (adhésion et invasion des surfaces muqueuses) (5, 9). Une étude *in vitro* a mis en évidence la capacité d'adhérence de *S. suis* à la surface des cellules épithéliales intestinales porcines et humaines (51).

Après l'adhésion de *S. suis* aux cellules du tractus respiratoire, la bactérie devrait avoir la capacité d'envahir ces cellules afin de rejoindre la circulation sanguine et disséminer à travers l'organisme. Mais la capacité d'envahissement des cellules épithéliales par *S. suis* est controversée dans la littérature (5, 6). L'invasion des cellules épithéliales du tractus respiratoire ou du tractus intestinal par *S. suis* est très limitée voire inexistante (6). Il a été suggéré que *S. suis* peut traverser la barrière intestinale non pas en passant à l'intérieur des cellules intestinales, mais en passant entre les cellules en fragilisant les jonctions serrées grâce à des protéases (52). Très récemment, une étude a démontré que *S. suis* sérotype 2 est capable de se lier à la vimentine, un composé du cytosquelette cellulaire, favorisant la pénétration de la bactérie à travers la barrière épithéliale. En effet, l'Atl de *S. suis* sérotype 2, en se liant à la vimentine à la surface des cellules épithéliales trachéales porcines (STEC), serait capable d'induire la phosphorylation de la chaîne légère de la

myosine II (moteur moléculaire lié à la motilité) provoquant la redistribution des jonctions serrées et ainsi augmentant la perméabilité de la barrière épithéliale (voir figure n°3) (53).

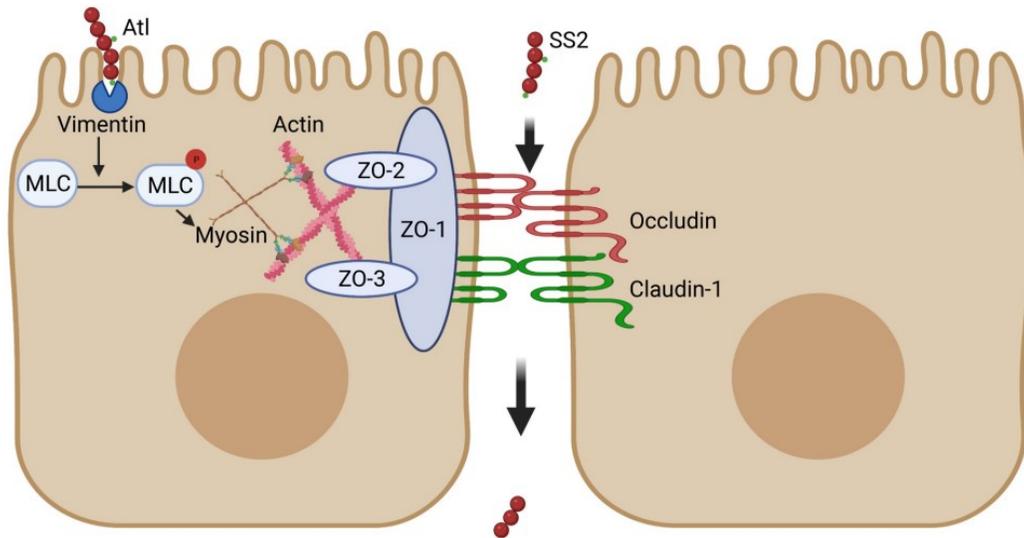


Figure 3 : Représentation schématique de la pénétration de *S. suis* sérotype 2 à travers la barrière épithéliale. L'autolysine (atl) permet de fixer *S. suis* à la surface des cellules STEC puis l'adhésion à la vimentine induit la phosphorylation de la myosine II. Cette phosphorylation entraîne le remaniement des protéines zona occludens (protéines des jonctions serrées) qui relient les protéines occludine et claudine au cytosquelette d'actine (Meng et al., 2022).

1.5.2. Dissémination dans la circulation sanguine

Après avoir traversé les barrières épithéliales chez le porc et les barrières intestinales chez l'humain, *S. suis* se dissémine dans la circulation sanguine et peut induire une bactériémie suivie d'une septicémie (1, 9). *S. suis* est capable de survivre dans la circulation sanguine principalement grâce à sa CPS et peut également échapper à la phagocytose induite par les macrophages/monocytes et neutrophiles retrouvés dans la circulation (1, 2, 6, 9). On retrouve dans la circulation sanguine, le système du complément qui grâce à la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC), constitué de diverses protéines, permet de créer des pores dans la paroi des bactéries (54). Cependant, les bactéries Gram positives sont résistantes à la lyse induite par le système du complément, car le MAC ne peut pas pénétrer dans la paroi épaisse de ces bactéries (54). Les fragments du complément retrouvés à la surface des agents pathogènes, facilitent la phagocytose par les neutrophiles, les monocytes et les macrophages par un mécanisme d'opsonisation (54). Plusieurs facteurs de virulence, connus de *S. suis* comme la CPS,

la suilysine (la seule exotoxine retrouvée chez *S. suis*), ainsi que l'acide lipotéichoïque (LTA) et le PG (peptidoglycane) jouent un rôle important en inhibant l'action du complément et des cellules phagocytaires (5, 9). Le facteur H est une protéine soluble qui protège les cellules de l'hôte du complément, en empêchant son activité. *S. suis* a la capacité de lier à sa surface le facteur H via les protéines Fhb et Fhbp, évitant ainsi une opsonisation et une attaque du complément (5).

Le mode de circulation de la bactérie dans le sang n'est pas très clair et peu connu, mais il a été suggéré que la bactérie utilise les monocytes pour pouvoir se déplacer à travers tout l'organisme (1, 9). En effet, il semblerait que *S. suis* puisse rester « accroché » à la surface des monocytes (« théorie du cheval de Troie modifié ») pendant son déplacement jusqu'aux différents organes comme le foie, la rate, le cœur, les poumons, les reins et le cerveau et envahir ces organes afin d'induire une infection (1, 9, 55).

1.5.3. Inflammation exacerbée

Le système immunitaire déclenche une réponse inflammatoire bénéfique pour combattre les agents pathogènes. Les médiateurs de l'inflammation sont sécrétés par les cellules du système immunitaire comme les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, les neutrophiles et également par les cellules épithéliales et endothéliales (5). La libération de cytokines pro-inflammatoires à la suite d'une infection, permet de favoriser le recrutement d'autres cellules de l'immunité et l'activation/maturation des cellules (5, 6). Il a été mis en évidence qu'une protéase, nommée SspA, de *S. suis* était capable de dégrader les chimiokines (cytokines chimio-attractantes) CCL5 et CXCL8 engendrant un retard dans l'attraction et l'activation des leucocytes (5, 6, 56). Les composants de la paroi cellulaire de *S. suis* induisent une libération importante de cytokines pro-inflammatoires augmentant probablement les dommages tissulaires (5). Il a été démontré que les souches virulentes de *S. suis* de sérotype 2 sont capables d'induire la production de différentes cytokines pro-inflammatoires par des cellules porcines, murines et humaines (6). Dans la phase précoce de l'infection, *S. suis* induit la sécrétion principalement des cytokines suivantes : le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α), les interleukines (IL) IL-1 β , IL-6, IL-8 et IL-12, l'interféron- γ (IFN- γ) et les chimiokines suivantes : CCL-2, CXCL1, CCL5 (9). Les quantités

importantes de cytokines produites après reconnaissance de *S. suis* induisent l'infiltration massive de leucocytes au niveau du site d'infection (9).

Les septicémies avec choc septique, induites par *S. suis* résultent d'une inflammation exacerbée et l'hôte porcin ou humain peut mourir dans les heures suivant l'infection (6, 9). Les signes cliniques de méningite chez les porcs et les humains ont également été associés à une inflammation du SNC (9). Une inflammation fulminante du cerveau peut être observée à la suite d'une interaction entre la suilysine et les microglies, les astrocytes et d'autres cellules (6, 9). Les composants de la paroi cellulaire de *S. suis* stimulent la sécrétion d'IL-1, CXCL8 et MCP-1 par les cellules endothéliales microvasculaires du cerveau (BMEC) (57). L'importante libération de cytokines pro-inflammatoires peut contribuer au développement d'un choc septique chez l'humain nommé STSLS : « streptococcal toxic shock-like syndrome » qui n'est pas dû à des super-antigènes (9).

1.5.4. Apoptose

L'apoptose est un type de mort cellulaire programmée décrit pour la première fois en 1972 (58). Les caractéristiques morphologiques de l'apoptose sont la transition de la perméabilité membranaire, la condensation de la chromatine et la fragmentation nucléaire conduisant à la formation de corps apoptotiques qui vont être éliminés par les cellules phagocytaires (58, 59). L'une des caractéristiques de l'apoptose est le réarrangement du lipide membranaire phosphatidylsérine (PS) passant du feuillet interne au feuillet externe de la membrane plasmique qui va être reconnu par les cellules phagocytaires. L'apoptose est un processus immunologique silencieux n'induisant pas de réponse inflammatoire comparé à la nécrose (autre type de mort cellulaire). L'activation de l'apoptose va déclencher l'activation des protéines caspases (cystéines protéases) qui vont cliver des composés clés dans les cellules (59).

Les agents pathogènes ont développé des mécanismes pour moduler les voies de mort cellulaire afin d'éliminer les cellules immunitaires ou échapper aux défenses de l'hôte qui peuvent limiter l'infection (60). C'est le cas de *S. suis* qui induit une apoptose sur les splénocytes de la rate et les thymocytes du thymus chez un modèle murin (60, 61). En effet, *S. suis* induit une apoptose par des voies dépendantes de la caspase et de la p53 (protéine capable de réduire l'expression de

Bcl-2 et favoriser l'expression de Bax qui régulent l'apoptose au niveau des mitochondries) induite par l'AIF (protéine mitochondriale qui déclenche la condensation de la chromatine et fragmentation de l'ADN) conduisant à une atrophie sévère du thymus (61). Au niveau de la rate, les voies d'activation de l'apoptose induite par *S. suis* sont différentes que pour le thymus avec des voies d'activation toujours dépendantes de la caspase mais indépendante de la protéine AIF conduisant à une splénomégalie chez la souris (60). De plus, *S. suis* déclenche une pyroptose (favorise les réponses inflammatoires (59)) des macrophages M1 augmentant l'apoptose des lymphocytes B de la rate via les récepteurs TNF (60).

1.5.5. Passage dans le système nerveux central (SNC)

S. suis dans la circulation sanguine peut se disséminer jusqu'au SNC et provoquer une méningite avec des séquelles permanentes comme la perte d'audition chez l'humain (1, 9). *S. suis* est capable de traverser la BBB et/ou la BCSFB composées respectivement des BMEC et des cellules épithéliales du plexus choroïde (CPEC), entre autres types cellulaires (1, 6, 9). L'adhésion aux cellules BMEC et CPEC par la bactérie est induite principalement par les composants de la paroi cellulaire comme le LTA (1, 9). Deux théories ont été proposées concernant le passage de *S. suis* à travers la BBB : soit la bactérie adhère au côté basal des cellules et est transportée jusqu'au côté apical par des vésicules endocytaires soit la bactérie passe à travers les jonctions serrées des cellules (1, 9). De plus, les composants de la paroi cellulaire de *S. suis* peuvent engendrer la sécrétion de prostaglandine PGE2 (une protéine de l'inflammation) par les macrophages induisant la perturbation de la barrière BBB (6, 9). La libération de cytokines pro-inflammatoires par les cellules BMEC peut également porter atteinte à la barrière du SNC, facilitant l'entrée de *S. suis* (1, 6, 9, 57). Une étude par Liu et *al.* (62), a permis de mettre en évidence 14 facteurs de virulence putatifs impliqués dans l'adhésion et l'invasion de *S. suis* avec les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales de porc.

Récemment, il a été montré que l'énolase (enzyme catalytique cytoplasmique dans la voie de la glycolyse bactérienne) de *S. suis* sérotype 2 peut se lier à un récepteur RPSA, retrouvé à la surface des cellules de la BBB et induire l'apoptose facilitant ainsi son passage dans le SNC (63, 64). En effet, l'interaction de l'énolase avec le récepteur RPSA va déclencher la translocation de la

protéine HSPD1 des mitochondries vers le cytoplasme et son accumulation dans le cytosol déclenche le processus de mort cellulaire. La protéine HSPD1 va interagir avec une autre protéine nommée ACTB ce qui entraîne l'augmentation de la protéine SMAC, une protéine qui se lie aux protéines inhibitrices de l'apoptose XIAP, et va induire l'activation de la caspase 3 (64).

1.6 Facteurs de virulence

Un facteur de virulence est défini comme un facteur jouant un rôle précis et unique lors de la pathogenèse de l'infection et peut être considéré comme critique, quand sa fonction ne peut être remplie par d'autres composants bactériens (2). Les recherches sur les facteurs de virulence de *S. suis* se sont principalement focalisées sur les souches chinoises de type ST7 et les souches Européennes de type ST1 (2). Il est difficile de définir une liste précise des « vrais » facteurs de virulence présents chez *S. suis* car en fonction de la souche utilisée, du modèle d'étude utilisé, de la voie d'injection utilisée, de la lignée cellulaire utilisée les résultats ne seront pas les mêmes d'une étude à l'autre (2). De nos jours, de nombreuses molécules décrites chez *S. suis* ont été définies comme de potentiels facteurs de virulence. Ici, on s'intéresse principalement aux facteurs suivants : la CPS, la « muramidase-released-protein » (MRP), le facteur extracellulaire (EF) et la toxine suilysine. Ces facteurs ont été les plus étudiés dans la littérature.

1.6.1. Capsule polysaccharidique

La composition de la CPS a été étudiée pour le sérotype 2 et celle-ci est composée d'une chaîne latérale d'unité répétitive de sucre tel que le glucose, le galactose, le N-acétyl-glucosamine et le rhamnose (9, 65). À la fin de cette chaîne latérale de sucre se trouve de l'acide sialique relié au galactose par une liaison α -2,6 (N-acétyl-neuraminique) (9, 65). La composition de la CPS pour le sérotype 14 de *S. suis* présente des éléments structuraux communs avec le sérotype 2, la seule différence est l'absence de rhamnose dans la CPS du sérotype 14 (66). Les CPS des sérotypes 1 et 1/2 se sont révélées assez similaires aux sérotypes 14 et 2, respectivement, ce qui peut expliquer les réactions croisées survenant lors des réactions sérologiques (67). Cependant, pour les sérotypes 2 et 14 le résidu galactose porte l'acide sialique alors que pour les sérotypes 1 et 1/2 le résidu galactose est remplacé par du N-acétylgalactosamine liant l'acide sialique (33, 67). Il a été

observé la présence d'acide sialique dans les CPS des sérotypes 1, 1/2, 2, 6, 13, 14, 15, 16 et 27 (67). La structure et la composition de la CPS des sérotypes 3, 7, 8, 9, 18 ont également été décrites (68-70). Le rôle de la CPS n'est pas essentiel dans toutes les étapes de la pathogénèse même si celle-ci est considérée comme un facteur de virulence majeure (55). En effet, celle-ci faciliterait le passage de la bactérie à travers la couche de mucus (5). Mais la CPS empêcherait partiellement l'adhésion et l'invasion des cellules épithéliales respiratoires et intestinales chez le porc et chez l'humain (5, 6, 9). Cependant, la capsule serait essentielle pour la survie de la bactérie dans la circulation sanguine et contre la phagocytose médiée par les cellules dendritiques, les neutrophiles et les monocytes/macrophages (6, 9). Une hypothèse émise, selon laquelle la CPS serait régulée à la hausse ou à la baisse par l'apparition de mutation réversible dans les gènes *cps* codant pour la synthèse de la capsule, mettant en place un mécanisme « on-off » de l'expression des gènes de la capsule en fonction des différentes étapes de la pathogénèse (2, 5, 9).

L'acide sialique est un composant essentiel de la CPS (pour les sérotypes présentant de l'acide sialique dans leurs CPS) qui est probablement responsable de la protection contre la phagocytose (9). Ce composé jouerait également un rôle dans l'adhésion aux cellules phagocytaires, comme les monocytes permettant le déplacement de *S. suis* à travers la circulation sanguine (théorie du « cheval de Troie modifié ») (9, 55). L'acide sialique pourrait jouer un rôle dans des co-infections avec d'autres agents pathogènes. En effet, Wang et *al.* (14), ont mis en évidence qu'une pré-infection des cellules épithéliales trachéales de porc avec le *SIV* permet une meilleure adhésion et invasion de *S. suis* et que l'acide sialique de la CPS interagissait directement avec le *SIV* (14).

1.6.2. Suilysine

La suilysine est une hémolysine de 54 KDa (6) et elle semble être la seule exotoxine identifiée chez *S. suis*. Cette hémolysine a une action cytotoxique sur différents types cellulaires comme les cellules épithéliales et les cellules endothéliales (1, 5, 6, 9). La suilysine de *S. suis* induit également de la cytotoxicité sur les BMEC porcines *in vitro* (71). Le composé thiol de cette hémolysine permet de se lier au cholestérol dans les membranes des cellules eucaryotes (6). Cette action aurait un impact sur l'intégrité des barrières physiques retrouvées chez l'hôte permettant une meilleure dissémination de la bactérie (1, 6). Très récemment, il a été montré que la suilysine de

S. suis perturbe l'intégrité de la barrière épithéliale trachéale de porc ce qui pourrait faciliter le passage d'autres agents pathogènes respiratoires (72). En effet, cette hémolysine semble endommager les protéines TJ qui sont impliquées dans le maintien et l'intégrité de la barrière épithéliale (72). Après reconnaissance de la suilysine par les cellules BMEC porcines et humaines, il est observé la libération de cytokines pro-inflammatoires ainsi qu'une augmentation de l'adhésion sur les monocytes humains (1, 6, 9). La toxine a été découverte pour la première fois chez des souches européennes de type ST1 de *S. suis* (2). Le fait que certaines souches virulentes du sérotype 2 (principalement des souches d'Amérique du Nord) ne produisent pas de suilysine semble indiquer que cette exotoxine ne joue pas un rôle essentiel dans la virulence (2, 5, 73). Cependant, le gène codant pour la suilysine est retrouvé dans quasiment la totalité des génomes des souches de *S. suis* invasives Européennes et Asiatiques (72). Une étude de Meng et al. (74), a mis en évidence que la suilysine favorise l'adhésion et l'invasion de *S. suis* sur les cellules épithéliales différenciées porcines d'un modèle de culture ALI (« porcine respiratory air-liquid interface cultures »). La suilysine est également responsable de la cytotoxicité sur ces cellules, ce qui peut endommager la barrière épithéliale. De plus, les résultats de cette étude montrent que l'apoptose médiée par *S. suis* est dépendante de la suilysine possiblement initiée par un afflux de calcium à travers les pores de la membrane plasmique.

1.6.3. EF et MRP

Le facteur extracellulaire EF et la protéine MRP sont considérés comme des marqueurs de virulence plutôt que comme des facteurs de virulence car le rôle de ces protéines dans la pathogénèse de *S. suis* est controversé (2, 6, 9, 39). La MRP est une protéine ancrée à la paroi cellulaire de 136 KDa et est également libérée dans le surnageant pendant la croissance bactérienne. EF est une protéine sécrétée de 110 KDa (6, 39). Bien qu'une association de la MRP et du EF avec la virulence soit observée avec des souches de certains pays, l'absence d'une ou de ces deux protéines n'entraîne pas nécessairement une virulence diminuée (2, 6). Par exemple, en Amérique du Nord, une souche MRP⁺ était avirulente tandis qu'une souche MRP⁻ était virulente. La plupart des souches de sérotype 2 isolées de porcs malades en Europe, appartenant à ST1, expriment la MRP et le EF (6).

1.6.4. Autres facteurs de virulence

D'autres facteurs de virulence dits « putatifs » n'ont pas révélé d'association claire dans les étapes de la pathogénèse de *S. suis* (6, 9). Plusieurs études ont mis en évidence ces facteurs de virulence putatifs, comme l'auto-inducteur LuxS, le régulateur de réponse RevS, le régulateur des sucres CcpA et les régulateurs de type Rgg (6, 9). D'autres facteurs qui participent clairement à la virulence chez d'autres espèces bactériennes pathogènes n'ont pas été distinctement reliés à la virulence de *S. suis*, c'est le cas des pili. Le séquençage a mis en évidence quatre clusters de gènes associés à la synthèse de pilus putatif (clusters *srtG*, *srtF*, *srtE* et *srtBCD*) dont la présence varie chez les différentes souches de *S. suis* (6, 75).

1.7 Traitements des infections à *S. suis*

Comme pour de nombreuses infections bactériennes, le traitement des infections à *S. suis* se fait par l'utilisation d'antibiotiques. Les antibiotiques les plus utilisés font partie de la famille des β -lactames comme la pénicilline G ou l'amoxicilline, de la famille des aminosides comme la gentamicine (seulement utilisée chez l'humain), de la famille des amphénicols ou des fluoroquinolones (1). L'utilisation excessive des traitements aux antibiotiques induit une pression de sélection sur les souches de *S. suis*, ce qui peut conduire à une émergence de souches résistantes à certains antibiotiques (2). La voie d'injection des antibiotiques est surtout intramusculaire chez les porcelets mais d'autres voies d'administration sont possibles et moins contraignantes comme l'ajout des antibiotiques dans la nourriture ou dans l'eau (1).

La vaccination est une alternative aux traitements antibiotiques. Cependant, l'importante variabilité génotypique et phénotypique des souches de *S. suis* rend très difficile la conception d'un vaccin universel (1, 2). Le seul vaccin disponible est de type autogène, le principe est de produire un vaccin à partir d'une souche particulière inactivée, qui a induit au préalable une infection dans un troupeau (1). La recherche se concentre désormais sur l'identification d'un ou plusieurs facteurs de virulence et sur l'analyse de leurs propriétés immunogènes afin de développer un vaccin universel contre *S. suis* (1).

2. Les mycoplasmes porcins

2.1 Caractéristiques générales

Les mycoplasmes porcins (classe des *Mollicutes*), sont considérés comme les plus petits (0,3 à 0,8 µm de diamètre) et les plus simples micro-organismes ayant la capacité de s'auto-répliquer (76, 77). Les mycoplasmes sont essentiellement composés de trois organites : la membrane plasmique (essentiellement composée de protéines à 60-70 % et de lipides 20-30 %), les ribosomes et un génome d'ADN double brin circulaire, dense et compact (77). Les caractéristiques principales des mycoplasmes sont l'absence de paroi cellulaire, ne leur permettant pas d'être classé dans la catégorie classique des bactéries Gram positives ou Gram négatives, la présence d'un génome de taille réduite (d'environ 0,5 Mpb à 2 Mpb) et de voies métaboliques limitées (76-80). Les génomes des mycoplasmes présentent un faible pourcentage en guanine-cytosine (78, 80, 81) et les mycoplasmes utilisent le codon UGA, un codon stop universel, comme un codon tryptophane (ce changement de code génétique est un événement majeur dans l'évolution des *Mollicutes*) (81).

Les mycoplasmes ne sont pas définis comme hautement virulents, comme les autres bactéries « classiques » définies comme virulentes, mais ces bactéries induisent des maladies avec des évolutions chroniques souvent lentes, ce qui entraîne une hausse de la morbidité. La conséquence de ces maladies subcliniques est une perte économique dans les industries agroalimentaires du monde entier (76-78). De plus, certaines souches mycoplasmiennes sont opportunistes.

Les mycoplasmes porcins tels que *Mycoplasma flocculare* et *Mycoplasma hyopharyngis* sont décrits comme des mycoplasmes commensaux (82). *M. flocculare* est retrouvé au niveau des muqueuses du tractus respiratoire des porcs plus précisément dans les cavités nasales et les poumons (23, 83, 84). Ce dernier est retrouvé dans des lésions pulmonaires, mais ne joue probablement pas un rôle prédominant dans l'établissement de la pneumonie (17). *M. hyopharyngis* a été isolé en Amérique du Nord et en Europe dans les voies respiratoires supérieures des porcs et au niveau des articulations (23, 82).

Mycoplasma suis, *Mycoplasma hyosynoviae*, *M. hyorhinis* et *M. hyopneumoniae* (présenté par ordre croissant en fonction de leurs impacts économiques sur les élevages porcins) sont considérés comme pathogènes pour le porc. *M. suis* peut provoquer des cas d'anémies chez les jeunes porcs. Lors d'un état de stress intense ressenti par le porcelet, cette bactérie peut provoquer la mort de celui-ci. Très peu d'études mettent en évidence la pathogénèse de *M. suis* (23, 84). *M. hyosynoviae* est isolé dans les voies respiratoires supérieures et profondes du porc et également au niveau des articulations dans des cas de bursites infectieuses (inflammation du « coussinet » entre les tendons et les os au niveau des articulations). Les symptômes de l'infection sont des difficultés locomotrices et une inaptitude à tenir en position debout entraînant une moindre consommation d'aliments et une atteinte de la croissance survenant principalement chez des porcs âgés de 3 à 5 mois (23, 84, 85). *M. hyorhinis* et *M. hyopneumoniae* sont décrits en détails par la suite.

2.2 *Mycoplasma hyorhinis*

2.2.1. Infection et transmission

M. hyorhinis est retrouvé principalement dans les voies respiratoires, les amygdales et les articulations des porcs. Cette bactérie est responsable de polysérosite (péricardite, pleurésie, péritonite et arthrite) et elle a également été retrouvée dans des cas d'otites et de conjonctivites (23, 84). Les lésions induites par une infection à *M. hyorhinis* sont principalement des inflammations sérofibrineuses qui entraînent une saisie des carcasses à l'abattage et donc des pertes économiques. Lors de la phase aiguë de la maladie les symptômes se manifestent par une hypertrophie des articulations entraînant des boiteries, des réticences au déplacement, une légère hyperthermie et une perte d'appétit (17, 23). La polysérosite se manifeste en général chez les porcs âgés de 3 à 10 semaines (86).

De plus, *M. hyorhinis* est très souvent associé à *M. hyopneumoniae* dans des cas de pneumonie et au sein du PRDC. L'implication de *M. hyorhinis* dans l'exacerbation des lésions pulmonaires induites initialement par *M. hyopneumoniae* est bien établie alors que le rôle de *M. hyorhinis* en tant qu'agent primaire de pneumonie est controversé (16, 17, 83, 84). L'étude menée en élevage

par Fourour et *al.* (83), a mis en évidence la présence de *M. hyorhinis* dans des lésions pulmonaires en association avec *M. hyopneumoniae* après détection par PCR en temps réel. Ces résultats suggèrent que *M. hyorhinis* pourrait jouer un rôle dans le développement de la pneumonie (83). Cependant, *M. hyorhinis* seul présente une faible capacité à provoquer de la pneumonie dans des conditions expérimentales et ne semble pas augmenter la gravité des lésions pulmonaires induites au préalable par *M. hyopneumoniae* (17).

Au sein des élevages, le faible pourcentage de colonisation par *M. hyorhinis* des porcelets sous la mère semble être la conséquence de la protection de l'immunité maternelle (86). Cependant, deux semaines après le sevrage le pourcentage de colonisation par *M. hyorhinis* augmente de 50 % et au fil des semaines ce pourcentage augmente au sein des troupeaux allant de 90 à 100 %, ce qui pourrait être dû à la baisse de l'immunité maternelle (86). Lors de cette baisse de protection de l'immunité maternelle, *M. hyorhinis* peut induire une infection chez les porcelets post-sevrés. Les cochettes ou les truies semblent être la source de contamination principale des porcelets (85). La transmission de cette bactérie se fait de la truie vers les porcelets (17, 84, 86). *M. hyorhinis* est ensuite transmis entre les porcelets par contact groin à groin (86, 87).

2.2.2. Diversité génétique de *M. hyorhinis*

Il existe une hétérogénéité au sein des isolats de *M. hyorhinis*. En effet, ils présentent à leurs surfaces une grande variété antigénique, des différences de virulence constatées dans des modèles *in vivo* et des différences dans les manifestations cliniques de la maladie avec parfois des arthrites ou des polysérosites (87).

La diversité génétique de *M. hyorhinis* a d'abord été mise en évidence par la technique « pulsed-field gel electrophoresis » : PFGE (électrophorèse en champ pulsé) mais cette technique demande au préalable une culture pure de la bactérie et l'interprétation des bandes sur le gel d'électrophorèse peut être difficile (87). Par la suite, la technique MLST a été utilisée pour caractériser la diversité génétique des isolats de *M. hyorhinis*, mais également pour d'autres espèces mycoplasmiques comme *M. hyopneumoniae*, *Mycoplasma agalactiae* et *Mycoplasma bovis* (88). L'équipe de Tocqueville et *al.* (88), a développé deux méthodes pour le typage de *M. hyorhinis*. L'une basée sur l'amplification unique du gène codant pour la protéine p37 et l'autre

basée sur la technique MLST avec l'amplification de six gènes de ménage qui sont *dnaA*, *rpoB*, *gyrB*, *gltX*, *adk* et *gmk*. Le typage par MLST s'est révélé être hautement discriminatoire pour confirmer la grande diversité présente chez *M. hyorhinis* (88). Récemment, une nouvelle méthode MLST a été décrite et basée sur l'amplification des gènes de ménage décrits précédemment et des gènes codant pour diverses protéines de surfaces présentant une variabilité génétique tels que *pdhB*, *p95*, *mtlD* et *ung* (87).

2.2.3. Méthode de détection

La culture des mycoplasmes en laboratoire est fastidieuse car leurs besoins nutritionnels sont très importants et la croissance de ces bactéries est lente allant de deux à trente jours (80). Les milieux de culture utilisés sont enrichis avec des extraits cœur-cerveau, du sérum de porc et de cheval, des peptones, de l'extrait de levure et d'autres éléments nutritifs additionnés au milieu en fonction de l'espèce étudiée. En effet, il n'existe pas de milieu de culture standard pour les mycoplasmes, pour chaque espèce il faut compléter le milieu avec les éléments nutritionnels qui conviennent (80). De plus, l'isolement des mycoplasmes à partir d'un échantillon de terrain est difficile, car d'autres bactéries peuvent se développer plus rapidement. Des antibiotiques agissant sur la paroi cellulaire sont alors ajoutés mais ceux-ci n'empêchent pas le développement d'autres bactéries morphologiquement proches des mycoplasmes (80). Enfin, certaines espèces mycoplasmiques utilisent la même source d'énergie, mais ne se développent pas à la même vitesse. C'est le cas de *M. hyorhinis* qui croit plus rapidement que *M. hyopneumoniae* en fermentant le glucose (83).

Pour remédier aux difficultés de la culture bactérienne classique, des techniques de PCR ont été développées. Celles-ci présentent une haute efficacité, avec de bonnes spécificités et sensibilités pour le diagnostic en laboratoire des espèces mycoplasmiques (80, 83). Le développement d'une méthode PCR en temps réel a permis de détecter *M. hyorhinis* par l'amplification du gène codant la protéine p37 dans des isolats de terrains (88). Aucune réaction croisée n'a été détectée avec d'autres espèces mycoplasmiques et bactériennes retrouvées fréquemment chez les porcs (88). Une autre méthode PCR en temps réel a permis de détecter et quantifier *M. hyorhinis* dans des

isolats de terrains issus de porcs atteints de polysérosites et de porcs cliniquement sains. Cette méthode est basée sur l'amplification du gène codant l'ARN ribosomique 16S (89).

M. hyopneumoniae, *M. hyorhinis* et *M. flocculare* sont fréquemment retrouvés dans le tractus respiratoire des porcs et lors d'une culture bactérienne classique il est difficile de faire la distinction entre ces trois espèces mycoplasmiques (90). En effet, ces mycoplasmes porcins utilisent la même source d'énergie à savoir le glucose ce qui rend la culture difficile. Des méthodes de PCR en multiplexe ont été développées pour différencier ces espèces. L'une des méthodes est basée sur l'amplification du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S (90). Une autre méthode est basée sur l'amplification du gène *p102* codant pour une adhésine de *M. hyopneumoniae*, du gène *p37* codant pour une lipoprotéine membranaire de *M. hyorhinis* et du gène *fruA* codant pour un composant d'un transporteur du fructose retrouvé chez *M. flocculare* (83).

2.2.4. Pathogénèse de *M. hyorhinis*

La pathogénèse de *M. hyorhinis* est peu connue. Cependant, on sait que la membrane cytoplasmique des mycoplasmes, présente une versatilité et un dynamisme important pour permettre l'adaptation de ces bactéries à leurs environnements. Les lipoprotéines de surface Vlps (« Variable lipoproteins ») retrouvées chez *M. hyorhinis* sont importantes dans la pathogénèse de cette bactérie et exercent diverses fonctions telles que l'adhésion, l'échappement du système immunitaire et l'induction de médiateurs de l'inflammation. Les Vlp de *M. hyorhinis* sont constituées de trois régions nommées région I, II et III et la famille des Vlp est constituée de sept lipoprotéines distinctes allant de VlpA à VlpG (91-93).

a. Adhésion cellulaire de *M. hyorhinis*

L'adhésion aux cellules de l'hôte est un facteur essentiel pour la colonisation de la plupart des bactéries pathogènes (94). L'étude de Xiong et *al.* (95), suggère que la région II des lipoprotéines Vlp retrouvées à la surface de *M. hyorhinis*, peut se lier fortement avec les cellules épithéliales trachéales de porc. Ils suggèrent également que la longueur de la région III des lipoprotéines peut influencer la liaison de la région II avec les cellules de l'hôte. En effet, les auteurs mettent en évidence qu'une longueur trop importante de la région III peut bloquer le site fonctionnel de la

région II des lipoprotéines (95). Une autre étude a permis de mettre en évidence la capacité des lipoprotéines VlpA, VlpB, VlpC, VlpE et VlpG à adhérer significativement à une lignée cellulaire rénale de porc (PK-15) et à une lignée cellulaire STEC (96). En revanche, les lipoprotéines VlpD adhéraient faiblement aux cellules PK-15 et les lipoprotéines VlpF ne semblaient pas adhérer à cette même lignée cellulaire. Ces deux lipoprotéines avaient en revanche la capacité d'adhérer à la lignée cellulaire STEC (96). Récemment, l'étude de Wang et *al.* (97), met en évidence le rôle de la GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), retrouvée à la surface de *M. hyorhinis*, dans l'adhésion aux cellules PK-15 porcines et aux cellules NCI-H292 d'origine humaine. De plus, la GAPDH de *M. hyorhinis* aurait la capacité d'activer le plasminogène qui à son tour activerait la plasmine afin de dégrader les composants de la MEC. Comme pour *S. suis*, il a été découvert la présence d'une enolase chez *M. hyorhinis* (retrouvée à la surface de la bactérie) qui serait impliqué dans l'adhésion de celui-ci aux cellules porcines PK-15 (98). De plus, l'enolase de *M. hyorhinis* pourrait se lier au plasminogène et à la fibronectine et ainsi pourrait dégrader des composants essentiels de la MEC.

b. Échappement de *M. hyorhinis* au système immunitaire

Après l'adhésion de *M. hyorhinis*, la bactérie va coloniser son hôte, mais le mécanisme qui lui permet de disséminer à travers l'organisme n'est pas totalement connu. Il est rapporté dans la littérature que *M. hyorhinis* aurait la capacité d'échapper aux nombreuses cellules immunitaires qu'il rencontre. En effet, les événements mutationnels présent dans le système Vlp des lipoprotéines de *M. hyorhinis* permettent de générer un répertoire antigénique varié pour échapper plus efficacement au système immunitaire de l'hôte. Il a été mis en évidence que *M. hyorhinis* exprimant de longues lipoprotéines à sa surface est protégé contre les anticorps retrouvés dans le sérum de porcs infectés (91, 99). Cependant, une étude (100) émet l'hypothèse que ce ne serait pas les lipoprotéines Vlp qui seraient reconnues directement par les anticorps mais d'autres antigènes de surface. L'hypothèse soumise est que les longues lipoprotéines de surface sembleraient protéger les autres antigènes reconnus par les anticorps. L'autre possibilité envisagée serait la présence de courtes et de longues lipoprotéines organisées en « patch » sur la surface membranaire créant des zones partiellement accessibles aux anticorps (100).

c. Induction de médiateurs de l'inflammation par *M. hyorhinis*

Il a été montré que les lipoprotéines bactériennes engendraient une forte stimulation des cellules de l'immunité telles que les macrophages et les monocytes induisant ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires (94, 101, 102). L'étude de Kostyal et *al.* (102), montre que *M. hyorhinis* et plus particulièrement les lipoprotéines de surface induisent la production de TNF- α par une lignée de monocyte humain. L'induction de TNF- α par *M. hyorhinis* pourrait expliquer le retard de croissance des porcs infectés, car cette cytokine est connue pour provoquer un syndrome de dépérissement et une cachexie (affaiblissement de l'organisme) (102). Une autre étude met en évidence la capacité de *M. hyorhinis* et des lipoprotéines a stimulé de façon significative la production de cytokines pro-inflammatoires tels que l'INF- γ (interféron- γ) et l'IL-17 (interleukine 17) par des splénocytes de souris (94).

d. Apoptose

Depuis quelques années des articles scientifiques relatent le rôle potentiel de *M. hyorhinis*, dans certains cancers humains, gastriques, pulmonaires et du côlon (98). Comme pour *S. suis*, *M. hyorhinis* aurait la capacité d'induire un effet apoptotique sur les cellules cancéreuses murines et humaines (103, 104). Il a été montré que *M. hyorhinis* induit un dérèglement dans l'expression des gènes liés à la prolifération et à l'apoptose des cellules 32D murines (lignée cellulaire myéloïde). Les auteurs ont émis l'hypothèse que *M. hyorhinis* aurait la capacité d'induire de l'apoptose sur les cellules avant de transformer celles-ci en cellules malignes (103). La bactérie aurait la capacité de faire surproduire aux cellules AZ-521 (carcinome gastrique humain) du monoxyde d'azote (NO), ce qui déclencherait la cascade d'activation des caspases. De plus, *M. hyorhinis* entraîne une diminution de l'expression de la protéine E-cadhérine qui fait le lien entre les cellules et la MEC. L'accumulation du NO et la diminution de la protéine E-cadhérine induit une anoïkose qui est une forme spécifique d'apoptose (104).

2.2.5. Facteurs de virulence

Tel que mentionné précédemment pour *S. suis*, un facteur de virulence est défini comme un facteur jouant un rôle précis et unique qui va provoquer un effet pathologique direct sur son hôte

et peut être considéré comme critique, quand sa fonction ne peut être remplie par d'autres composants bactériens (2). Pour les mycoplasmes cette définition des facteurs de virulence n'est pas adaptée (105). En effet, les mycoplasmes ne semblent pas exercer d'effet pathologique direct sur les tissus de l'hôte *via* des facteurs de virulence spécifiques mais l'effet pathologique est plutôt induit par la réponse de l'hôte elle-même (105). Dans la plupart des cas, tous les gènes mycoplasmiens qui ne sont pas requis pour la croissance dans des milieux de culture, mais qui sont nécessaires pour une colonisation optimale, pour la persistance et pour les effets pathologiques sur l'hôte (comme des facteurs/gènes de croissance) sont considérés comme des gènes impliqués dans la virulence (105).

La variation phénotypique est une stratégie adoptée par de nombreuses bactéries, dont les mycoplasmes comme *M. hyorhinis*, pour permettre leur survie (91-93, 100). Cette variation peut avoir lieu de deux manières soit la bactérie individuellement va modifier son phénotype en réponse à un stimuli environnemental soit la population bactérienne va engendrer un répertoire conséquent de variation phénotypique pour permettre la survie de quelques cellules (93). Comme décrit précédemment, on retrouve à la surface de la membrane plasmique de *M. hyorhinis*, un ensemble de lipoprotéines variables Vlp (91-93, 100) qui sembleraient être les principaux facteurs de virulence de cette bactérie (91, 93).

Il est retrouvé dans le génome de *M. hyorhinis*, 7 membres faisant partie de la famille des lipoprotéines Vlp : de VlpA à VlpG (92, 95). Chaque membre Vlp est composé de trois régions et d'une région promotrice (voir la figure n°4). La région I contenant le signal peptidique, va permettre de diriger et d'ancrer (grâce à un résidu cystéine) les lipoprotéines vers la membrane plasmique faisant d'eux les premiers composés en contact avec l'environnement (91, 93, 95). La région II est non chargée et contient des séquences génétiques uniques pour un gène *vlp* particulier et ces séquences uniques sont entrecoupées par des séquences génétiques partagées par plusieurs gènes *vlp*. La région III est chargée et est composée de séquences répétées en tandem, mais le nombre de séquences répétées est unique à chaque gène *vlp*. La région promotrice, en amont de chaque gène *vlp*, est composée d'homopolymère de résidus adénines et est nommée région polyA (91, 93, 95).

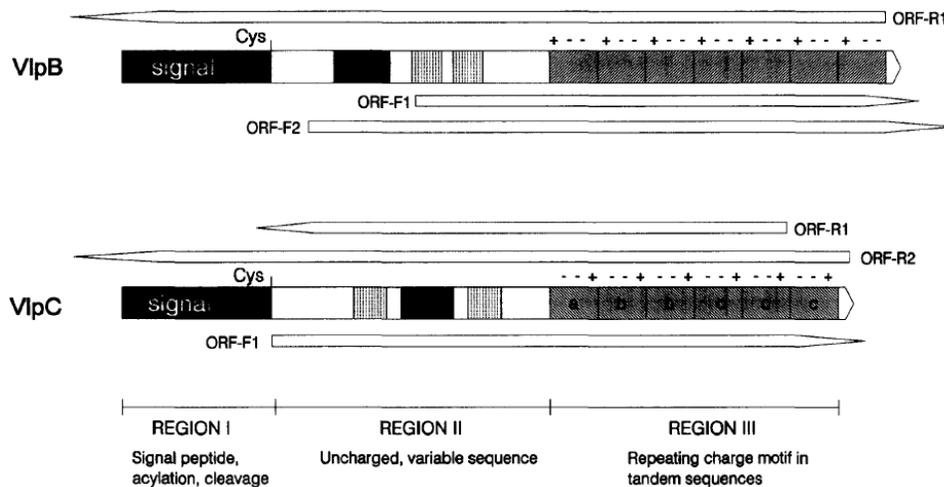


Figure 4 : Représentation schématique des Vlp B et C de *M. hyorhinis* (Kim S. Wise., 1993)

Plusieurs évènements mutationnels à haute fréquence sont identifiés dans les régions des gènes *vlp*, mais également dans les régions promotrices permettant une variation phénotypique et antigénique des lipoprotéines. Des insertions ou des délétions de résidus adénines dans la région polyA induisent un espacement ou un rétrécissement de l'espace entre les box -35 et -10, essentiel à la transcription des gènes. Ce qui entraîne une modification de la structure spatiale de la région promotrice conduisant à un mauvais positionnement et fonctionnement de l'ARN polymérase et des éventuels facteurs de transcriptions. Des mutations induisant l'insertion ou la délétion de séquences répétées en tandem dans la partie 3' de la région III permet une augmentation ou une diminution de la partie C-terminale des lipoprotéines conduisant à une variation de taille et de charge. Enfin, la présence de mutations dans les régions II et III induit un décalage du cadre de lecture qui joue un rôle dans l'expression des gènes *vlp* (91-93).

2.2.6. Traitement des infections à *M. hyorhinis*

Les mycoplasmes, étant des bactéries sans paroi, sont résistants aux β -lactamines, aux sulfamides et aux triméthoprimes (106). Ils sont généralement sensibles aux antibiotiques qui affectent la synthèse des acides nucléiques et des protéines (106). Les antibiotiques ayant montré leur efficacité contre *M. hyorhinis* sont la chlortétracycline, la lincomycine, la tiamuline, l'amoxicilline, la tylosine et la florfénicol (85). Cependant, des études mettent en évidence l'apparition de

résistances aux antimicrobiens dont la lincomycine et la spectinomycine (106, 107). Le traitement antibiotique doit être administré au début de l'apparition des signes cliniques pour une meilleure efficacité (85).

Actuellement aucun vaccin contre *M. hyorhinis* n'est commercialisé (106), cependant des études expérimentales évaluent l'efficacité de potentiels nouveaux vaccins. En effet, l'efficacité d'un vaccin inactivé a été évaluée chez des porcelets âgés de 3 semaines privés de colostrum (induisant une absence de l'immunité protectrice maternelle) (106, 108). Ce vaccin inactivé, a permis de réduire considérablement la péricardite et la boiterie. Le gain de poids a également été augmenté après une infection à *M. hyorhinis* (108). Récemment, un vaccin inactivé dirigé contre *M. hyorhinis* et le PCV2 a été développé, car ces agents pathogènes sont fréquemment retrouvés chez le porc (109). De plus, des études antérieures ont mis en évidence que la co-infection de ces micro-organismes augmente la gravité des lésions pulmonaires et des symptômes cliniques (109). L'efficacité du vaccin a été observée contre PCV2 et *M. hyorhinis* en réduisant les symptômes cliniques, la virémie de PCV2, les lésions pulmonaires et les lésions des ganglions lymphatiques et a permis d'améliorer le gain de poids moyen (109).

2.3 *Mycoplasma hyopneumoniae*

2.3.1 Infection et transmission

M. hyopneumoniae est l'agent étiologique de la pneumonie enzootique (EP) chez le porc, qui est une maladie respiratoire chronique (15-17, 110). La bactérie est principalement localisée dans le tractus respiratoire des porcs, elle a été détectée au niveau des amygdales, dans la cavité nasale, dans la trachée et dans les poumons chez des porcs en croissance (engraissement) ou en fin de croissance (jusqu'à l'abattage). La toux chronique non-productive est la principale manifestation clinique d'une infection à *M. hyopneumoniae*. La maladie est caractérisée par un taux de morbidité élevé ainsi qu'un indice de conversion alimentaire réduit (indicateur technico-économique qui permet de quantifier la capacité d'un troupeau à valoriser la ration de nourriture), une augmentation du coût en lien avec la médecine et une baisse du gain de poids quotidien des porcs (15, 17, 23, 110). Ces faibles performances zootechniques ainsi que les frais

vétérinaires engendrés entraînent une perte économique importante dans les industries porcines du monde entier (15, 84, 110).

M. hyopneumoniae est également un des agents primaires du PRDC, qui se manifeste chez les porcs principalement en croissance et en fin de croissance. Les manifestations cliniques qui apparaissent sont la toux, la fièvre, une perte de poids et d'appétit, une léthargie et parfois la mort (surtout dans des cas de surinfections) (18, 19, 110). C'est un trouble multifactoriel, coûteux pour les industries porcines du monde entier principalement dû à une infection simultanée ou séquentielle de divers micro-organismes. Il a été rapporté que *M. hyopneumoniae* module le système immunitaire des porcs ce qui facilite la surinfection des animaux par d'autres agents pathogènes viraux ou bactériens. Les autres agents pathogènes « primaires » du PRDC sont le PRRSV, le PCV2 et *A. pleuropneumoniae*. Les agents pathogènes « secondaires » sont principalement *M. hyorhinis*, *S. suis*, *A. suis*, *G. parasuis* et *P. multocida* (110).

M. hyopneumoniae est transmis au sein d'un troupeau par transmission horizontale des cochettes et/ou des truies vers les porcelets, de porcs à porcs par voie aérienne et/ou par contact direct groin à groin (15, 84). La transmission de la bactérie, entre les sangliers et les porcs domestiques, a été mis en évidence en France et en Slovénie (110). La présence de *M. hyopneumoniae* dans des aérosols a été rapportée et les particules d'aérosols peuvent être propagées à la suite d'un éternuement ou d'une toux (15, 84, 110).

2.3.2 Diversité génétique de *M. hyopneumoniae*

Des différences de virulence et génomiques entre les isolats de *M. hyopneumoniae* ont été rapportées (110, 111). Tout d'abord, la variabilité génomique de ce mycoplasme a été observée par différentes méthodes de typage moléculaire telles que « random amplified polymorphic DNA » (RAPD), « amplified fragment length polymorphism » (AFLP) et PFGE (15, 111). D'autres méthodes basées sur l'amplification de l'ADN ont été développées comme la technique « multiple loci variable number of tandem repeats » (MLVA) et la technique « polymerase chain reaction-restriction fragments length polymorphism » (PCR-RFLP) (15, 111).

Une méthode MLST pour le typage de souches de *M. hyopneumoniae* a été élaborée (112). Cette méthode est basée sur l'amplification de sept gènes de ménage qui sont : *epf*, *metG*, *pgiB*, *recA*, *adk*, *rpoB* et *tpiA*. Plus tard, il a été montré que le séquençage des gènes *rpoB*, *adk* et *tpiA* était suffisant pour réaliser un typage discriminant des isolats de *M. hyopneumoniae* (112).

2.3.3 Méthode de détection

La culture bactérienne de *M. hyopneumoniae* pour le diagnostic étant longue et fastidieuse d'autres méthodes de laboratoire ont été élaborées. Une méthode de PCR en temps réel (basée sur l'utilisation de sondes couplées à des fluorochromes) a été développée pour permettre la détection et la quantification de *M. hyopneumoniae* (113). Cette méthode est basée sur l'amplification simultanée de trois gènes codant pour les protéines P46, P97 et P102. Ce test PCR a permis de détecter la bactérie chez les porcs vivants dans les cavités nasales, les amygdales et la trachée et chez les animaux morts dans les tissus pulmonaires présentant une pneumonie (113). Récemment, une autre technique de PCR en temps réel multiplexe a été développée pour l'identification et la quantification de trois espèces de mycoplasmes porcins : *M. hyorhinitis*, *M. hyopneumoniae* et *M. flocculare*, décrit précédemment (83).

Avec ces méthodes de laboratoire sensibles il est primordial d'associer un prélèvement ou un échantillonnage biologique pertinent. Une étude démontre que les prélèvements trachéaux et plus précisément le mucus trachéal, semblent les plus adaptés pour détecter de façon optimale *M. hyopneumoniae* comparés aux prélèvements nasaux (114).

Le sérodiagnostic des infections à *M. hyopneumoniae* peut être effectué avec des kits « enzyme-linked immunosorbent assay » (ELISA) commerciaux (ELISA bloquant et ELISA indirect) (115). Ces tests permettent de détecter les anticorps IgG. Cependant, il n'est pas possible de faire la différence entre les IgG induits par une infection à *M. hyopneumoniae* et les IgG induits lors d'une vaccination (115). C'est pourquoi un autre test ELISA a été développée permettant la détection des anticorps IgA grâce à la protéine p97-RI (contenant le domaine RI) (115).

2.3.4 Pathogénèse

Les principaux mécanismes de virulence de *M. hyopneumoniae* sont l'adhésion de la bactérie aux cils des cellules épithéliales, l'adhésion à la MEC, l'échappement du système immunitaire par évitement de la phagocytose et induction de l'apoptose ainsi que la modulation du système immunitaire en induisant la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires.

a. Adhésion de *M. hyopneumoniae*

L'adhésion de *M. hyopneumoniae* dans le tractus respiratoire conduit à une agglutination des cils à la surface des cellules épithéliales de la trachée, des bronches et des bronchioles, c'est la première étape dans la colonisation (22, 116). Il est également montré une ciliostase, suivie de la disparition progressive des cils, une intense production de mucus et éventuellement la mort des cellules épithéliales (21-23, 116, 117) (voir la figure n°5).

La lipoprotéine P97, composée de deux régions RI et RII, a été la première adhésine découverte chez *M. hyopneumoniae* (22, 116, 118). Une étude a mis en évidence que la région RI, avec des séquences répétées en tandem (118), contient le site fonctionnel qui permet l'attachement de la bactérie aux cellules ciliées (116). Il a été démontré que la lipoprotéine P97 pouvait se lier aux glycosaminoglycanes (GAG) qui sont des macromolécules glucidiques retrouvées au niveau de la matrice extracellulaire et sur les cellules eucaryotes (15, 119). L'équipe de Seymour et *al.* (119), observe la présence d'un gène nommé *mhp182* (qui code pour une protéine P102) qui est localisé dans le même opéron que le gène *mhp183* (qui code pour la lipoprotéine P97), ces deux protéines sont donc des paralogues. La lipoprotéine P102 permet l'adhésion de la bactérie au niveau des cils de l'épithélium respiratoire (119). Une étude récente de Liu et *al.* (22), met en évidence après une analyse génomique de *M. hyopneumoniae*, la présence d'un gène *mhp390* qui code pour une lipoprotéine P68. Les auteurs ont à la fois démontré que la protéine P68 était bien une lipoprotéine de surface et qu'elle permettait l'adhésion spécifique des isolats de *M. hyopneumoniae* aux cellules ciliées (22). À ce jour, plus de 35 protéines impliquées dans l'adhésion de *M. hyopneumoniae* ont été décrites dont la plupart sont des paralogues des protéines P97 et P102 pouvant adhérer aux glycosaminoglycanes présents à la surface des cils (120). Mais d'autres adhésines pourraient être présentes, car celles-ci peuvent subir des

modifications post-traductionnelles par des protéases, permettant d'avoir un répertoire varié de protéines à la surface des bactéries (voir la figure n°5).

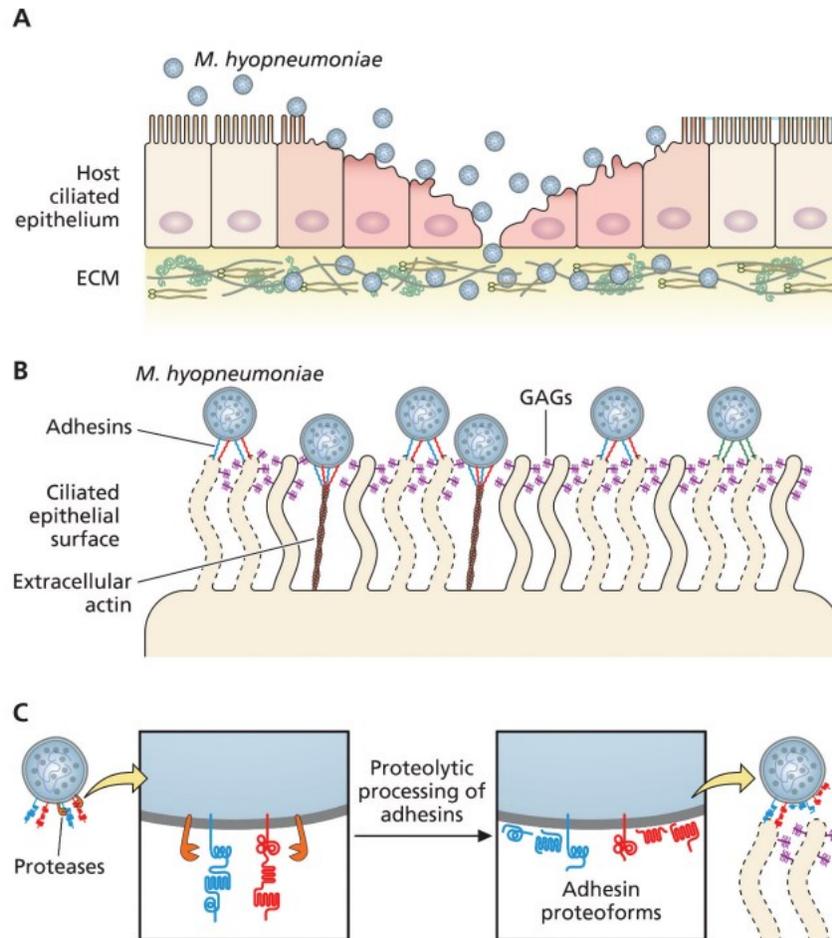


Figure 5 : Représentation schématique de l'adhésion de *M. hyopneumoniae* à l'épithélium respiratoire porcin modifiée. (A) L'adhésion de *M. hyopneumoniae* aux cellules épithéliales conduit à une agglutination des cils, une ciliostase, une disparition progressive des cils et parfois la mort des cellules épithéliales. (B) Les adhésines présentes à la surface de *M. hyopneumoniae* peuvent se lier aux GAGs et à l'actine extracellulaire présentes sur les cellules ciliées. (C) Les adhésines peuvent subir des modifications endoprotéolytiques post-traductionnelles par des protéases de surface formant un protéoforme d'adhésine (un répertoire varié de protéines d'adhésion) (Leal Zimmer et al.,2020)

L'adhésion de *M. hyopneumoniae* aux cils des cellules épithéliales, entraîne un dommage cellulaire important. Les cellules épithéliales du tractus respiratoire peuvent cependant se régénérer en stimulant la production de fibronectine (121), qui est une glycoprotéine multifonctionnelle. La fibronectine est retrouvée à la surface des cellules et est également un composant de la MEC (121). *M. hyopneumoniae* est capable de se lier à la fibronectine et au

plasminogène (15, 21, 121). Le plasminogène est une proenzyme de la sérine protéase plasmine, qui dégrade les caillots de fibrine (composé de fibrinogène et de thrombine) et induit la migration des cellules *via* la dégradation des protéines de la MEC (121). La partie C-terminale de la lipoprotéine P102 de *M. hyopneumoniae* présentent deux résidus lysine qui permettraient l'adhésion au plasminogène et la fibronectine (121). De plus, la bactérie peut se lier à la plasmine et l'activer, induisant la dégradation du fibrinogène (121). Il est supposé que la dégradation de la MEC par la plasmine expose les composants sous-jacents de celle-ci, tels que la fibronectine, augmentant ainsi la possibilité pour l'agent pathogène d'adhérer à ces composants. Ainsi, le recrutement de la plasmine peut contribuer à la pathogenèse de *M. hyopneumoniae* et pourrait induire des dommages cellulaires qui surviennent pendant la pneumonie enzootique (15, 121).

b. Immunomodulation du système immunitaire

L'adhésion de *M. hyopneumoniae* aux cellules ciliées de la barrière épithéliale va entraîner sa fragilisation et favoriser le passage du pathogène et sa diffusion jusqu'aux poumons des porcs. Dans les poumons, on retrouve un grand nombre de cellules du système immunitaire et *M. hyopneumoniae* est capable d'induire une immunomodulation du système immunitaire (voir figure n°6) (120).

Il a été mis en évidence que *M. hyopneumoniae* n'est pas facilement phagocyté par les macrophages alvéolaires porcins retrouvés dans les poumons (21, 118). En effet, après avoir mis en contact une souche GFP-P97 (GFP ou « green fluorescence protein », utilisé comme marqueur) et des macrophages, en présence ou en absence d'un inhibiteur de la phagocytose (CDD : cytochalasine D), l'intensité de fluorescence n'a pas changé (21). Il a également été mis en évidence par une expérience de microscopie confocale que la souche GFP-P97 est principalement localisée à la surface des macrophages alvéolaires et également au niveau des cytoplasmes en très petits nombres (21). L'expérience menée avec des molécules du complément et des anticorps qui pourraient faciliter la phagocytose de *M. hyopneumoniae* par le principe d'opsonisation, révèle que ni les molécules du complément ni les anticorps sériques ne semblent augmenter la capture phagocytaire de ce mycoplasme (21).

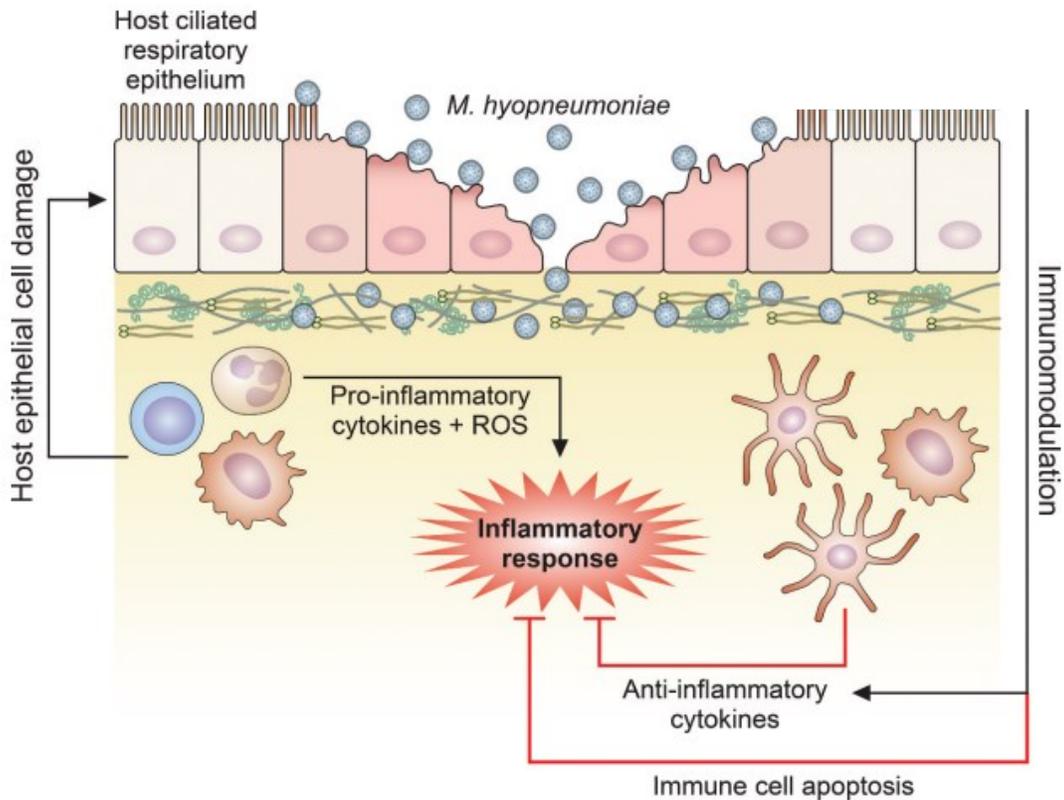


Figure 6 : Représentation schématique modifiée de la réponse immunitaire de l'hôte après une infection à *M. hyopneumoniae* (Leal Zimmer et al., 2020)

Un autre mécanisme de virulence induit par *M. hyopneumoniae* est la stimulation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires par les macrophages telles que, principalement : l'IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 et TNF- α en expérimentation *in vitro* et *in vivo* (15, 22, 99). Il est suggéré qu'une forte production de cytokines pro-inflammatoires peut conduire aux dommages cellulaires retrouvés dans les poumons lors des lésions pulmonaires (15, 22). Dans le génome des mycoplasmes, il a été observé l'absence du gène codant l'enzyme N-acyl-transférase, ce qui conduit à obtenir des lipoprotéines diacylées au lieu de triacylées. Il est suggéré que ce changement structurel serait à l'origine de la stimulation des macrophages *via* la reconnaissance des lipoprotéines diacylées par les TLR-2 et 6 (99). Plus récemment, il a été mis en évidence que la lipoprotéine P68 et la cellule entière de *M. hyopneumoniae* stimulent la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires par les macrophages alvéolaires tels que l'IL-1 β et le TNF- α (22). Une étude *in vivo* menée sur des porcs gnotobiotiques (exempts de tous micro-organismes) a permis de mettre en évidence que *M. hyopneumoniae* induit la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , IL-8, IL-18 et IFN- γ qui ont été détectées dans le BALF (lavage broncho-

alvéolaire) (122). Il a également été montré que *M. hyopneumoniae* induisait la suppression progressive de l'IL-10 et de l'IFN- γ suggérant une suppression de la réponse Th1 par l'IFN- γ et une suractivation des macrophages par la suppression de l'IL-10. Cette immunosuppression induite par *M. hyopneumoniae* pourrait contribuer à une augmentation des infections secondaires virales ou bactériennes (122).

M. hyopneumoniae induit une réponse inflammatoire aiguë, cependant ce pathogène induit des maladies chroniques et doit pouvoir persister chez son hôte. Il a été montré que *M. hyopneumoniae* peut induire une action apoptotique (mort cellulaire programmée) sur les macrophages alvéolaires et d'autres cellules du système immunitaire (15, 22). Une étude de Bai et al. (123), montre que les lipoprotéines (« lipid-associated membrane proteins » ou LAMPs) retrouvées à la surface de la souche Mhp232, induisent une apoptose sur plus de 80 % des macrophages alvéolaires porcins d'une lignée cellulaire immortalisée. Une autre étude, menée par l'équipe de Liu et al. (22), montre l'effet de la lipoprotéine P68 sur l'activation de la caspase-3 d'une lignée cellulaire de macrophages alvéolaires porcins après 36 h de co-incubation. La caspase-3 est une protéase qui joue un rôle central dans l'induction de l'apoptose cellulaire (124). Cette étude suggère également que la souche entière, la protéine P68 et d'autres molécules pourraient induire une augmentation significative de l'activité apoptotique sur les monocytes et lymphocytes (22). Une autre étude, met en évidence que les LAMPs de *M. hyopneumoniae* induisent de l'apoptose sur une lignée cellulaire épithéliale respiratoire porcine immortalisée (« St. Jude porcine lung epithelial cell lin » ou SJPL) (125). En effet, il est supposé que les LAMPs pourraient stimuler la production de « reactive oxygen species » (ROS) et de NO par les SJPL ce qui déclencherait l'apoptose de ces cellules par l'activation de la caspase 3, la caspase 8, la protéine Bax, P38, la voie de signalisation « mitogen-activated protein kinase » (MAPK) et la libération de cyt c (cytochrome C) par les mitochondries. Cependant, une apoptose excessive pourrait être délétère pour l'hôte induisant des dommages tissulaires (125).

2.3.5 Facteurs de virulence

Une topographie variée de surface a été mise en évidence chez *M. hyopneumoniae*. Cependant, il n'a pas été trouvé chez ce mycoplasme les nombreux évènements mutationnels survenant au

niveau des gènes codant les lipoprotéines de surface comme chez *M. hyorhinis*. En revanche, il a été découvert que les lipoprotéines de *M. hyopneumoniae* subissent plusieurs clivages endoprotéolytiques suivant principalement le motif de clivage S / T-X-F ↓ X-D / E (126). Il a été démontré que le clivage des pré-protéines de la protéine P146 ne se fait pas de façon aléatoire, mais que ces fragments présentent des domaines riches en acides aminés acides assurant de multiples fonctions comme l'adhésion du plasminogène (126). La lipoprotéine Mhp683 (P135) de *M. hyopneumoniae* subit également un clivage protéolytique et les fragments protéiques peuvent se lier aux cils et à l'héparine (analogue structurel de l'héparane sulfate retrouvé au niveau des chaînes latérales des protéoglycanes à la surface des cellules ciliées porcines) suggérant leurs implications dans la colonisation des voies respiratoires du porc (127). De plus, le traitement endoprotéolytique se produit avec tous les membres de la famille des lipoprotéines P102 et P97 (127). Ce clivage permet d'augmenter la diversité protéique à la surface de cet agent pathogène en modifiant la présentation de domaine fonctionnel (126).

Une étude *in vitro* analysant les voies métaboliques de *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* et *M. flocculare* a permis de mettre en évidence que *M. hyorhinis* et *M. hyopneumoniae* possèdent des gènes impliqués dans le catabolisme du glycérol (128). En effet, des gènes homologues au gène *glpO* (glycérol-3-phosphate oxydase) impliqué dans le métabolisme du glycérol et la production de peroxyde d'hydrogène (molécule toxique pour les cellules de l'hôte) ont été retrouvés au niveau du génome de *M. hyorhinis* et *M. hyopneumoniae* (128). Il a également été détecté chez ce dernier des gènes impliqués dans le catabolisme du myo-inositol, cette molécule est retrouvée dans la circulation sanguine des mammifères et dans le sérum porcin (128). Récemment, une étude s'est intéressée à la production de peroxyde d'hydrogène et au métabolisme du myo-inositol chez *M. hyopneumoniae* (129). Le gène *glpO* a été retrouvé dans le génome de souche considérée comme virulente et de souche atténuée, mais la production de peroxyde d'hydrogène à partir de glycérol n'a pu être détectée que chez les souches virulentes (129). *M. hyopneumoniae* est capable d'utiliser le glycérol de cinq façons différentes : la déshydrogénation du glyceraldéhyde, le transport type ABC du glycérol et du glycérol-phosphate, l'importation du glycérophosphoglycérol et du glycérophosphocholine (129). De plus, *M. hyopneumoniae* est la seule espèce mycoplasmaïque capable de métaboliser le myo-inositol et de croître dans un milieu

de culture uniquement en présence de myo-inositol (129). L'hypothèse soulevée dans cette étude est que *M. hyopneumoniae* est capable de métaboliser le glycérol et le myo-inositol dans le but de survivre et de persister plus longtemps dans les poumons peuplés par d'autres espèces bactériennes incapables d'utiliser ces métabolites (129).

2.3.6 Traitements des infections à *M. hyopneumoniae*

Les traitements antibiotiques utilisés pour *M. hyopneumoniae* sont principalement les macrolides, les lincosamides, les tétracyclines et les fluoroquinolones (130). La vaccination est la stratégie la plus utilisée et la plus efficace pour contrôler les infections à *M. hyopneumoniae* (130, 131). La plupart des vaccins commerciaux sont produits avec des cellules entières inactivées ou des bactérines et administrés par voie intramusculaire principalement aux porcelets post-sevrés. Ces vaccins réduisent les signes cliniques et les lésions pulmonaires, mais ne protègent pas les porcs contre la colonisation du pathogène (130-132). Les vaccins commerciaux dirigés contre *M. hyopneumoniae* sont fabriqués principalement avec la souche J inactivée, qui a été isolée d'un troupeau de porc au Royaume-Uni (131, 132). Des vaccins autogènes peuvent également être utilisés, mais il est difficile d'isoler et de cultiver les souches de *M. hyopneumoniae* en grand volume et peu d'études ont montré leurs efficacités (130). Des vaccins expérimentaux utilisant des ADNs recombinant ou des protéines recombinantes ont été développés (131). Une étude a évalué l'efficacité protectrice de trois vaccins à bactérines innovants (avec trois formulations d'adjuvants différents) sur un modèle expérimental de porc (132). Les trois formulations de vaccins ont pu réduire les symptômes cliniques, les lésions pulmonaires macroscopiques/microscopiques et la charge bactérienne dans les poumons. Cependant, comme les vaccins commerciaux ceux-ci n'ont pas pu empêcher la colonisation de *M. hyopneumoniae* chez les porcs (132).

3. Immunité innée

3.1 Principe général du système immunitaire inné

Les mammifères sont constamment en contact avec des micro-organismes et parfois ceux-ci sont considérés comme pathogènes pour leur hôte et celui-ci doit pouvoir se défendre. C'est pourquoi, au cours de l'évolution ils ont développé des systèmes de défenses. En effet, le système immunitaire des mammifères, est composé de deux axes qui sont l'immunité innée et adaptative (133, 134). L'immunité innée est considérée comme la première ligne de défense de l'hôte contre les agents pathogènes et l'élimination de ceux-ci (si cela est possible) est médiée par des cellules phagocytaires comme les monocytes, les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques (DC) (133, 134). L'immunité innée est également à l'origine de la plupart des réponses inflammatoires (133, 134). La peau et les muqueuses qui tapissent la plupart des organes et des cavités peuvent également être considérées comme faisant partie du système immunitaire inné qui représentent une première ligne de défense contre les pathogènes (134, 135). Les peptides antimicrobiens produits par l'hôte servent également de première ligne de défense (136). L'immunité adaptative se met en place plus tardivement durant l'infection (133). L'immunité innée renseigne le système immunitaire adaptatif sur la nature du pathogène *via* les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) dont les plus importantes sont les DC (134, 137). C'est grâce à l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), des molécules co-stimulatrices (principalement CD80 et CD86) à la surface des DC et des médiateurs de l'inflammation que l'immunité adaptative peut se déclencher (134). C'est également grâce à la reconnaissance des antigènes (issues des pathogènes) par un vaste répertoire de récepteurs à la surface des lymphocytes que l'immunité adaptative se met en place (133, 134). Cette dernière permet aussi de générer la mémoire immunologique contre un pathogène spécifique, qui est médiée par les plasmocytes (cellules B mémoires) (134).

3.2 Reconnaissance des micro-organismes par le système immunitaire inné

3.2.1. « Pattern recognition receptors » ou PRR

Les micro-organismes pathogènes sont reconnus par des récepteurs de reconnaissance nommés « pattern recognition receptor » (PRR) présents à la surface de diverses cellules immunitaires comme les macrophages, les DC, les cellules B, certaines cellules T et même sur des cellules ne faisant pas partie du système immunitaire comme les fibroblastes ou les cellules épithéliales (133, 138, 139). Les PRR permettent l'induction de cytokines, chimiokines, interféron de type I, de peptides antimicrobiens, de molécules co-stimulatrices, de molécules du CMH et d'autres effecteurs (133).

a. « Toll-like receptors » ou TLR

Les « toll-like receptors » (TLR) font partie de la grande famille des PRR présents également sur la plupart des cellules (133, 134). À ce jour, douze membres de la famille des TLR ont été décrits chez les mammifères (133). Ces récepteurs sont des glycoprotéines caractérisées par un domaine extracellulaire contenant un nombre variable de motifs riches en leucine (LRR), un domaine transmembranaire et un domaine de signalisation cytoplasmique (133, 140). Les récepteurs TLR peuvent être divisés en deux sous-familles, selon leurs localisations. En effet, ils peuvent être extracellulaires ou intracellulaires et ne vont pas reconnaître les mêmes pathogènes (133, 137, 140). L'expression des TLR n'est pas fixe, mais elle est plutôt modulée en fonction de la reconnaissance du pathogène, des signaux environnementaux et des médiateurs de l'inflammation (133, 140). Les TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5 et TLR-6 sont exprimés à la surface cellulaire alors que les TLR-3, TLR-7, TLR-8 et TLR-9 sont exprimés dans des endosomes intracellulaires et nécessitent une internalisation de leurs ligands (133, 140). Les TLR reconnaissent des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) qui sont des composés essentiels des microorganismes tels que, entre autres, les peptidoglycanes, les lipoprotéines, les flagellines, les lipopolysaccharides (LPS) et les acides nucléiques (140).

b. Motifs moléculaires associés aux pathogènes ou PAMPs

Certains composants de la paroi cellulaire considérés comme PAMPs stimulent les cellules du système immunitaire innée et déclenchent une réponse immunitaire (133, 134, 140). Chez les bactéries à coloration de Gram positive, la paroi n'est pas composée de lipopolysaccharide (LPS) comme les bactéries à coloration de Gram négative, mais elle est composée de LTA ou de PG ou encore de lipoprotéines, qui sont reconnues comme ligands activateurs *via* les TLR (133). Le TLR-2 par exemple reconnaît spécifiquement le LTA, le PG et les lipoprotéines des bactéries à coloration de Gram positive (133, 134, 140). L'ADN bactérien peut également être reconnu grâce à un motif dinucléotide CpG non méthylé qui n'est pas présent dans le génome des cellules eucaryotes (133). La reconnaissance de l'ADN bactérien est médiée par le TLR-9 intracellulaire principalement, grâce à l'acidité présent dans les endosomes, l'ADN double brin, est dégradé et le TLR-9 peut ainsi le reconnaître et déclencher une cascade de signalisation (133, 140).

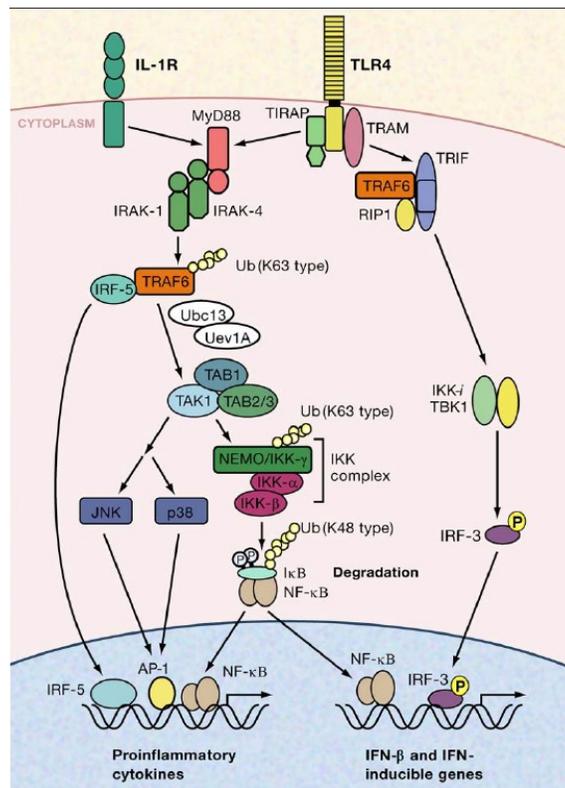


Figure 7 : Représentation schématique de la voie de signalisation MyD88 et TRIF via le TLR-4 et le récepteur de l'IL-1 (Akira et al., 2006)

c. Voie de signalisation des TLR

Il existe deux voies de signalisation pour permettre l'induction des médiateurs inflammatoires soit la voie MyD88 soit la voie TRIF (133, 140) (voir la figure n°7).

- **Voie de signalisation MyD88**

À la suite de la reconnaissance du ligand par les PRR, celui-ci se dimérise et subit une modification conformationnelle induisant son activation. Ce changement de conformation est requis pour permettre le recrutement d'adaptateurs contenant le domaine TIR comme MyD88 (facteur de transcription myéloïde 88) et TIRAP. MyD88 est responsable de l'activation d'une cascade de signalisation conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires. Le recrutement de MyD88 permet la formation du complexe IRAKs (IRAK-1 est phosphorylé par l'IRAK-4 qui permet son activation), TRAF-6 et IR-F5. Par la suite, TRAF-6 ubiquitinylé par le complexe Ubc13 et Uev1A induit le recrutement et l'activation du complexe TAB1, TAB2/3 et TAK1. Ce dernier phosphoryle alors $\text{I}\kappa\beta$ qui module l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa\beta$. Le complexe Ubc13 et Uev1A induit également une ubiquitination sur le complexe NEMO. Ce complexe transfère ses molécules d'ubiquitine à $\text{I}\kappa\beta$. À la fin de cette cascade de signalisation, le facteur de transcription NF- $\kappa\beta$ est recruté et transloqué vers le noyau (à la suite de la dégradation de la molécule $\text{I}\kappa\beta$) pour induire la transcription des gènes codant les cytokines pro-inflammatoires (133, 134, 140) (voir la figure n°7).

- **Voie de signalisation TRIF**

La production de l'IFN de type I est indépendante de la voie de signalisation MyD88. La stimulation des TLR-3, 4, 7 et 9 par des ligands (issus de pathogènes), induit la production principalement des IFN de type I comme les IFN- γ ou IFN- α . Cette voie est initiée par une protéine contenant le domaine TIR, qui est la protéine TRAM qui peut se fixer au TLR-4 par exemple (voir figure n°7). TRAM peut s'associer au TLR-4 et la molécule TRIF, la protéine TRAM permet donc de créer un pont entre TLR-4 et TRIF. Cette association va induire le recrutement de TRAF-6 et RIP-1. Ce complexe et la molécule TRIF permettent d'activer TRAF-6 qui lui-même permet d'activer une kinase nommée TBK1 qui a la capacité, après activation, de phosphoryler IRF-3 ou IRF-7 ce qui

induit leurs activations. Les molécules IRF-3 et 7 phosphorylées se regroupent en dimères et sont transloquées vers le noyau entraînant ainsi la transcription et l'expression des gènes codant l'IFN de type 1 (133, 134, 140).

3.3 Cellules du système immunitaire innée

Les monocytes/macrophages, les DC, les mastocytes, les neutrophiles, les éosinophiles et les cellules tueuses naturelles dites « Natural Killer » (NK) font partie des cellules du système immunitaire inné. Ici, nous allons-nous intéresser en particulier aux DC et aux macrophages qui sont des cellules immunitaires essentielles impliquées dans la reconnaissance de nombreux micro-organismes pathogènes tels que *S. suis*, *M. hyopneumoniae* et *M. hyorhinis*.

3.3.1. Macrophages

Les macrophages ont été découverts pour la première fois, à la fin du 19^{ème} siècle, par Elie Metchnikoff qui a introduit le terme macrophage signifiant « macro : grand » et « phage : mangeur » (138, 141, 142). Les macrophages ont été classés comme faisant partie des cellules phagocytaires mononucléaires avec les monocytes et les DC principalement (141, 142).

a. Origine des macrophages tissulaires

Pendant de nombreuses années, il a été suggéré que les macrophages dérivent uniquement de la différenciation des monocytes circulant lors de leurs migrations vers les tissus et organes. Cependant, des différenciations morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles entre ces monocytes et les macrophages dans les organes réfutent cette théorie (138, 141). En effet, la plupart de ces macrophages présents chez l'adulte proviennent du sac vitellin embryonnaire. Ils sont donc « ensemencés » au niveau des organes bien avant la naissance et ont une capacité d'auto-renouvellement (138, 141). Mais une fraction des macrophages retrouvés dans les tissus et organes (ayant une durée de vie courte) proviennent des monocytes circulant (138, 141).

b. Plasticité des macrophages

Les macrophages présentent une plasticité importante et peuvent passer d'un phénotype cellulaire à un autre. Le processus permettant d'obtenir des macrophages phénotypiquement différents s'appelle la polarisation et est induite principalement par les stimuli environnementaux dans les tissus (138, 143).

Les deux grandes familles de macrophages sont les macrophages M1 dits pro-inflammatoires et les macrophages M2 dits anti-inflammatoires (138, 143). Les macrophages M1 sont principalement induits par les cytokines IFN- γ et TNF- α sécrétées par les lymphocytes Th1 ou par la reconnaissance du LPS et d'autres facteurs bactériens (138, 143). Ces macrophages, une fois activés, produisent des cytokines pro-inflammatoires de type IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, TNF- α et des chimiokines comme CCL2 et CCL7 (138, 143). La fonction principale des macrophages M1 est d'éliminer les agents pathogènes intrusifs grâce à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, de ROS (« reactive oxygen species ») et d'autres molécules impliquées dans la dégradation des micro-organismes. Les macrophages M2 ont une action anti-inflammatoire et réparent entre autres les dommages causés aux tissus et la cicatrisation des plaies. La polarisation des macrophages M2 est induite par les cytokines : IL-4, IL-10, IL-13, IL-21, IL-33 sécrétées par les lymphocytes Th2 (138), les glucocorticoïdes et/ou le « transforming growth factor- β 1 » (TGF- β 1) (143). Les macrophages M2 produisent principalement des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le TGF- β (138, 143). En fonction du stimulus d'activation reçu, les macrophages M2 peuvent également être divisés en quatre sous-ensembles différents : M2a, M2b, M2c et M2d. L'exposition des macrophages M2 aux signaux M1, ou vice versa, qui induisent une « re-polarisation » des macrophages différenciés est une autre preuve de leur plasticité élevée (138).

c. Fonctions des macrophages

Une des fonctions majeures des macrophages est la capacité de phagocyter les agents pathogènes, les débris cellulaires, les cellules mortes (138, 141, 142, 144). En effet, les particules sont endocytées par extension de la membrane cellulaire et se retrouvent dans les phagosomes des macrophages (139). Ensuite, la fusion du lysosome avec le phagosome donnant le phagolysosome permet la dégradation (« killing ») de ces particules grâce à de nombreuses

enzymes et des radicaux libres comme les ROS (138). Les principales enzymes retrouvées dans le phagolysosome sont les glycosidases (telles que la galactosidase, la mannosidase, la glucuronidase et l'hexosaminidase) et les protéases (y compris les cathepsines B, L, H et S, la furine et la dipeptidyl peptidase II) (139). Les macrophages sont également capables d'induire un processus d'apoptose pour les cellules tumorales, sénescents et infectées par des virus ou micro-organismes intracellulaires (138).

Les macrophages ont également la capacité de présenter des antigènes aux cellules du système immunitaire adaptatif comme les lymphocytes T naïfs (138). La présentation de l'antigène est médiée par les CMH de type I ou II (145). Cependant, cette capacité est moins importante que celle des DC, car les macrophages surveillent principalement leur environnement local (141). Une des autres fonctions importantes des macrophages est la production et sécrétion de médiateurs de l'inflammation de type pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires en fonction de la sous-population de macrophage activée (138, 141, 142, 144).

d. Distribution tissulaire des macrophages

Les macrophages sont divisés en sous-populations en fonction de leurs localisations anatomiques et de leurs phénotypes tels que : les microglies dans le système nerveux central (SNC), les ostéoclastes dans les os, les macrophages alvéolaires dans les poumons, les histocytes dans la rate, les cellules de Kupffer dans le foie (138). Les organes lymphoïdes secondaires ont également des populations distinctes de macrophages avec des macrophages retrouvés dans la zone marginale de la rate et des macrophages sous-capsulaires dans les ganglions lymphatiques (138).

- ***Macrophages alvéolaires***

Dans cette partie nous allons-nous intéresser aux macrophages alvéolaires, car *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* et *S. suis* sont des agents pathogènes retrouvés dans le tractus respiratoire des porcs (5, 17, 23).

La fonction respiratoire du poumon oblige cet organe à faire face à de nombreuses substances étrangères comme des allergènes ou des micro-organismes parfois considérés comme des pathogènes par le système immunitaire. Les macrophages alvéolaires représentent plus de 95 %

de la population cellulaire immunitaire dans cet organe et sont considérés comme les sentinelles de leur environnement local (146). Les tensioactifs présents dans le surfactant pulmonaire (composé de lipides, phospholipides et protéines) et les niveaux élevés de CSF-2 (facteur de croissance sécrété par l'épithélium pulmonaire) sont des facteurs locaux potentiels qui permettent d'avoir le phénotype et les fonctions des macrophages alvéolaires (141). Ces macrophages présentent une forte expression des PRR et des récepteurs « piègeurs » (scavenger) à leurs surfaces (144). Les macrophages alvéolaires sécrètent localement un facteur GM-CSF qui permet d'éviter que le surfactant ne s'accumule dans les alvéoles et n'entrave la fonction pulmonaire (142).

3.3.2. Cellules dendritiques

Les DC représentent un type de cellules essentiel dans le système immunitaire innée. En effet, elles jouent un rôle de sentinelle contre les agents pathogènes en se déplaçant dans tout l'organisme. Ces cellules sont également présentes, comme les macrophages, dans tous les tissus périphériques (139, 142, 147). Mais en comparaison les macrophages sont des cellules plutôt localisées. Les DC absorbent en permanence différents types d'antigènes qui proviennent du soi (de l'hôte) ou du non soi (de micro-organismes pathogènes) (147).

a. Origine et maturation des DC

La plupart des DC immatures sont issues de précurseurs hématopoïétiques retrouvés dans la moelle osseuse. Cependant, une population particulière de DC, nommée DC conventionnelles, peut être dérivée des monocytes circulant à la suite d'un stimulus inflammatoire (147). La différenciation/maturation des DC est réalisée par les facteurs environnementaux comme les cytokines, les facteurs de croissance et également par les pathogènes eux-mêmes quand il y a reconnaissance de ceux-ci par les PRR (139, 147). Les DC immatures présentent à leur surface un large éventail de récepteurs phagocytaires et un nombre important et diversifié de TLR (139). Pendant la maturation/activation des DC, ceux-ci produisent des cytokines et chimiokines (139). Il est également observé une augmentation des récepteurs utiles à la présentation de l'antigène et des molécules co-stimulatrices afin d'activer les lymphocytes T naïfs (11). Il existe une

population hétérogène de DC comprenant des DC conventionnelles (cDC1 et cDC2) et des DC plasmacytoïdes (pDC). La maturation des DC induit la sélection de récepteurs et corécepteurs spécifiques à la sous-population de DC (139, 147).

b. Fonctions des DC

Les DC, comme les macrophages, peuvent phagocyter et éliminer les agents pathogènes à la fois dans les tissus périphériques et dans les organes lymphoïdes secondaires, mais de façon moins efficace que les macrophages (139). Seuls les DC immatures ont des capacités phagocytaires, à la suite de la différenciation des DC, ceux-ci perdent leurs capacités de phagocytose (139). Les phagosomes des DC présentent diverses endopeptidases, exopeptidases, estérases et réductases, telles que la thiol réductase lysosomale (139). Les DC produisent et sécrètent également une variété de médiateurs de l'inflammation, selon la sous-population de DC, ce qui induit le recrutement d'autres cellules du système immunitaire (139).

Les DC sont des CPA professionnelles. En effet, le rôle principal des DC est de faire le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative en présentant des antigènes pour activer les lymphocytes T naïfs dans les organes lymphoïdes secondaires (les ganglions lymphatiques et la rate) pour initier des réponses immunitaires spécifiques à l'antigène (139, 148). Les interactions entre les PRR et leurs ligands déclenchent une cascade de signalisation intracellulaire qui induit la sécrétion de plusieurs cytokines pro-inflammatoires et l'expression de molécules de surface cellulaire co-stimulatrices (11). Plus précisément, après avoir absorbé des agents pathogènes ou des cellules tumorales dans les tissus périphériques ou la circulation sanguine, les DC dégradent les antigènes en peptides (139, 148). Ceux-ci sont « chargés » sur des molécules du CMH classe I ou classe II. Lors de l'internalisation des antigènes par les DC, ceux-ci ne doivent pas être entièrement détruits par les enzymes présentes dans les phagosomes et endosomes pour pouvoir être présenté aux lymphocytes (148).

Les complexes peptides-CMH sont exportés des vésicules endosomales vers la surface cellulaire. Le récepteur TCR présent à la surface des lymphocytes T naïfs permet de reconnaître le complexe antigène-CMH. Cette reconnaissance constitue le premier signal d'activation des lymphocytes T naïfs. Le second signal d'activation est la reconnaissance des molécules co-stimulatrices CD80/86

par les récepteurs CD152 et CD28 des lymphocytes T naïfs » Enfin, le dernier signal d'activation est médiée par les médiateurs de l'inflammation sécrétés par les DC. Ce phénomène d'activation va induire la maturation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T de différentes lignées (149).

c. Complexe majeur d'histocompatibilité ou CMH

Les molécules du CMH, nommé « human leukocyte antigen » (HLA) chez l'humain et « swine leukocyte antigen » (SLA) chez le porc, de classe I ou II sont des glycoprotéines membranaires (145, 150, 151). Les CMH de classe I ou II sont différents en fonction de leurs structures, des peptides antigéniques qu'ils présentent, mais également des populations de lymphocytes qu'ils activent. En effet, le CMH de classe I se lie et présente principalement des peptides cytosoliques provenant d'une infection virale, de bactéries intracellulaires. Le CMH de classe I présente l'antigène provenant du cytosol aux lymphocytes T présentant le corécepteur CD8⁺ et induit une réponse plutôt cytotoxique (139, 145, 148, 151). En revanche, le CMH de classe II présente un peptide provenant de l'internalisation de molécules antigéniques extracellulaires aux lymphocytes T présentant le corécepteur CD4⁺ et induit une réponse inflammatoire en libérant des cytokines pro-inflammatoires. Ces cytokines vont permettre d'amplifier la réponse inflammatoire globale pour induire : la prolifération des cellules B et T, permettre l'activation des macrophages et la différenciation des cellules B (139, 145, 148, 151). D'autres cellules et certaines DC peuvent présenter des antigènes exogènes sur le CMH de classe I, ce phénomène est nommé « présentation croisée » (139). Le CMH de classe I est exprimé sur presque toutes les cellules de l'organisme, à l'exception des globules rouges et des cellules neuronales. En revanche, le CMH de classe II est exprimé à la surface des CPA, des macrophages, des lymphocytes B et des cellules microgliales (151).

Une grande diversité génique est présente dans les gènes qui codent pour les SLA de classe I et II chez le porc (150, 151) : pour les SLA de classe I on retrouve les gènes *sla-1*, *sla-2* et *sla-3* pour les SLA classiques (hautement polymorphes), les gènes *sla-6*, *sla-7* et *sla-8* pour les SLA non classiques et pour finir les pseudogènes *sla-4*, *sla-5*, *sla-9* et *sla-11* (150, 151). Les gènes présents dans le locus du SLA de classe II présentent une homologie importante de séquence avec les gènes humains HLA de classe II. L'arrangement global des gènes de SLA classe II est similaire à

l'arrangement des gènes de HLA classe II, mais la longueur des régions géniques des SLA de classe II est plus courte (151).

3.3.3. Marqueurs cellulaires

Les marqueurs présents à la surface des cellules immunitaires permettent à la fois de différencier les cellules activées des cellules non activées, de trier les sous populations cellulaires et également de mettre en lumière les récepteurs/marqueurs impliqués dans la reconnaissance des agents pathogènes. Les marqueurs cellulaires peuvent être identifiés par « fluorescence-activated cell sorting » (FACS) ou immunocytochimie (142).

a. Récepteurs/marqueurs cellulaires des macrophages alvéolaires

Les macrophages présentent à leurs surfaces une variété de récepteurs cellulaires, certains sont représentés dans la figure n°8. Sur la totalité des macrophages, il est retrouvé des molécules de costimulation comme CD80, CD86 et CMH de classe I et II (151). On retrouve à la surface des macrophages d'autres récepteurs impliqués dans la phagocytose comme les récepteurs MMR (membre de la famille des lectines de type C) et les récepteurs MSR (sous-type des récepteurs « piègeurs » : SR-A) qui peuvent reconnaître l'ADN double brin et également le LPS et le LTA(134). Le récepteur CD14 est un marqueur retrouvé à la surface des monocytes, des macrophages et des neutrophiles. L'intensité d'expression de ce récepteur, à la surface des cellules, dépend de la maturation et du type cellulaire. Par exemple, les neutrophiles expriment de faible niveau de CD14 alors que les monocytes et les macrophages expriment de façon importante le récepteur CD14 (151).

Il est retrouvé à la surface des macrophages alvéolaires un phénotype de marqueurs distincts des autres macrophages : F4/80^{low}, CR3^{low/-} et CD206^{high} (142). De nombreux autres marqueurs sont présents à la surface des macrophages alvéolaires, mais certains ont été plus étudiés comme le récepteur sialoadhésine (ou CD169) et le récepteur CD163.

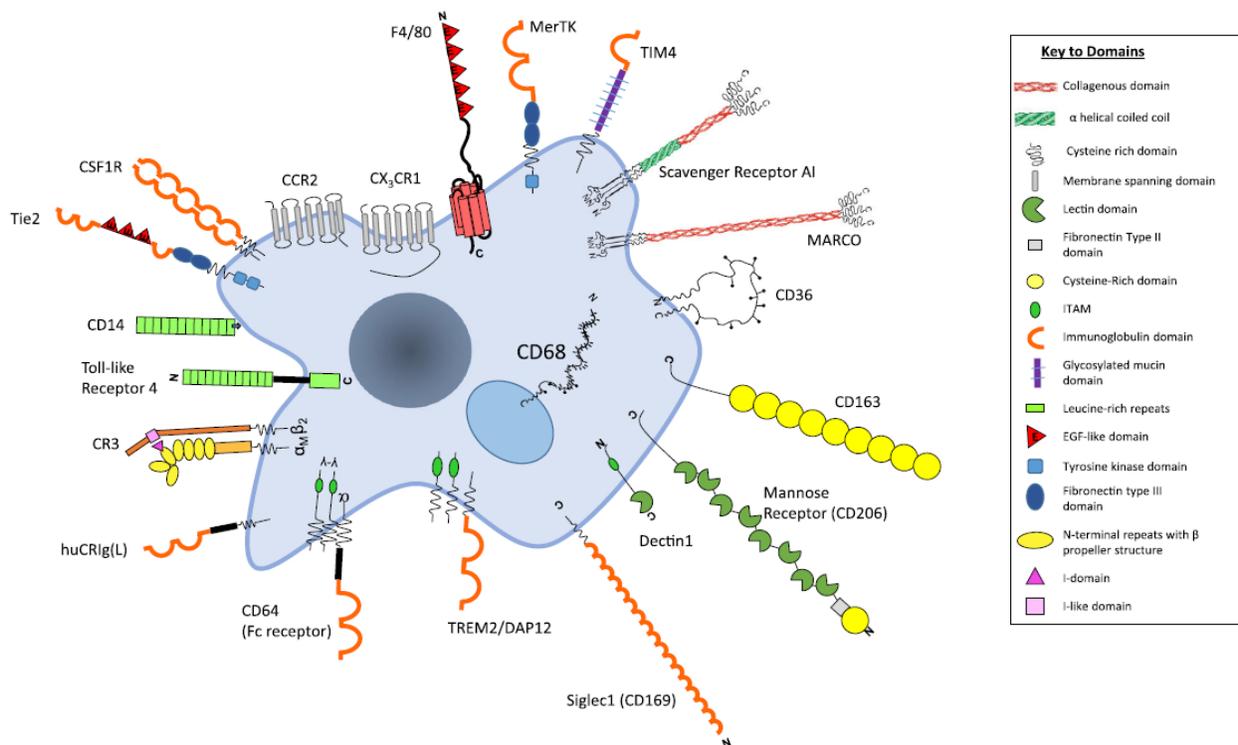


Figure 8 : Représentation schématique de marqueurs cellulaires présents à la surface des macrophages (Gordon et al., 2017)

- **Le marqueur sialoadhésine**

Le marqueur sialoadhésine (Sn) (Siglec-1 ou CD169) a été initialement identifié comme un récepteur des érythrocytes de mouton permettant de lier l'acide sialique (152-154). Depuis, il a été caractérisé chez de nombreuses espèces de mammifères : chez l'humain, la souris, le rat et le porc (153). Une expression élevée de Sn a été détectée à la surface des macrophages inflammatoires impliqués dans des maladies inflammatoires humaines (153, 155). Il a été démontré que Sn joue un rôle important dans la capture et l'internalisation des agents pathogènes en se liant aux résidus d'acide sialique (152). Il permet l'endocytose de plusieurs agents pathogènes viraux porcins comme le *PRRSV* (152) et l'artérovirus porcine (153). Il a également été décrit dans l'attachement d'une bactérie contenant de l'acide sialique qui est *Neisseria meningitidis* (155). Il a été mis en évidence que le *PRRSV* en se liant au récepteur Sn inhibe la production d'IFN et de TNF- α dans les macrophages primaires alvéolaires porcins *in vitro* supprimant la réponse immunitaire antivirale innée (152).

- **Le marqueur CD163**

Le marqueur CD163 est une protéine glycosylée de surface contenant un domaine riche en cystéine (154, 156). Au départ, ce marqueur a été associé comme marqueur spécifique des macrophages et monocytes présentant une activité anti-inflammatoire (157). Ce marqueur est considéré comme un récepteur « piègeur » qui est impliqué dans l'absorption des complexes haptoglobines-hémoglobines, des micro-organismes pathogènes et dans l'adhésion des érythroblastes. Le récepteur est impliqué dans la reconnaissance et l'endocytose du *PRRSV* (154, 156) et le virus de la peste porcine africaine (*AFSV*) (156). La plupart des macrophages tissulaires, expriment à leurs surfaces le récepteur CD163 et l'expression est particulièrement élevée sur les cellules hépatiques de Kupffer et sur les macrophages péritonéaux et alvéolaires (157). Les granulocytes et les DC n'expriment pas des niveaux significatifs du récepteur CD163 (157). Il a été montré que le récepteur CD163 peut reconnaître des bactéries à coloration de Gram négative et positive (*Escherichia coli* et *Streptococcus mutans*) et induire la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-6 (157, 158).

b. Récepteurs/marqueurs cellulaires des DC porcines

Comme pour les macrophages, il est retrouvé à la surface des DC les molécules co-stimulatrices telles que CD80, CD86 et les CMH de classe I et II (159). Il a été décrit que l'augmentation de l'expression des molécules de CMH de classe II est corrélée à la maturation des DC (159). Pendant le processus de maturation des DC, il est également observé une augmentation des molécules co-stimulatrices telles que CD40, CD80 et CD86 qui permettent d'initier l'activation des lymphocytes T en plus du CMH de classe II (149, 159).

Les DC porcines semblent se comporter, dans l'ensemble, comme les DC dérivées de la moelle osseuse murines et humaines. Il est donc supposé que la régulation des marqueurs de surfaces et des molécules co-stimulatrices sont régulées de la même façon que chez les humains et les souris (151). Le récepteur CD16 est retrouvé à la surface des DC provenant des monocytes circulant ainsi qu'à la surface des DC porcines retrouvées dans la circulation sanguine (151). Chez l'humain et le porc, les marqueurs CD1 du groupe I (CD1 a, b et c) sont exprimés sur les thymocytes corticaux, une partie des cellules B, les DC retrouvées dans le thymus, certains

macrophages et les cellules de Langerhans (151). Les DC retrouvées dans les poumons présentent également un phénotype CD11c⁺, CD11b⁺, CMH de classe II^{high} (147). En fonction de la sous-population de DC telles que les DC conventionnelles ou plasmacytoïdes les marqueurs présents à leurs surfaces et leurs niveaux d'expressions ne seront pas les mêmes chez le porc (151).

3.3.4. Cytokines

Les cytokines sont des protéines de signalisation solubles produites par de nombreuses cellules du système immunitaire (neutrophiles, monocytes, macrophages, lymphocytes B et lymphocytes T) pour réguler les réponses immunitaires (160, 161). Il existe différentes familles de cytokines comme les interleukines, les chimiokines, les interférons et les TNF (160, 161). Les cytokines diffèrent par leurs fonctions. Par exemple, les interleukines sont induites dans les réponses inflammatoires alors que les chimiokines sont des molécules impliquées dans l'attraction des cellules (161). Les cytokines agissent comme modulateurs dans les réponses immunologiques, le développement hématopoïétique, la communication des cellules ainsi que les réponses de l'hôte aux agents infectieux et aux stimuli inflammatoires (160). Elles interagissent les unes avec les autres de manières complexes et peuvent être synergiques ou antagonistes entre elles et peuvent également induire la production d'autres cytokines. Les cytokines ont une action pléiotrope qui fait référence à leurs capacités à s'adresser à plusieurs cibles et induire plusieurs effets physiologiques. Des concentrations élevées en cytokines témoignent d'une inflammation ou d'une progression de maladies (161). Il est donc utile de mesurer ces protéines comme biomarqueurs des inflammations. Pour cela, il peut être utilisé des méthodes ELISA ou des méthodes indirectes PCR pour la détection des gènes codant pour les cytokines (RT-qPCR) (161).

a. Maturation des cellules

Les cytokines retrouvées localement dans un contexte inflammatoire induisent la maturation des cellules en particulier des DC. Le TNF- α et l'IL-1 β , principalement, permettent d'induire la maturation des DC (162, 163). La maturation des DC va entraîner une diminution de leurs capacités à invaginer les antigènes, une augmentation de l'expression des récepteurs co-stimulateurs (CD40, CD80, CD86), une augmentation de l'expression des molécules du CMH de

classe I ou de classe II, une augmentation de leurs capacités à présenter des antigènes et une augmentation de leurs capacités à stimuler les lymphocytes T naïfs (162, 163). L'action du TNF- α est en partie inhibée par l'IL-10 (163). De plus, il a été montré *in vitro* que l'IL-10 inhibait la différenciation des DC à partir des monocytes circulants et que cette cytokine induisait la différenciation des macrophages avec le phénotype CD14⁺, CD16⁺ et CD68⁺ (162). Comme il a été décrit précédemment, les macrophages M1 pro-inflammatoires sont principalement induits par les cytokines IFN- γ et TNF- α , sécrétées par les lymphocytes Th1 (138). Alors que les macrophages M2 anti-inflammatoires sont induits par l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13, l'IL-21 et l'IL-33, sécrétées par les lymphocytes Th2, les glucocorticoïdes et/ou le TGF- β 1 (138).

b. Migration des cellules

Une autre fonction des cytokines et, en particulier, celle des chimiokines est d'induire la migration des cellules immunitaires vers un site d'infection. Les chimiokines sont directement impliquées dans la migration et l'activation des monocytes à travers l'endothélium. En effet, la CXCL-8 (IL-8) ainsi que la protéine chimioattractive MCP-1 permettent le recrutement et l'attachement des monocytes à la surface des cellules de l'endothélium vasculaire (138). Les macrophages localisés dans les tissus périphériques permettent d'induire la production de molécules d'adhésion (les sélectines, les intégrines, la superfamille des immunoglobulines et les glycoprotéines de type mucine) à la surface des cellules endothéliales vasculaires grâce à la sécrétion de cytokine telles que le TNF- α et l'IL-1 β (138). Les macrophages produisent une grande quantité de cytokines pro-inflammatoires et chimiokines, à la suite de la détection des signaux de danger, ce qui va permettre de recruter des monocytes de la circulation sanguine. Il a également été montré *in vitro* chez la souris que l'ajout du TNF- α entraîne la migration des DC présentes dans le cœur, les reins et la peau alors que l'IL-1 α entraîne la migration des DC rénales (163).

3.3.5. Rôle de la réponse immunitaire innée à la suite d'une infection à *S. suis*

a. Colonisation de *S. suis*

Dans le mucus des voies respiratoires, il est retrouvé une enzyme antimicrobienne nommée lysozyme qui permet d'hydrolyser la liaison glycosidique entre le N-acétylglucosamine et l'acide N-acétylmuraminique présent au niveau du PG (5). Il a été retrouvé chez *S. suis*, un gène nommé *pgdA* impliqué dans la fonction de modification du PG par un mécanisme de N-désacétylation, qui ne sera donc plus reconnu par le lysozyme (5, 6, 9). Les cellules épithéliales peuvent sécréter de nombreux peptides antimicrobiens dont les peptides antimicrobiens cationiques (CAMP). Les défensines et les cathélicidines sont deux grandes familles des CAMPs, elles produisent des pores dans la paroi cellulaire des bactéries. La protéase de type subtilisine (*SspA*) est présente chez la bactérie et permet de dégrader la cathélicidine (5). La *SspA* serait également capable de dégrader les chimiokines CCL5 et CXCL8, qui pourrait retarder la migration des cellules immunitaires comme les neutrophiles (9).

b. *S. suis* et les cellules du système immunitaire innée

- ***S. suis* et les macrophages**

Une des premières études *in vitro* menées sur l'interaction de *S. suis* et des macrophages murins a permis de confirmer le rôle anti-phagocytaire en absence d'anticorps et/ou du complément de la CPS de *S. suis* (164). Cependant, les anticorps ont permis d'augmenter la capacité des macrophages à phagocyter *S. suis* et d'augmenter sa destruction intracellulaire (164). *S. suis* est capable d'adhérer à la surface des macrophages murins grâce à l'acide sialique contenu dans sa CPS sans être phagocyté et reste donc extracellulaire (165). La pré-opsonisation de *S. suis* avec des anticorps a permis d'augmenter l'adhésion aux macrophages murins. La suilysine de la bactérie serait responsable de la cytotoxicité engendrée sur les macrophages (165). De plus, les souches Nord-Américaines de *S. suis*, négatives à la suilysine, avaient une capacité d'adhésion supérieure aux souches européennes positives à la suilysine (165). Il a également été montré que *S. suis* encapsulé pouvait moduler les voies de signalisation de PI-3K (phosphatidylinositol 3-

kinase), de la protéine kinase Akt, de la protéine kinase C PKC et de plusieurs phosphatases tyrosines impliquées dans les réarrangements du cytosquelette et dans l'activation des macrophages murins (166). L'étude *in vitro* de Houde et *al.* (167), démontre que *S. suis* encapsulé pourrait perturber les radeaux lipidiques présents à la surface des macrophages murins empêchant le déclenchement des mécanismes de la phagocytose. De plus, *S. suis* encapsulé empêche l'accumulation de LacCer (lactosylcéramide), qui est un PRR glycosphingolipidique, par déstabilisation des radeaux lipidiques (167).

Il a été montré que *S. suis* tué par la chaleur pouvait induire la sécrétion de l'IL-6 et du TNF- α par les macrophages murins (168). La présence ou l'absence de la CPS n'a eu aucun effet sur la libération de l'IL-6. Cependant, l'absence de la capsule induisait l'augmentation de la sécrétion du TNF- α , suggérant un rôle des composants de la paroi cellulaire (168). *S. suis* encapsulé induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires de façon importante, mais de façon moindre que les composants de la paroi cellulaire (168). Il a également été montré *in vitro*, que l'expression du gène codant pour la protéine dyneine (protéine associée aux microtubules) est régulée à la hausse quand les macrophages alvéolaires porcins sont en contact avec *S. suis* encapsulé (169). Ce qui suggère que les macrophages peuvent réarranger leurs membranes, mêmes s'ils ne peuvent que très peu phagocyter la bactérie. Dans ce modèle, il a également été observé une expression importante des gènes codant pour des médiateurs de l'inflammation comme l'IL-1 β et l'IL-1 α , le TNF- α et le MIP-2 (169). L'expression importante des gènes codant pour les enzymes MAP-kinases, qui sont des régulateurs clés dans la voie de synthèse de nombreuses cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, a également été démontrée (169). Cependant, les gènes codant pour les récepteurs TLR à la surface des macrophages alvéolaires n'ont pas été surexprimés après l'infection à *S. suis* (169). Une lignée cellulaire immortalisée de macrophage alvéolaire a permis de mettre en évidence que la sous-unité p65 du facteur de transcription NF- κ B était transloquée dans le noyau à la suite d'une incubation avec *S. suis*. Ce facteur de transcription est une molécule clé dans la synthèse de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (169).

L'étude de Liu et *al.* (170), a mis évidence que le miR-34a (petite molécule d'ARN non codant) pourrait augmenter l'apoptose des PAMs alors que le gène PPP1R11 (sous-unité régulatrice 11 de la protéine phosphatase 1) pourrait supprimer l'apoptose. Le gène PPP1R11 serait une cible pour

le miR-34a. Donc le miR-34a pourrait réguler l'apoptose des PAMs en ciblant PPP1R11. Le gène PPP1R11 est donc potentiellement impliqué dans la pathogénèse de *S. suis* en inhibant l'apoptose des PAMs.

- ***S. suis* et les cellules dendritiques**

La mise en contact de *S. suis* avec des DC murines *in vitro* a permis de mettre en évidence que *S. suis* est capable d'activer les DC en augmentant l'expression des molécules co-stimulatrices telles que CD40, CD86 et le CMH de classe II à la surface de ces cellules (171). Il a également été montré que la CPS de *S. suis*, lui confère une protection contre la phagocytose en absence de molécules opsonisantes induite par les DC murines et porcines (171, 172). La D-alanylation du LTA, la N-désacétylation du PG et la suilysine confèrent à la bactérie une protection contre la phagocytose dépendante du complément et permettent une modulation de la libération des cytokines (171).

S. suis encapsulé permet d'induire la libération, par les DC porcines, de l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12p40 et du TNF- α (172). Il a été montré que l'exposition des composants de la paroi cellulaire de *S. suis* induisait une libération plus élevée des médiateurs de l'inflammation (172). Il a été montré que la souche sauvage de *S. suis* induit peu d'expression des molécules co-stimulatrices comme CD80, CD86 et CMH-II comparé à la souche mutante sans capsule suggérant une présentation antigénique altérée des DC aux lymphocytes T (172). Il a également été montré que *S. suis* encapsulé semblait capable de retarder l'expression en surface du CMH-II des DC murines (149). Le niveau d'expression de CIITA (qui est un activateur transcriptionnel de la molécule du CMH-II) était régulé à la baisse dans les DC murines après stimulation de *S. suis* ce qui suggère une altération dans la capacité de synthétiser de nouvelles molécules du CMH (149). Il a également été observé que la bactérie encapsulée était capable de détourner les voies d'ubiquitination induite par MARCH1 et 8 favorisant la dégradation lysosomale du CMH-II et de la molécule co-stimulatrice CD86. Cette étude met en évidence que *S. suis* induit une altération dans la capacité des DC à présenter un peptide antigénique aux lymphocytes T naïfs de façon efficace (149).

Différents récepteurs sont nécessaires dans la reconnaissance de *S. suis* par les DC pour induire une réponse efficace contre ce pathogène. Le mécanisme de reconnaissance est induit par l'interaction des composés de la paroi cellulaire de *S. suis* et des récepteurs TLR et NOD (d'autres

récepteurs PRR) présents à la surface des DC (11). Cette reconnaissance induit l'activation de la voie de signalisation MyD88 qui engendre la production des cytokines pro-inflammatoires suivantes : IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ et TNF- α , les cytokines activatrices des lymphocytes T : IL-12p70 et IL-23, l'IL-10 et les chimiokines CXCL1 et CXCL10 (6, 9-11). Il a été observé que *S. suis* est principalement reconnu par le TLR-2, probablement en association avec le récepteur CD14, présent à la surface des DC et des macrophages (10, 11). En revanche, le TLR-4 ne semble pas être impliqué dans la reconnaissance de *S. suis* (10, 11). Il semblerait que d'autres récepteurs TLR seraient impliqués dans la reconnaissance de la bactérie, mais de façon moindre que la reconnaissance médiée par le TLR-2 (10). En effet, il a été montré que *S. suis* et la CPS purifiée interagissaient avec les monocytes humains et les macrophages murins induisant la production de MCP-1 (permet le recrutement de leucocyte et peut porter atteinte à l'intégrité de la barrière BBB) par une voie indépendante du TLR-2 et du MyD88 (10). Cependant, les récepteurs TLR ne semblent pas être impliqués dans la phagocytose de *S. suis* par les DC, sachant que *S. suis* encapsulé n'est quasiment pas phagocyté (11). Il a également été montré que l'expression des récepteurs CD86 et CMH de classe II, à la surface des DC murines, est médiée par la voie de signalisation MyD88 et la reconnaissance de *S. suis* par le TLR-2 (11). Le récepteur cytosolique NOD2 des DC murines, semble reconnaître *S. suis* et induire la cascade de signalisation permettant la production de CXCL1 et de l'IL-23. Le TLR-9 en association avec le TLR-2 et le récepteur NOD2 sembleraient jouer un rôle dans la reconnaissance de *S. suis* (11).

3.3.6. Rôle de la réponse immunitaire innée à la suite d'une infection à *M. hyopneumoniae* et *M. hyorhinis*

a. *M. hyopneumoniae*/*M. hyorhinis* et les macrophages

Comme décrit pour *S. suis*, de nombreuses espèces mycoplasmiques sont capables d'échapper à la phagocytose médiée par les cellules du système immunitaire. Comme décrit précédemment, il a été montré que *M. hyopneumoniae* en contact avec les macrophages alvéolaires porcins et après un traitement à la gentamicine, ne semble pas ou très peu phagocyter (21). Ces résultats ont été confirmés en mesurant l'intensité de fluorescence de la GFP (*M. hyopneumoniae* a été

transformé grâce à un plasmide pour exprimer le fluorochrome GFP) en présence et en absence de l'inhibiteur de phagocytose nommé cytochalasine D (21).

L'étude *in vitro* de Bin et *al.* (173), a permis de mettre en évidence l'expression modifiée de plus de 2000 gènes des macrophages alvéolaires porcins à la suite d'une infection à *M. hyopneumoniae*. En effet, les gènes codant pour le récepteur TLR-2, le facteur de transcription NF- κ B, le récepteur CD14 et le facteur MyD88 ont été régulés à la hausse (173). De nombreux gènes codant pour des cytokines inflammatoires et des chimiokines ont également été régulés à la hausse, par exemple les gènes codants l'IL-1 β , l'IL-1 α , l'IL-8, le TNF- α , le CCL4, le CCL2, le CCL8, le CXCL2 et le CXCL10 (173). *M. hyopneumoniae* induisait également l'augmentation de l'expression de 34 gènes impliqués dans les mécanismes apoptotiques comme ceux codant pour la caspase 10, la protéine A1 lié à BCL2 et PMAIP1 (173).

M. hyopneumoniae est capable de dégrader les pièges extracellulaires macrophagiques (MET) libérés par des macrophages dérivés d'une lignée monocyttaire THP-1 humaine (174). Il a été mis en évidence que la lignée cellulaire était capable de libérer les MET comme les neutrophiles et que ceux-ci avaient pratiquement la même composition que les NET (« neutrophil extracellular traps ») (174). Il semblerait qu'une nucléase membranaire de *M. hyopneumoniae* soit à l'origine de la dégradation des MET et qu'elle fournirait une source de nucléotide pour la synthèse d'ADN de ce mycoplasme (174).

Lors d'une infection à *M. hyopneumoniae*, le mycoplasme semble être reconnu par les récepteurs TLR-2 et TLR-6 présents à la surface des macrophages alvéolaires porcins ce qui déclencherait les voies de signalisation nécessaires à la production de cytokines pro-inflammatoires (99, 175). Cependant, la reconnaissance de *M. hyorhinis* ne semblerait pas être médiée par le récepteur TLR-2 (176). Les lipoprotéines retrouvées à la surface des espèces mycoplasmiques constitueraient les principales molécules reconnues par les récepteurs TLR (99). Une étude a mis en évidence que les lipoprotéines de surface de *M. hyorhinis* ont la capacité de stimuler les macrophages murins C3H/HeJ, induisant la production de NO (101).

b. *M. hyopneumoniae*/*M. hyorhinis* et les cellules dendritiques

Des différences dans la capacité d'induire *in vitro* la production de cytokines pro-inflammatoires par des DC semblent être observées en présence de *M. hyopneumoniae* et *M. hyorhinis*, ce qui signifie qu'il existe des différences entre les espèces mycoplasmiques (177). En effet, il a été observé *in vitro* que *M. hyorhinis* était capable d'induire des niveaux de production plus élevés d'IL-12 par les DC porcines que *M. hyopneumoniae*. La cytokine IL-12 produite par les DC, est associée à l'induction d'une réponse Th1 (différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th1) (177). Il a également été montré des différences dans la production des cytokines pro-inflammatoires par les DC au sein de la même espèce mycoplasgique. Par exemple, la souche *M. hyorhinis* 404 induit une production plus élevée d'IL-8 que la souche *M. hyorhinis* 386 (177). De plus, il est observé qu'une co-infection des DC par *M. hyopneumoniae* et *M. flocculare* induit une augmentation significative de l'IL-10, qui est une cytokine anti-inflammatoire. Cependant, une co-infection des DC par *M. hyopneumoniae* et *M. hyorhinis* ne semble pas induire une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires (177).

Les monocytes, les DC conventionnelles (DC1 et DC2) et les DC plasmacytoïdes (DCp) font partie des cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC). Il a été montré *in vitro* que *M. hyopneumoniae* et *M. hyorhinis* vivants et inactivés (par bromoéthylamine hydrobromide) étaient capables d'activer les différentes cellules PBMC porcines (178). Cette activation a été soulignée par la détection du co-récepteur CD40 (analysé par FACS), présent à la surface de ces cellules. Les deux espèces mycoplasmiques vivantes et inactivées semblent également être capables d'induire la production du TNF principalement par les monocytes porcins, dans une moindre mesure par les sous-populations de DC, ce qui pourrait suggérer que les cellules monocytaires représentent la principale source de production de TNF lors d'une infection mycoplasgique porcine (178). Il est alors supposé dans cette étude, que la sensibilité des monocytes vis-à-vis de *M. hyopneumoniae* et *M. hyorhinis* pourrait conduire à une inflammation exacerbée (178).

c. Production de médiateurs de l'inflammation

Il a été montré chez le porc que *M. hyopneumoniae* engendrait la production de cytokines pro-inflammatoires retrouvées dans les tissus lymphoïdes associés aux bronches (BALT), dans

l'exsudat broncho-alvéolaires et dans les cloisons alvéolaires (179). Les principales cytokines produites dans le BALT étaient l'IL-1, l'IL-2, l'IL-4, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-10 et le TNF- α , leurs taux ont augmenté de manière significative chez les animaux infectés. La cytokine TNF- α joue un rôle important dans la pathogénèse de *M. hyopneumoniae*, car il a été constaté que cette cytokine augmentait rapidement lors des infections aiguës et semblait être impliquée dans les inflammations tissulaires (179). Dans les cloisons alvéolaires, il a été observé l'augmentation significative des cytokines : IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8 et IL-10. Les cytokines IL-1 α et IL-1 β sont des cytokines importantes et permettent la production d'autres cytokines pro-inflammatoires. Il a également été observé dans l'exsudat bronchoalvéolaire une augmentation significative des médiateurs de l'inflammation : IL-1 α , IL-1 β , IL-8 et TNF- α . Ces cytokines permettent également de recruter des cellules inflammatoires ce qui pourrait augmenter le statut inflammatoire présent dans les poumons lors d'une infection à *M. hyopneumoniae* (179). Certaines protéines retrouvées à la surface de *M. hyopneumoniae* comme la protéine P68 semble induire la production des cytokines pro-inflammatoires : IL-1 β et TNF- α (22).

4.Co-infection

Les co-infections bactériennes et/ou virales sont fréquemment rencontrées chez les porcs dans les élevages. Ces co-infections peuvent engendrer une augmentation des manifestations cliniques et porter atteinte à la santé des animaux ce qui va induire une perte économique importante dans l'industrie porcine.

4.1 Le complexe des maladies respiratoires porcines

Les agents pathogènes porcins respiratoires peuvent être divisés : 1) en agents « primaires » induisant des lésions pulmonaires en raison de leur propre virulence et, 2), en agents « secondaires » qui ont généralement besoin des agents pathogènes « primaires » pour induire une infection (180). Les porcs sont généralement élevés en grands nombres dans des espaces restreints favorisant le maintien des agents pathogènes dans l'élevage (180). Le mode d'action des agents pathogènes retrouvés dans les maladies respiratoires porcines, lorsqu'ils sont

combinés, est la plupart du temps additif ou synergique. *M. hyopneumoniae* est l'agent initiateur du PRDC et ces maladies respiratoires se manifestent chez les porcs en croissance et en fin de croissance (âgés entre 14 et 20 semaines) (16, 18, 20, 110). Le PRDC est multifactoriel, car plusieurs agents pathogènes peuvent être détectés et induire des dommages à l'hôte (20, 110). Les agents pathogènes « primaires » les plus fréquemment rencontrés dans le PRDC sont le *PRRSV*, le *SIV*, le *PCV2*, *A. pleuropneumoniae* et *M. hyopneumoniae* (16, 19). Les agents pathogènes « secondaires » les plus fréquemment retrouvés dans le PRDC sont *S. suis*, *M. hyorhinis*, *G. parasuis*, *A. suis* et *P. multocida* (14, 18, 20).

De plus, l'observation d'un nombre élevé de pathogènes chez un animal rend difficile la compréhension du rôle de chacun de ces pathogènes dans l'induction des maladies respiratoires (20). L'interaction entre ces micro-organismes ainsi que la réponse immunitaire de l'hôte devient complexe et n'est pas toujours très bien comprise (20).

4.2 Co-infection entre *S. suis* et virus

a. *PRRSV*

L'interaction entre *S. suis* et *PRRSV* est l'une des interactions qui a été la plus étudiée. Le *PRRSV* (virus à ARN) est un micro-organisme important dans les maladies respiratoires porcines induisant une pneumonie sévère, une réduction des performances zoonotiques et des avortements (13, 181). Bien que cette infection présente une morbidité élevée, mais une faible mortalité, l'association d'autres pathogènes augmentent la gravité de la maladie induite par ce virus (13). Il est également fréquemment rencontré dans les élevages en association avec *S. suis* (13, 181). De plus, le *PRRSV* peut induire : la lyse cellulaire, l'apoptose, le changement fonctionnel des macrophages alvéolaires et intravasculaires, induire des dommages dans l'appareil muco-ciliaire, des changements dans les sous-populations de lymphocytes T entraînant une sensibilité augmentée aux maladies bactériennes secondaires (180).

Il a été observé que les DC porcines pré-infectées par le *PRRSV*, semble diminuer l'internalisation de *S. suis* et induire la production à la hausse des cytokines pro-inflammatoires suivantes : IL-6, TNF- α et CCL5, augmentant ainsi la réponse inflammatoire (13). L'augmentation de la chimiokine

CCL5 dans le modèle de co-infection pourrait améliorer le recrutement des cellules immunitaires entraînant une production de cytokines pro-inflammatoires plus importante (mécanisme de rétroaction positive) (13). L'étude de Li et *al.* (181), a mis en évidence *in vitro* que la pré-infection des macrophages alvéolaires porcins par *PRRSV* puis infectés par *S. suis*, pouvait induire une augmentation du taux des cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires telles que : IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, CCL4 et TNF- α , comparé à une infection par *S. suis* seul. L'augmentation des cytokines pro-inflammatoires pourrait conduire à une réponse inflammatoire exacerbée et incontrôlée (181). Cela pourrait expliquer les lésions tissulaires plus graves (voir figure n°9) et le taux de mortalité augmentée observé chez un modèle porc pré-infecté par *PRRSV* puis infecté par *S. suis* (181).

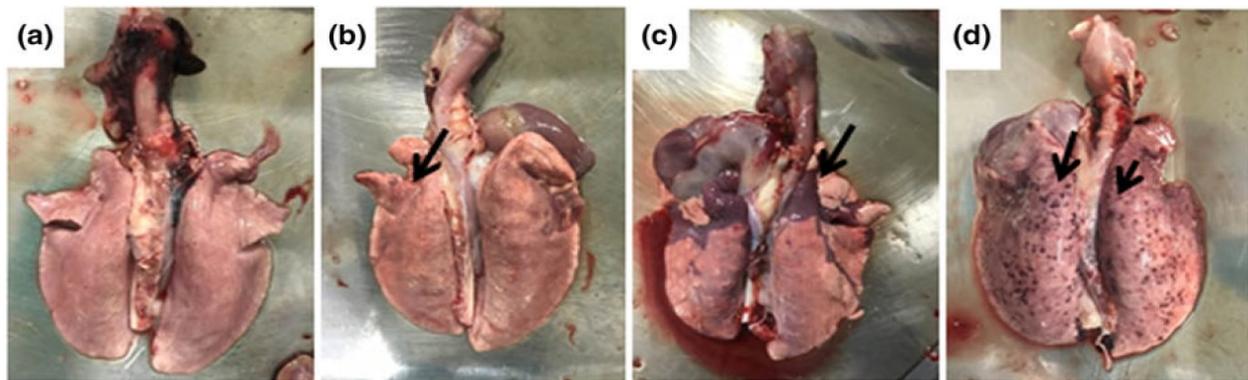


Figure 9 : Observation pathologique des poumons de porcs infectés par *PRRSV* seul, *S. suis* seul et co-infectés par *PRRSV-S. suis*. (a) : poumon normal dans le groupe témoin. (b) : atrophie lobaire dans le groupe infecté par *PRRSV*. (c) : consolidation pulmonaire dans le groupe infecté par *S. suis*. (d) : hémorragie pulmonaire dans le groupe pré-infecté par le *PRRSV* puis infecté par *S. suis* (Li et *al.*, 2018)

La pré-infection des cochettes par le *PRRSV in utero*, puis l'infection des porcelets avec *S. suis* à 5 jours de vies, a montré une augmentation de la mortalité des porcelets et une augmentation des infections au niveau des articulations et du cerveau comparé aux groupes des porcelets seulement infectés avec la bactérie seule ou le virus seul. Une infection à *PRRSV* rend les porcelets plus sensibles aux infections bactériennes secondaires (182). Il a été montré que l'administration intranasale d'un vaccin « vivant » contre le *PRRSV* peut prédisposer les porcs à une infection à *S. suis*. De plus, dans ce modèle d'infection, *S. suis* a seulement été récupéré dans les poumons des porcs pré-infectés par le *PRRSV* puis infectés par *S. suis* (183). Une autre étude met en évidence

que lorsque les porcs ont d'abord été infectés avec un cocktail bactérien de *S. suis*, *A. suis* et *G. parasuis* puis infectés avec des souches de *PRRSV* (de virulences différentes), le taux de cytokines retrouvé dans le sérum était plus faible que dans les autres groupes. Cependant, la sévérité des lésions macroscopiques et microscopiques associées aux bactéries, a été augmentée dans les groupes pré-infectés par le cocktail bactérien puis infectés avec la souche *PRRSV*, hautement pathogène (184). Récemment, il a été montré que la pré-infection de *S. suis* sérotype 2 chez des porcs pouvait augmenter la pathogénèse d'une souche asiatique de *PRRSV* non mortelle pour les porcs. En effet, dans les groupes pré-infectés par *S. suis* puis infectés par le *PRRSV*, il est observé une augmentation de la morbidité et mortalité des porcs avec une réponse inflammatoire et des lésions tissulaires plus importantes (185). Enfin, l'étude de Xu et *al.* (186), montre l'augmentation des symptômes cliniques des porcs infectés d'abord avec une souche de *PRRSV* (faiblement virulente) puis infectés avec une souche de *S. suis* sérotype 7 (faiblement virulente). En effet, les porcs pré-infectés par le *PRRSV* puis infectés par *S. suis*, présentaient une atteinte de plusieurs organes comme les poumons, les ganglions lymphatiques et le cerveau ce qui a augmenté la mortalité des porcelets.

b. SIV

Le *SIV* (virus de la grippe porcine) peut se propager dans les bronches et bronchioles provoquant la perte des cils, l'extrusion du mucus, l'exsudation de neutrophiles et de macrophages et la nécrose de l'épithélium des voies respiratoires (180). Il existe trois sous-types de *SIV* : *H1N1*, *H3N2* et *H1N2* avec le sous-type *H1N1* le plus prédominant. Le virus se multiplie principalement dans les cellules épithéliales du tractus respiratoires et dans les poumons (187).

Il a été montré que l'acide sialique retrouvée dans la CPS de *S. suis* sérotypes 2 et 14 pouvaient interagir avec les virions libres du *swH1N1* (14). Il est également observé que les cellules épithéliales trachéales de porc pré-infectées avec *swH1N1* augmentait la capacité d'adhésion et d'internalisation de *S. suis* et augmentait la sécrétion des cytokines IL-8 et TNF- α (14). *S. suis* n'est pas un pathogène pulmonaire primaire, mais une augmentation de la production des médiateurs de l'inflammation pourrait contribuer à la pathogénèse de *S. suis* ainsi que celle de *swH1N1* (14). Un modèle d'infection porcine infecté d'abord avec la souche *H1N1* puis infecté avec *S. suis* a révélé que la « co-infection » intensifiait les signes cliniques. De plus, l'analyse génétique des

poumons (collectés après pré-infection par *H1N1* puis infection par *S. suis*), à l'aide de puce à ADN « porcine », a révélé une intensification des réponses inflammatoires et apoptotiques. En effet, l'expression des gènes impliqués dans la voie de signalisation TLR (CD14, TLR4, MyD88) et l'expression des cytokines (CCL3, CCR1, CXCR4, CXC3CL1, IL-6 et IL-17) ont été augmentées. L'expression des gènes impliqués dans la voie de NADPH oxydase (impliquée dans la production de ROS) et dans la voie de l'apoptose (caspases, superfamille TNFR, BCL2...) ont également été augmentées (187). Une autre étude de l'analyse génétique, à l'aide de puce à ADN, de cellules épithéliales porcines pré-infectées avec le *SIV H1N1* puis infectées avec *S. suis* a été réalisée. Il a été montré que l'expression des gènes impliqués dans l'inflammation (IL-6, IL-8, CCL5, CCL2 et VCAM-1) et impliqués dans le métabolisme des lipides (COX-2), jouant un rôle dans l'inflammation, ont été augmentés dans le groupe « co-infection » comparé aux autres groupes (188). Une étude se servant d'un modèle *ex vivo* PCLS (« porcine precision-cut lung slice »), a mis en évidence que la pré-infection du modèle par un virus *H3N2* favorise l'adhérence et la colonisation d'une souche de *S. suis* encapsulée. De plus, les cellules « co-infectées » présentaient des dommages tissulaires importants et une activité ciliaire réduite (dû au *SIV*) augmentant ainsi l'invasion de *S. suis* (189). Récemment, une autre étude a montré que la pré-infection par le *SIV* de cellules épithéliales respiratoires porcines primaires différenciées sous interface air-liquide (ALI) augmente l'adhésion et l'invasion d'une souche de *S. suis* déficiente en suilysine ce qui pourrait expliquer la capacité de ces souches à provoquer des infections cliniques (190).

c. PCV2

Le circovirus porcine (*PCV*) est un virus à ADN simple brin circulaire retrouvé chez les porcs. Actuellement, il existe quatre types de *PCV* : *PCV1*, *PCV2*, *PCV3* et *PCV4*. Le *PCV1* est présent chez les porcs sauvages et domestiques, mais il est considéré comme non pathogène (191). En revanche, le *PCV2* est le plus étudié et est le principal agent induisant la maladie associée au circovirus porcine (*PCVAD*) qui se manifeste par un syndrome de dépérissement multisystémique post-sevrage (« postweaning multisystemic wasting syndrome » ou *PMWS*), des troubles de la reproduction et des signes respiratoires (192, 193). Le séquençage métagénomique sur des échantillons de tissu de porcs malades (atteints de myocardite et d'inflammation multisystémique) a permis d'identifier le *PCV3* mais son rôle en tant qu'agent pathogène reste

controversé (191). Le *PCV4* a été identifié très récemment, également à l'aide du séquençage chez des porcs malades dans la province du Hunan, en Chine (191). Il a été détecté dans les troupeaux porcins des cas de co-infection : *PCV2* et *S. suis* (192).

Dans un modèle de barrière épithéliale constitué de cellules STEC, il a été montré que le *PCV2* endommageait la barrière épithéliale en augmentant sa perméabilité *via* une perturbation de l'assemblage des jonctions serrées en activant la voie JNK/MAPK, favorisant ainsi la translocation de *S. suis* à travers cette barrière épithéliale. Cependant, la pré-infection de *PCV2* ne semblait pas augmenter l'adhésion et l'invasion de *S. suis* aux cellules STEC (192). Enfin, une étude a mis en évidence *in vivo* et *in vitro* que la pré-infection de *PCV2* permettrait d'augmenter la pathogénèse de *S. suis*. En effet, il a été montré que la « co-infection » potentialise la sévérité de l'infection et induit des lésions tissulaires plus importantes chez les porcelets. Après stimulation de PBMC, l'analyse par RT-qPCR a permis de montrer une augmentation importante des cytokines inflammatoires (IL-6, IL-8, IL-10 et TNF- α) dans les groupes pré-infectés par *PCV2* puis infectés par *S. suis*. Dans les groupes pré-infectés par *PCV2* puis infectés par *S. suis*, les taux des récepteurs CD4 et CD8 (à la surface des lymphocytes T) et du CMH-II étaient plus bas que dans les autres groupes signifiant que la « co-infection » altérerait la présentation des antigènes (193).

4.3 Co-infection entre *S. suis* et bactéries

Une étude réalisée en élevage en Ontario, a mis en avant la prévalence de *S. suis* chez des animaux cliniquement sains en co-infection avec d'autres bactéries (194). Il a été montré que tous les troupeaux étudiés étaient porteurs de *S. suis* sérotype 2 et 1/2 grâce à la détection par PCR du gène *gdh* et que *S. suis* était fréquemment retrouvé en association avec *G. parasuis* et *A. pleuropneumoniae* (194).

a. *A. pleuropneumoniae*

La bactérie *A. pleuropneumoniae* est l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine et est capable de persister dans les cryptes amygdaliennes et dans les poumons nécrotiques (195). Il a été décrit chez *A. pleuropneumoniae* la présence de quatre exotoxines (ApxI, ApxII, ApxIII et ApxIV) qui induisent un état nécrotique et hémorragique caractéristique. La présence d'une capsule permet également à cette bactérie d'échapper à la phagocytose (180, 195).

Une étude s'est intéressée à la formation de biofilm mixte contenant *S. suis* et *A. pleuropneumoniae* (196). Il a été montré que la co-culture dans les biofilms, peut entraîner une augmentation de la résistance aux antibiotiques et une augmentation de l'expression des gènes de virulence pour *S. suis* et *A. pleuropneumoniae*. En effet, *S. suis* favoriserait la croissance de *A. pleuropneumoniae* en conditions hostiles. Dans la culture mixte, il est observé l'augmentation de l'expression des gènes de virulence de *A. pleuropneumoniae* codant pour une exotoxine, des gènes impliqués dans l'absorption du fer et la formation de biofilm ainsi que des gènes de virulence de *S. suis* codant pour la capsule, la muramidase et la suilysine (196).

b. *G. parasuis*

Les bactéries *S. suis* et *G. parasuis* sont retrouvées chez des animaux cliniquement sains et plus précisément au niveau des voies respiratoires supérieures des porcs (8). Cependant, elles sont également responsables de maladies fréquemment retrouvées chez les porcs telles que la septicémie, la polysérose, la méningite et parfois la pneumonie (8, 20). *G. parasuis* est également l'agent initiateur de la maladie de Glässer dans laquelle il est retrouvé une forte induction des médiateurs de l'inflammation (20).

Il n'a été observé aucune augmentation significative de l'adhésion et de l'invasion de *S. suis* et *G. parasuis* co-incubés ou pré-incubés avec des cellules épithéliales trachéales de porc ce qui pourrait supposer que ces bactéries utilisent des récepteurs différents (8). De plus, lors de la co-infection de la souche de *S. suis* de type ST1 P1/7 (virulente) et de la souche virulente ou faiblement virulente de *G. parasuis*, une augmentation des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-8 favorisant une inflammation locale, a été observée (8).

c. *B. bronchiseptica*

B. bronchiseptica est une bactérie Gram négative qui est présente chez de nombreux hôtes comme les porcs, les animaux sauvages/domestiques et l'humain (197). *B. bronchiseptica* est omniprésente dans la population porcine induisant des rhinites atrophiques et est fréquemment isolée en association avec d'autres pathogènes dans des cas de pneumonie (197). Les facteurs de virulence de cet agent pathogène sont l'hémagglutinine filamenteuse, les fimbriae, la pertactine et des toxines comme la toxine dermonécrotique (DNT) ou la cytotoxine trachéale (TCT) (197).

Récemment, une étude a mis en évidence que la pré-infection par *B. bronchiseptica* favoriserait l'adhésion et la colonisation de *S. suis* au niveau de la barrière épithéliale (modèle *ex vivo* PCLS) (197), endommageant les cellules à l'aide de ses toxines. Une augmentation de la cytotoxicité des cellules a également été observée *via* l'action de la suilysine de *S. suis*. Cependant, cette étude n'a pas réussi à évaluer si la translocation de *S. suis* à travers la barrière était améliorée lorsque le modèle était pré-infecté avec *B. bronchiseptica* (197).

4.4 Co-infection entre *S. suis*, *M. hyopneumoniae* et/ou *M. hyorhinis*

Les interactions entre *S. suis* et les mycoplasmes porcins, tels que *M. hyopneumoniae* et *M. hyorhinis*, ainsi que les réponses immunitaires induites n'ont fait l'objet d'aucune étude *in vitro* et *in vivo*. Les seules études présentes dans la littérature rapportent les fréquences de ces co-infections dans les troupeaux porcins.

Il a été montré par PCR dans une étude effectuée sur 125 troupeaux de porc en France, la présence de *P. multocida* en association avec *S. suis* dans les poumons de porc et également la présence de *S. suis* en association avec *A. pleuropneumoniae* (198). *P. multocida* a également été détecté en association avec *M. hyopneumoniae* (198). L'étude montre également une corrélation entre les lésions pulmonaires de type pneumonie et la présence de *M. hyopneumoniae*, ainsi que la corrélation entre la présence de pleurésie, d'abcès et de nodules dans les poumons avec la présence de *S. suis* et *A. pleuropneumoniae*. Cette étude suggère que chez les porcs des interactions dynamiques et complexes de plusieurs agents infectieux pourraient être retrouvés (198). Une autre étude mettant en avant la présence d'*A. pleuropneumoniae* et *M. hyopneumoniae* ainsi que des agents pathogènes tels que *P. multocida* et *S. suis* dans les troupeaux présentant des lésions de type pleurésie lors de l'abattage, a été rapportée (18). Des anticorps dirigés contre *A. pleuropneumoniae* et *P. multocida* ainsi que des anticorps dirigés contre *M. hyopneumoniae* et *S. suis* ont été détectés, mais à des concentrations basses, ce qui suggère que leur influence dans les pleurésies étaient moindres (18).

4.5 Co-infection entre *M. hyopneumoniae* et virus

a. PRRSV

L'association entre le PRRSV et *M. hyopneumoniae* a également été étudiée. En effet, ces deux pathogènes porcins sont souvent retrouvés en association dans le PRDC (20, 199). L'augmentation de la gravité et la durée de la pneumonie, induite au départ par le PRRSV, a été observée chez des porcs infectés également avec *M. hyopneumoniae* (20, 199).

Lors d'une co-infection *in vivo* du PRRSV et *M. hyopneumoniae* chez les porcs, une augmentation de la production des médiateurs de l'inflammation tels que l'IL-1 α , l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12 et le TNF- α a été observée. Une augmentation de la synthèse de ces médiateurs par les macrophages alvéolaires porcins a également été détectée, ce qui suggère que les deux pathogènes induisent une réponse inflammatoire importante dans des cas de pneumonies chroniques (200). Lorsque des anneaux trachéaux ont été infectés avec *M. hyopneumoniae*, puis le surnageant a été transféré sur des PAMs eux-mêmes infectés avec le PRRSV, il a été montré que la synthèse d'ARNm codant des cytokines inflammatoires (IL-1 α , IL-1 β , IL-8 et TNF) était augmentée (201). Cependant, une étude *in vivo* met en évidence une augmentation des niveaux d'expression de l'IL-10 et l'IL-12 (cytokines anti-inflammatoires) dans les voies respiratoires des porcs infectés par le PRRSV et/ou *M. hyopneumoniae* suggérant le maintien de l'infection chez le porc (202). Il a été mis en évidence *in vitro*, que la pré-infection par le PRRSV puis l'infection par *M. hyopneumoniae* induisait une régulation à la hausse de nombreux gènes retrouvés chez les macrophages alvéolaires porcins (199). C'est le cas de certains gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 α , l'IL-1 β et les chimiokines CCL2, CCL4 et CXCL20 (199). Les deux micro-organismes en « co-infection » ont été reconnus par les récepteurs TLR et NLR car les gènes codant pour les facteurs NF- $\kappa\beta$, IRF3 et IRF7, qui sont impliqués dans les voies de signalisation des réponses inflammatoires et le récepteur TLR2 et co-récepteur CD14 ont été fortement induits (199). Le PRRSV et *M. hyopneumoniae* peuvent engendrer une apoptose cellulaire. Des gènes impliqués dans les mécanismes d'apoptose ont alors été analysés au cours de la pré-infection par le PRRSV puis l'infection par *M. hyopneumoniae* des macrophages alvéolaires (199). Une augmentation de l'expression des gènes codant pour la caspase 8 et la caspase 10 a été observée.

Cependant, des gènes impliqués dans les mécanismes anti-apoptotiques ont également été surexprimés, suggérant un retard dans l'apoptose, ce qui permettrait une réplication plus importante du virus (199). Une étude *in vivo* a mis en évidence que *M. hyopneumoniae* a la capacité de potentialiser une infection virale à *PRRS* et que le virus *PRRS* semble augmenter la sévérité de la pneumonie induite par *M. hyopneumoniae* (203).

b. SIV

La pré-infection des porcs par *M. hyopneumoniae* suivie d'une infection par une souche de *SIV* de type *H1N1* a permis de mettre en évidence des effets synergiques, avec une augmentation des signes cliniques et des lésions pulmonaires (204). En revanche, il n'a pas été observé d'effet synergique chez des porcs pré-infectés par *M. hyopneumoniae* et puis par *H1N2* (204). La pré-infection des porcs par *M. hyopneumoniae* suivie de *H1N1* n'a pas engendré une perte de poids journalière plus importante que lorsque le virus *H1N1* était inoculé seul, mais cette pré-infection a prolongé dans le temps la perte de poids des porcs (205). Le virus était toujours détectable dans les poumons 7 jours après l'inoculation suggérant que *M. hyopneumoniae* pourrait altérer ou retarder l'élimination virale dans les poumons (205). Le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-6 ont été détectés dans le BALF des porcs des groupes pré-infectés par *M. hyopneumoniae* puis infectés par *H1N1* après 5 jours d'inoculation suggérant une réaction précoce et également plus importante que dans le groupe *H1N1* seul dans la mesure où le TNF- α était absent (205). Une étude *in vivo* a mis en évidence que les porcs pré-infectés par *M. hyopneumoniae* puis infectés par le *SIV H1N1* présentaient une inflammation et un stress oxydatif importants (206). Les porcs « co-infectés » ayant reçu une alimentation riche en anti-oxydants ont présenté moins de ROM (métabolites réactifs de l'oxygène), mais sans que cela réduise les lésions pulmonaires, comparé aux porcs « co-infectés » ayant reçu une alimentation pauvre en anti-oxydants (206).

c. PCV2

La morbidité et la mortalité du PCVAD augmentent lorsque les troupeaux de porcs infectés par le *PCV2* subissent des infections secondaires ou des infections concomitantes avec d'autres agents pathogènes comme *Mycoplasma hyopneumoniae* (192). Une étude a permis de mettre en évidence par PCR la présence concomitante de *PCV3* et *M. hyopneumoniae* (207).

Le PCV2 seul ne peut pas induire la totalité des signes cliniques et des lésions associés au PMWS (208). Dans un modèle expérimental de pré-infection de porcs par *M. hyopneumoniae* suivie d'une infection avec le PCV2, il a été mis en évidence une augmentation de la gravité de la pneumonie et du PMWS (208). En effet, aucun porc inoculé seulement avec le PCV2 n'a montré de signe clinique typique du PMWS alors que les porcs doublement infectés présentaient une réponse en anticorps sériques dirigés contre *M. hyopneumoniae* ou PCV2 plus élevée (208). Ce modèle a permis d'émettre l'hypothèse que les lésions induites par le mycoplasme créent un environnement idéal pour une infection à PCV2 (208). Une étude *in vitro*, a mis en évidence que la pré-infection des cellules PK-15 par *M. hyopneumoniae* peut améliorer la réplication de PCV2 en émettant l'hypothèse que la protéine de choc thermique Hsp70 de *M. hyopneumoniae* pourrait augmenter la réplication du virus (209).

4.6 Co-infection entre *M. hyorhinis* et virus

a. PRRSV

Une étude sérologique de prévalence a permis de mettre en évidence dans les troupeaux de porc, ayant un passé de PRDC, une corrélation entre le PRRSV et *M. hyorhinis* (16). Cependant, il n'a pas été montré de corrélation entre le PRRSV et *M. hyopneumoniae* dans cette étude. Ces résultats pourraient suggérer que les porcs infectés au préalable par le PRRSV seraient plus susceptibles à être infecté par *M. hyorhinis* (16). Il a également été montré *in vivo* que la co-infection des porcs par *M. hyorhinis* et le PRRSV induit des lésions pulmonaires plus sévères que lorsque les agents pathogènes sont retrouvés seuls (16).

b. PCV2

Un modèle d'infection expérimental de porcelets a été réalisé pour étudier l'interaction entre le PCV2 et *M. hyorhinis*. Les porcelets infectés avec le PCV2 seul ne présentaient aucun signe clinique. En revanche, les porcelets infectés simultanément par *M. hyorhinis* et le PCV2 présentaient des signes cliniques de type dermatite porcine, syndrome de néphropathie et des lésions cutanées (210). Ces porcelets présentaient également un taux d'anticorps dirigés contre *M. hyorhinis* plus élevé que chez les porcelets inoculés uniquement avec *M. hyorhinis*. Les niveaux d'anticorps dirigés contre le PCV2 étaient aussi significativement plus élevés chez les porcelets

pré-infectés avec *M. hyorhinis* puis infectés par le PCV2, ainsi que chez les porcelets infectés simultanément par les deux agents pathogènes. Il a également été observé dans le groupe simultanément infecté par *M. hyorhinis* et PCV2, une infiltration d'éosinophiles et de granulocytes dans les ganglions lymphatiques ainsi que la présence de lésions pulmonaires plus sévères que chez les porcelets infectés par *M. hyorhinis* ou le PCV2 seuls, suggérant qu'une double infection des agents pathogènes peut être synergique dans l'induction des signes cliniques et dans l'induction d'une réponse inflammatoire (210). En effet, il a été observé la plus forte concentration en IL-2 et IL-6 dans le groupe des porcelets co-infectés par *M. hyorhinis* et le PCV2 ainsi que dans le groupe des porcelets inoculés au préalable avec *M. hyorhinis* puis avec le PCV2. De plus, le taux de TNF- α était le plus élevé dans le groupe de porcelets co-infectés par *M. hyorhinis* et le PCV2 (210).

4.7 Co-infection entre *M. hyopneumoniae* et autres bactéries

M. hyopneumoniae est capable d'induire une perte de la fonction mucociliaire, une ciliostase et une réduction des cils présents dans le tractus respiratoire des porcs (21, 23, 116). Il a été suggéré que cette diminution d'activité ciliaire pouvait faciliter la colonisation des agents pathogènes « secondaires » retrouvés chez le porc comme *S. suis*, *P. multocida*, *G. parasuis* et entraîner une plus grande gravité des lésions pulmonaires (20, 116). À la suite d'une infection à *M. hyopneumoniae*, il est observé une induction des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF. Cette production de cytokine augmente l'inflammation dans les poumons ce qui pourrait également faciliter la colonisation d'autres pathogènes. De plus, la gravité des pneumonies ou des maladies du PRDC, induites par une infection à *M. hyopneumoniae*, pourraient être augmentées en association avec d'autres pathogènes (20).

a. *P. multocida*

La bactérie *P. multocida* type A seule n'est pas suffisante pour induire une pneumonie chez le porc, mais elle représente l'un des agents « secondaires » retrouvés lors d'une infection à *M. hyopneumoniae* (20, 211). Une variété de glycoconjugués sont retrouvés à la surface des cellules épithéliales présentes dans le tractus respiratoire et servent de récepteurs pour des micro-organismes (211). Il a été observé chez des porcelets expérimentalement infectés par *M.*

hyopneumoniae, une augmentation des glycoconjugués avec les résidus L-fucose à la surface des cellules bronchiques et bronchiolaires (211). L'utilisation d'une technique de superposition bactérienne sur des coupes de poumons a permis de mettre en évidence que huit souches de *P. multocida* type A présentaient une forte affinité pour les résidus L-fucose montrant que cette bactérie pourrait utiliser ces composés comme récepteur. Il est suggéré qu'une infection à *M. hyopneumoniae* induisant l'augmentation des glycoconjugués L-fucose dans les poumons pourrait ainsi faciliter une infection secondaire à *P. multocida* type A (211).

b. *A. pleuropneumoniae*

Il a été décrit que *M. hyopneumoniae* et *A. pleuropneumoniae* seuls ou en association peuvent induire de graves troubles respiratoires chez le porc. Les porcs infectés expérimentalement d'abord avec *A. pleuropneumoniae* suivi de *M. hyopneumoniae* ou simultanément avec les deux pathogènes ont montré des signes cliniques et des lésions pulmonaires sévères (195). Cependant, les porcs pré-infectés par *M. hyopneumoniae* puis infectés par *A. pleuropneumoniae* ont montré des signes cliniques comme la toux, l'hyperthermie et des lésions pulmonaires beaucoup plus grave que dans les groupes de porcs infectés par *M. hyopneumoniae* ou par *A. pleuropneumoniae* seuls. *M. hyopneumoniae* pourrait donc potentialiser la gravité des lésions pulmonaires induites par *A. pleuropneumoniae* (195).

4.8 Co-infection entre *M. hyorhinis* et autres bactéries

a. *M. hyopneumoniae*

Le rôle joué par *M. hyorhinis* en absence de *M. hyopneumoniae* dans le développement de la pneumonie est controversé (17). L'inoculation des porcs par *M. hyorhinis* seul, induit des lésions macroscopiques spécifiques : des polysérosites telles que la pleurésie, la péricardite et la péritonite (17). Il a également été observé chez un seul porc une pneumonie légère suggérant que *M. hyorhinis* seul présente une faible capacité à induire des pneumonies (17). La concentration d'haptoglobine, qui est induite par exemple par la cytokine pro-inflammatoire IL-6, est augmentée dans les groupes de porcs pré-infectés par *M. hyopneumoniae* puis infectés par *M. hyorhinis* induisant potentiellement une réponse inflammatoire et pourrait expliquer la perte d'appétit des porcs et donc la diminution du gain de poids journaliers (17). Cependant, cette

réponse inflammatoire est plus tardive que dans le groupe des porcs infectés uniquement avec *M. hyorhinis*. Le statut inflammatoire tardif des porcs pré-infectés par *M. hyopneumoniae* puis infectés par *M. hyorhinis* pourrait être dû à la propagation et/ou la persistance de *M. hyorhinis*. Cette étude met en évidence que *M. hyorhinis* en « co-infection » n'augmente pas la gravité des pneumonies induites par *M. hyopneumoniae*, mais altère la réponse du système immunitaire (17).

b. *G. parasuis*

La maladie de Glässer induite par une infection à *G. parasuis* présente les mêmes lésions qu'une infection induite par *M. hyorhinis*, telles que des polysérosites fibrineuses (20, 212). De plus, dans les élevages, l'association de *M. hyorhinis* et *G. parasuis* a souvent été rapportée (212). Une étude montrant les fréquences de détection de *M. hyorhinis* et *G. parasuis* sur un total de 95 porcs atteints de polysérosites a été publiée : 18 porcs hébergeaient à la fois *M. hyorhinis* et *G. parasuis* (212). À la suite de tests statistiques, une corrélation significative a été montrée entre la présence de *PRRSV* et *G. parasuis* ainsi qu'entre la présence de *PRRSV* et *M. hyorhinis*. L'étude suggère alors qu'une infection simultanée de *PRRSV* et *G. parasuis* ou de *PRRSV* et *M. hyorhinis* est plus fréquente qu'une infection avec seulement l'un des agents pathogènes (212).

III. Article scientifique

Interactions of *Mycoplasma hyopneumoniae* and/or *Mycoplasma hyorhinis* with *Streptococcus suis* serotype 2 using *in vitro* co-infection models with swine cells

Héloïse Pageaut¹, Sonia Lacouture¹, Mélanie Lehoux¹, Corinne Marois-Créhan², Mariela Segura¹ and Marcelo Gottschalk^{1,*}

¹Swine and Poultry Infectious Diseases Research Center (CRIPA) and Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses en Production Animale, Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, 3200 Sicotte St., Saint-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada; heloise.pageaut@umontreal.ca (H.P.), sonia.lacouture@umontreal.ca (S.L.), melanie.lehoux@umontreal.ca (M.L.), mariela.segura@umontreal.ca (M.S.)

²French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES), Ploufragan-Plouzané-Niort Laboratory, Mycoplasma Bacteriology and Antimicrobial Resistance Unit, 22 440 Ploufragan, France; Corinne.MAROIS@anses.fr (C. M.-C.)

*Correspondance: marcelo.gottschalk@umontreal.ca (M.G.)

En préparation pour soumission dans le journal Pathogens

Rôle de la candidate dans la conception de l'article :

Je suis la première autrice de l'article. J'ai participé activement aux expériences, à l'analyse des résultats et à l'écriture de l'article.

Abstract

Bacterial and/or viral co-infections are very common in swine production and cause severe economic losses. *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis* and *Streptococcus suis* are pathogenic bacteria that may be found simultaneously in the respiratory tract of pigs. In the present study, the interactions of *S. suis* with epithelial and phagocytic cells in the presence or absence of a pre-infection with *M. hyopneumoniae* and/or *M. hyorhinis* were studied. Results showed relatively limited interactions between the pathogens studied. A previous infection with one or both mycoplasmas did not influence the adhesion and invasion properties of *S. suis* to epithelial cells or its resistance to phagocytosis (as well as its intracellular survival) by macrophages and dendritic cells. The most important effect observed during the co-infection was a clear increment in toxicity for the cells. An increase in the relative expression of inflammatory mediators was also observed; however, this was the consequence of an additive effect due to the presence of different pathogens rather than a synergic effect. It may be hypothesized that, if one or both mycoplasmas are present along with *S. suis* in the lower respiratory tract at the same time, increased damage to epithelial cells and phagocytes, as well as an increased release of inflammatory mediators may eventually enhance the invasive properties of *S. suis*. However, more studies should be carried out to confirm this hypothesis.

Keywords: *Streptococcus suis*; *Mycoplasma hyopneumoniae*; *Mycoplasma hyorhinis*; co-infections; *in vitro*; toxicity, inflammation; alveolar macrophages; dendritic cells; tracheal epithelial cells

1. Introduction

Worldwide, *Streptococcus suis* infections worldwide spread and are one of the most important causes of post-weaning mortality in pigs (1). The infections caused by this pathogen do not only result in severe economic losses but also raise animal welfare concerns. In addition, *S. suis*-associated diseases are difficult to control (2). Even if the carriage rate of *S. suis* in clinically healthy animals is high, the incidence of disease varies from period to period and is usually less than 5% (3). However, this is usually the case when antimicrobials are used (if allowed) as

prophylactic/metaphylactic measures, otherwise the mortality may raise at 20%. One of the main problems is that antimicrobials that have efficacy are those the industry is trying to reduce given their importance in both human and veterinary medicine.

Although highly virulent strains of *S. suis* have been reported, mainly belonging to serotype 2 (4), fully defining what constitutes a “*S. suis*-associated disease” is complex. Indeed, the development of clinical signs may also depend on external factors, such as the environment and management practices (2, 5). *S. suis* is a normal inhabitant of the upper respiratory tract, and the presence of virulent strains alone does not guarantee the development of clinical signs, while the latter may appear in the absence of highly virulent strains. The conditions permitting certain serotypes/strains of *S. suis* to cross the mucosal barriers, disseminate in the bloodstream and cause systemic infections are not fully understood (1). A plethora of potential virulence factors has been described, although, for many, there is still debate on their actual role in the pathogenesis of diseases linked to *S. suis* infection (4, 5). It is believed that, under some circumstances, *S. suis* takes advantage of concomitant or previous infections caused by other pathogens. However, few studies have clearly demonstrated the role co-infections in the development of *S. suis*-associated diseases (5). Among them, only co-infections with either the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) and the swine influenza virus (SIV) have been shown to influence the presence of *S. suis*-associated diseases (5, 6). In most other cases, previously reported “co-infection cases” were, in fact, characterized by the simultaneous but likely independent presence of *S. suis* and other pathogens in lungs of swine collected at abattoirs (5).

Although many studies have addressed the role of *S. suis* in respiratory diseases, the route of entry of a pathogen should be differentiated from the pathology it induces. It is widely accepted that the main route of infection for systemic *S. suis* disease is the respiratory route, and airborne transmission of the infection has clearly been demonstrated (1). Infectious agents involved in porcine respiratory disease complex (PRDC) are classified into primary, secondary or opportunistic pathogens. As a respiratory pathogen, *S. suis* is usually considered a secondary/opportunistic agent (5, 7). As shown with PRRSv and SIV, interactions with respiratory

viruses may influence the invasive properties of *S. suis* and increase the severity of *S. suis* systemic-associated diseases (5).

Mycoplasma hyopneumoniae is the etiological agent of enzootic pneumonia in growing and late growing pigs. The disease is characterized by increased morbidity and decreased daily weight gain in pigs, resulting in economic losses (8, 9). This bacterium is also one of the initiating agents of PRDC causing cough, fever, loss of weight and appetite, lethargy and sometimes death especially in cases of superinfections with other pathogens (9, 10). *Mycoplasma hyorhinis* is responsible for inflammation of the serosa in post-weaned piglets leading to pericarditis, pleurisy, arthritis, and peritonitis (11, 12). Disease induced by *M. hyorhinis* infection can lead to high morbidity, lameness, and weight loss in the herd, resulting in significant economic losses. *M. hyorhinis* is often found in pneumonia in the presence of *M. hyopneumoniae*, but its the role as a primary agent of pneumonia remains controversial (13). Cases of co-infection of *M. hyopneumoniae* with PRRSv, porcine circovirus type 2 (PCV2), SIV or *A. pleuropneumoniae* as well as coinfections with *M. hyorhinis* and PRRSv, PCV2 or *M. hyopneumoniae* have been described and shown to often lead to increased clinical signs and inflammatory response (7). The simultaneous isolation from pericardial tissue of *S. suis* and both these mycoplasmas has been described (14). In addition, there is one report indicating a possible correlation between the presence of *S. suis* and *M. hyopneumoniae* in the lungs (15) while a second study described the simultaneous detection of *M. hyorhinis* and *S. suis* from cases of polyserositis (16). However, the interactions between *M. hyopneumoniae* and/or *M. hyorhinis* with *S. suis* have never been studied.

All three pathogenic bacteria are present in the respiratory tract of pigs and may induce an inflammatory response in the host. It is therefore interesting to study their possible interaction and mechanisms involved in co-infections. Here, we aimed to evaluate the effect of a pre-infection with *M. hyopneumoniae* and/or *M. hyorhinis* on the interactions of *S. suis* serotype 2 with swine epithelial and phagocytic cells.

2. Materials and Methods

2.1 Bacterial strains and growth conditions

Two strains of *S. suis* serotype 2 were used in this study (Table 1). The virulent encapsulated P1/7 strain (sequence type 1), isolated in Europe and, as a control, its derived isogenic non-encapsulated mutant $\Delta cps2F$ (17). Bacteria were grown overnight on Columbia agar supplemented with 5% sheep blood (Oxoid, Burlington, ON, Canada) at 37°C under 5% CO₂. Five ml of Todd Hewitt Broth (THB; Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada) were inoculated with a few colonies of *S. suis* and incubated for 16 h at 37°C under 5% CO₂. For the final culture, ten mL of fresh medium was inoculated with 300 µL of the overnight culture and incubated at 37°C under 5% CO₂ until the exponential growth phase corresponding to an optical density of 0.6 (OD₆₀₀) was reached. The cultures were then centrifuged, and the bacterial pellets were washed twice with endotoxin (lipopolysaccharide)-free phosphate buffered saline (LPS-free PBS).

Two strains of porcine mycoplasmas were also used in this study (Table 1): *M. hyopneumoniae* strain 682 and *M. hyorhinis* strain 380, both recovered from pig lungs with macroscopic pneumonia-like lesions as described previously (18). Both strains were grown in liquid Friis medium as described (19) at 37°C, until the onset of the stationary phase of growth that is observed by the change from red to orange color of the medium using the phenol red pH indicator. Mycoplasma cultures were centrifuged at 12 000 x g for 15 minutes at 4°C. The pellets were washed twice with LPS-free PBS, then resuspended with the different cell culture media. The final concentration of both mycoplasmas was determined by quantitative-Polymerase Chain Reaction (qPCR) and confirmed by titration in Friis medium. The qPCR was performed as previously described (20) with a few modifications. Briefly, the culture was centrifuged, and the pellet resuspended in the lysis solution described by Kellog and Kwok (21). The cell lysates were prepared by incubation for 1 hour at 60°C followed by a 15-minute incubation at 95°C. The primers used are listed in Table 2. Each PCR reaction was performed using 5 µL of DNA template, 20 µL of reaction mixture containing 1 x iQ Supermix (Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA), 500 nmol L⁻¹ of primers and 300 nmol L⁻¹ of hydrolysis probes (TaqMan® Technology, Sigma-

Aldrich®, Saint-Quentin Fallavier, France). The amplification was performed with the CFX96 thermal cycler (Biorad), and the cDNA amplification program was performed as follows: a 3-minute enzyme activation step at 95°C followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds, and a 1-minute annealing/extension step at 60°C.

Table 1. List of strains used in this study

Strains	Characteristics	References
<i>S. suis</i> serotype 2		
P1/7	Virulent serotype 2 strain isolated from a case of pig meningitis in the United Kingdom	(22)
Δcps2F	Non-encapsulated isogenic mutant derived from P1/7; in frame deletion of cps2F gene	(23)
<i>Mycoplasma</i>		
<i>M. hyopneumoniae</i> 682	Strains isolated in 2016 from the same herd showing respiratory disorders	(18)
<i>M. hyorhinis</i> 380		

Table 2. List of primers and probes for qPCR of mycoplasma (20)

Gene name	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'	Probes 5'-3'
<i>p102 (M. hyopneumoniae)</i>	TAAGGGTCAAAGTCAAAGTC	AAATTTAAAAGCTGTTCAAATGC	CY5*-AACCAGTTTCCAATTCATCGCC-BHQ2§
<i>p37 (M. hyorhinis)</i>	TTCTATTTTCATCTATATTTTCGC	TCATTGACCTTGACTAACTG	TXR†-CATCCTCTTGCTTGACTACTCCTG-BHQ2§

2.2 Source of primary cells

Piglets between 5 and 8 weeks of age were used for isolation of primary cells in this study and were negative for various commonly found diseases such as PRRSv and *M. hyopneumoniae*. No endemic clinical infections caused by *S. suis* serotype 2 or *M. hyorhinis* were present in the herd of origin. All animal experiments were conducted in accordance with the ethical guidelines and policies of the Canadian Council of Animal Care and specifically approved by the Animal Welfare Committee of the University of Montreal (certificate number RECH-1570).

2.3 Cell culture and isolation of primary swine cells

The Newborn Pig Tracheal cell line (NPTr), primary pulmonary alveolar macrophages (PAMs) and primary bone marrow-derived porcine dendritic cells (BM-DC) were used for co-infection studies. NPTr cells were grown as described (24-26). Briefly, cells were grown at 37°C under 5% CO₂ in Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM; Gibco, Burlington, ON, Canada), supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (v/v) (FBS; Gibco), penicillin-streptomycin 100 U/mL and gentamicin 0.04 mg/mL (Gibco). For the experiments, cells were treated with 0.1% Trypsin in 0.03% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Gibco), suspended in fresh culture medium with antibiotics and incubated in a 24-well culture plate (Falcon, Mississauga, ON, Canada) for 24 h at 37°C under 5% CO₂. After 24 h, the cells were washed once with LPS-free PBS and the culture medium was replaced with fresh antibiotic-free culture medium. The cells were again incubated for 24 h until confluence was achieved with a final concentration of 1 x 10⁵ cells/mL.

To collect alveolar macrophages (24), three successive bronchoalveolar washes were performed with sterile LPS-free PBS in lungs of 5–8-week-old piglets without the use of antibiotics. Cells were washed twice and then frozen in liquid nitrogen with DMEM medium supplemented with 40% FBS and 20% dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) to a final concentration of 2 x 10⁷ cells/mL. To confirm the sterility of the cell harvest, PAMs were incubated for 48 h under 5% CO₂ in a Primaria 24-well plate (Falcon BD, Bedford, MA, USA). For assays, PAMs were thawed, centrifuged at 250 x g for 10 minutes at 4°C and suspended in antibiotic-free PAM medium containing DMEM, 10 % FBS, 1 % MEM Non-Essential Amino Acids Solution and 1 % HEPES (Gibco) at a concentration of 5 x 10⁵ cells/mL in a Primaria 24-well plate and incubated at 37°C under 5% CO₂.

The extraction and culture of cells from the bone marrow of pig femurs was performed as described (18, 27). Briefly, after removal of muscles, femurs were sliced into pieces and shaken in 1 L of LPS-free PBS for 2 h at room temperature. The suspension containing the bone marrow stem cells was recovered by filtration using sterile gauze and the cells were then centrifuged at 250 x g for 10 minutes at 4°C. Red blood cells lysis was performed with a kit (eBioScience, San Diego, CA, USA), then cells were washed, filtered on a 40 µm-cell strainer (Falcon), suspended at

approximately 2×10^7 cells/mL in cryopreservation solution containing 95% FBS and 5% DMSO, and stored in liquid nitrogen. For the experiments, bone marrow derived stem cells were thawed and centrifuged at $250 \times g$ for 10 minutes at 4°C . Cells were suspended in a complete medium with antibiotics containing RPMI 1640 (Gibco), 10% FBS (v/v), HEPES 10 mM, L-glutamine 2 mM (Gibco), gentamicin 0.001 mg/mL and penicillin-streptomycin 100 U/mL at a concentration of 1×10^6 cells/mL in a 6-well plate (Falcon). Porcine Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) produced in our laboratory from the CHO-K1/pGM-CSF cell line as previously described (27) was added at a 1:50 dilution to each well and the cells were incubated at 37°C under 5% CO_2 . On days 3 and 6, the culture medium was replaced with complete RPMI medium fresh with antibiotics to remove non-adherent cells. On day 8, immature BM-DCs were harvested by up and down for future experiments. The phenotype of BM-DCs was confirmed by FACS as CMH-I⁺, CMH-II⁺, SWC3⁺, CD1⁺, CD16⁺, CD14⁺, CD11R1⁻, and CD4^{a low/-} as previously described (28). This culture does not exclude the presence of other cells such as macrophages, but the culture is predominantly enriched in immature BM-DCs. Immature BM-DCs were adjusted to a concentration of 2×10^6 cells/well in a total volume of 500 μL in a 24-well plate (Falcon).

When needed, fresh or inactivated swine plasma was used. Blood from a 5-week-old piglet was also collected in heparinized tubes to avoid clotting. The blood was centrifuged, and the plasma recovered and stored at -80°C to maintain the integrity of the complement system. The plasma had a negative serological status for antibodies against *S. suis* as tested by ELISA (29). Fresh plasma and heat-inactivated plasma (30 minutes at 56°C) were used for the phagocytosis and intracellular survival experiments described below.

2.4 Pre-infection and stimulation of NPTr cells, PAMs and BM-DCs with *M. hyopneumoniae* and/or *M. hyorhinis*

To determine whether porcine mycoplasmas promote *S. suis* interactions with respiratory epithelial cells, NPTr cells were first pre-infected with *M. hyopneumoniae* and/or *M. hyorhinis* (or mock-pre-infected) under non-cytotoxic conditions as follows. NPTr were washed twice with LPS-free PBS and 1 mL of *M. hyopneumoniae* suspension of approximately 1×10^8 color-changing units

per milliliter (CCU/mL) was added to the wells. In parallel, 500 μ L of *M. hyorhinis* suspension and 500 μ L of medium without antibiotics for a final concentration in the wells of approximately 5×10^6 CCU/mL was also added to cells. For the dual infection (pre-infection with *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis*), the mycoplasma suspensions were concentrated twice and 500 μ L of *M. hyopneumoniae* was added to the cells together with 250 μ L of *M. hyorhinis* and 250 μ L of fresh antibiotic-free culture medium. The mock pre-infected control cells were given fresh culture medium without antibiotics. The cells were centrifuged for 10 minutes and then incubated for 24h at 37°C under 5% CO₂. The final concentration of *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis* was determined by qPCR and confirmed by titration in Friis medium as described above.

For pre-infection of PAMs, the culture medium was removed, and the cells were pre-infected with 1 ml of either 1×10^7 CCU/mL of *M. hyopneumoniae* or 1×10^6 CCU/mL of *M. hyorhinis* suspensions for single infections. For the double infection, the mycoplasma suspensions were concentrated twice (respectively) and 500 μ L of each strain was added to the cells. The non-pre-infected cells were given fresh culture medium without antibiotics. As for NPTr, PAMs were centrifuged and then incubated for 24 h at 37°C under 5% CO₂.

Finally, the culture medium of the BM-DCs was removed, and the cells were pre-infected with 500 μ L of either *M. hyopneumoniae* or *M. hyorhinis* suspensions in a medium without antibiotics, for a final concentration of 5×10^7 CCU/mL and 5×10^5 CCU/mL for mono-infection, respectively. For the double infection, the mycoplasma suspensions were concentrated twice and 250 μ L of each strain was added to the cells followed by 500 μ L of fresh culture medium without antibiotics. The non-pre-infected cells were given fresh culture medium without antibiotics. BM-DCs were centrifuged as described above and then incubated for 24 h at 37°C under 5% CO₂.

The final concentrations of each mycoplasma were chosen based on pre-studies to obtain the highest concentration with the lowest percentage of cytotoxicity (from 0 to 15%, depending on the cell type) after 24h of incubation using the lactate-dehydrogenase test as described below (results not shown). At the end of 24h incubation time, the concentration of both mycoplasmas either remained stable or increased, indicating that live mycoplasmas were present at the time of *S. suis* infection (Supplemental Table 1).

2.5 Adhesion to and invasion of NPTr by *S. suis*

After 24 h of pre-infection with mycoplasma (or mock pre-infected), NPTr cell culture medium was removed from the wells. The cells were then infected with either *S. suis* wild-type P1/7 strain or its unencapsulated $\Delta cps2F$ mutant (positive control) at an MOI of 5 (5×10^5 Colony Forming Units (CFU)/mL), fresh medium without antibiotics was added to the cells and the plates incubated for 2 h at 37°C under 5% CO₂. *S. suis* adhesion assay was performed as previously described (24, 25). Briefly, after the incubation time, mycoplasma or mock pre-infected cells were washed 5 times with LPS-free PBS and scraped with 1 mL of ice-cold sterile deionized water to recover adhering as well as intracellular bacteria. The bacterial suspensions were plated on Todd-Hewitt agar (THA) (Gibco) and incubated for 24 h at 37°C under 5% CO₂. The adhesion rate of *S. suis* was expressed as CFU/mL. For the *S. suis* invasion assay, cells were washed twice with LPS-free PBS. Then 1 mL of fresh culture medium with antibiotic (penicillin G 5 µg/mL and gentamicin 100 µg/mL) was added to each well and incubated for 1 h at 37°C under 5% CO₂. Wells were then washed 3 times with LPS-free PBS and the last wash was spread on THA to confirm antibiotic activity. The cells were then scraped to count the intracellular bacteria only and the number of CFU/mL of *S. suis* was determined in the same way as described above. The invasion rate of *S. suis* was also expressed as CFU/mL.

2.6 Phagocytosis and intracellular survival assay of *S. suis* by PAMs and BM-DCs

S. suis phagocytosis tests were carried out as described previously (17, 24, 28), with some modifications. *S. suis* P1/7 strain and its $\Delta cps2F$ (positive control) were pre-opsonized with 20% of either fresh or heat inactivated swine plasma (30 min at 37°C) with shaking (28). After 24 h of pre-infection with mycoplasma, the culture medium of the PAMs and BM-DCs was removed, and cells were infected with a final concentration pre-opsonized 1×10^7 CFU/mL of *S. suis* P1/7 strain or its mutant $\Delta cps2F$ (MOI of 20 and 10 for PAMs and BM-DCs, respectively). The infected 24-well cell culture plates were centrifuged and incubated for 30 and 60 minutes at 37°C under 5% CO₂ for PAMs and BM-DCs, respectively (optimal time for *S. suis* phagocytosis determined by previous

phagocytosis assays). Cells were then washed twice with LPS-free PBS and culture medium with antibiotics (gentamicin 100 µg/mL and penicillin G 5 µg/mL) was added to the cells. The cells were incubated for 2 h at 37°C under 5% CO₂. After antibiotic treatment, cells were washed three times with LPS-free PBS and the last wash was plated on to THA to confirm the effectiveness of the antibiotic treatment. The cells were then scraped and the CFU count of the bacteria was determined in the same way as described above. The phagocytosis rate of *S. suis* was expressed as CFU/mL.

To study intracellular survival, bacteria were left for 30 or 60 min to be internalized by the cells. As described above, a penicillin G and gentamicin solution was added, but this time cells were cultured for an additional 1 h, 3 h, 5 h and 7h in the presence of antibiotics. Cells were then processed as described above and the surviving intracellular bacteria counted.

2.7 Cytotoxicity assay

The cytotoxic effects on cells were assessed by measuring the release of lactate dehydrogenase (LDH) enzyme as previously described (18). Briefly, mycoplasma pre-infected (or not) cells were then infected with *S. suis* P1/7 strain at an MOI of 10 (NPTr) or 1 (PAMs and BM-DCs). Mock infected cells were also included. The cells were centrifuged and incubated for various time points at 37°C under 5% CO₂. Recovered supernatants were used for LDH detection using the CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit (Promega, Madison, WI, USA), according to the manufacturer's instructions.

2.8 Induction of Pro-inflammatory cytokines

After pre-infection with one or both mycoplasmas, porcine cells were infected with the *S. suis* P1/7 strain at an MOI of 10 (1×10^6 CFU/mL) for NPTr cells or 1 (5×10^5 CFU/mL) for PAMs and BM-DCs (1×10^6 CFU/mL). Medium from non-pre-infected cells was also removed and fresh medium without antibiotics was added to the cells. Plates were centrifuged and incubated for 12 h (NPTr) or 6 h (PAMs and BM-DCs) at 37°C under 5% CO₂. The conditions were standardized beforehand to permit experimentation under non-toxic conditions (see results). After each incubation time, cells were washed once with LPS-free PBS and RNA from the cells was extracted

using a silica column according to the manufacturer's instructions (Aurum total RNA mini kit, Biorad, Mississauga, ON, Canada). Briefly, cells were lysed with a solution containing β -mercaptoethanol and 70% ethanol. The cell lysate was transferred to a silica column and washed with low and high stringency wash solutions from the kit. DNase solution was added to the cell lysate to retain only the RNA. RNA was eluted into 40 μ L of elution solution, quantified using the NanoDrop 1000 (Fisher, Ottawa, ON, Canada), diluted in RNase free water to 100 ng/ μ L, and stored at -80°C. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 200 ng of RNA with the M-MLV reverse transcriptase kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) using Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer 25 μ g (0.5 μ g/ μ L) and dNTP Mix, 10 mM each (Thermoscientific, Vilnius, Lithuania) according to the manufacturer's instructions.

The primers used for the q-PCR analysis are listed in Table 3. The qPCR was performed as described with some modifications (24). Briefly, the CFX96 thermal cycler (Biorad, Canada) showed that the primers had an efficiency between 90 and 110%. The cDNA was amplified using the PowerTrack SYBR Green Master Mix Kit (Thermofisher). The cDNA amplification program was performed as follows: a 2-minute enzyme activation step at 95°C followed by 40 cycles of 15 seconds denaturation at 95°C and a 1-minute annealing/extension step at 58°C. The two genes *β 2M* and *PPiA* were used as a normalization gene to compensate for potential differences in cDNA amounts between the different samples. Differences in gene expression were calculated using the normalized gene expression calculation method ($\Delta\Delta Cq$) of CFX Maestro software (v.2.1: Biorad, USA). Uninfected cells were used as negative control and calibrator for the analysis. Results represent at least four independent experiments.

Table 3. List of primers for RT-qPCR

Gene name	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
<i>β2M</i>	CGTGGCCTTGCTCCTGCTCG	TCCGTTTTCCGCTGGGTGGC
<i>PPiA</i>	TGCAGACAAAGTTCCAAAGACAG	GCCACCAGTGCCATTATGG
<i>IL-6</i>	ACTCCCTCTCCACAAGCGCCTT	TGGCATCTTCTCCAGGCGTCCC
<i>CXCL8</i>	TGTGAGGCTGCAGTTCTGGCAAG	GGGTGGAAAGGTGTGGAATGCGT

2.9 Statistical analysis

SigmaPlot Software (v.11.0) was used for data analysis. Parametric (unpaired t test) or non-parametric tests (Mann–Whitney rank sum test), where appropriate, were performed to evaluate statistical differences between conditions. Each in vitro test was repeated in at least four independent experiments. $P < 0.05$ was considered the threshold for statistical significance.

3. Results

3.1 Pre-infection of NPTr epithelial cells with *M. hyopneumoniae* and/or *M. hyorhinis* does not promote adhesion and invasion of *S. suis*

M. hyopneumoniae, *M. hyorhinis* and *S. suis* colonise the upper respiratory tract of pigs. All three pathogenic bacteria have the ability to adhere to and potentially invade the epithelial cells of the trachea of pigs (1, 30, 31). In order to evaluate the effect of mycoplasma pre-infection on the early stages of the pathogenesis of the *S. suis* infection, the rate of adhesion and invasion of *S. suis* on tracheal epithelial cells (NPTr) was studied. The studies were performed under non-cytotoxic conditions as established in preliminary testing (data presented below).

As shown in Figure 1A, and as expected, the adhesion rate of the $\Delta cps2F$ mutant (used as a positive control) was significantly higher ($P < 0.05$) than that of the wild-type strain and similar to those described in previously (24, 32). A pre-infection of NPTr cells with *M. hyopneumoniae* and/or *M. hyorhinis* did not significantly modify the adhesion rates of *S. suis* P1/7 strain when compared to mock pre-infected cells (Figure 1A). Similarly, the invasion capacity of *S. suis* P1/7 strain was not affected by pre-infection with either or both mycoplasmas (Figure 1 B). As observed in previous studies, a significant difference in the invasion rate between the wild-type P1/7 strain and its $\Delta cps2F$ mutant was also found (32). In conclusion, pre-infection with either or both mycoplasmas does not influence the adhesion /invasion capacities of *S. suis* under the conditions tested.

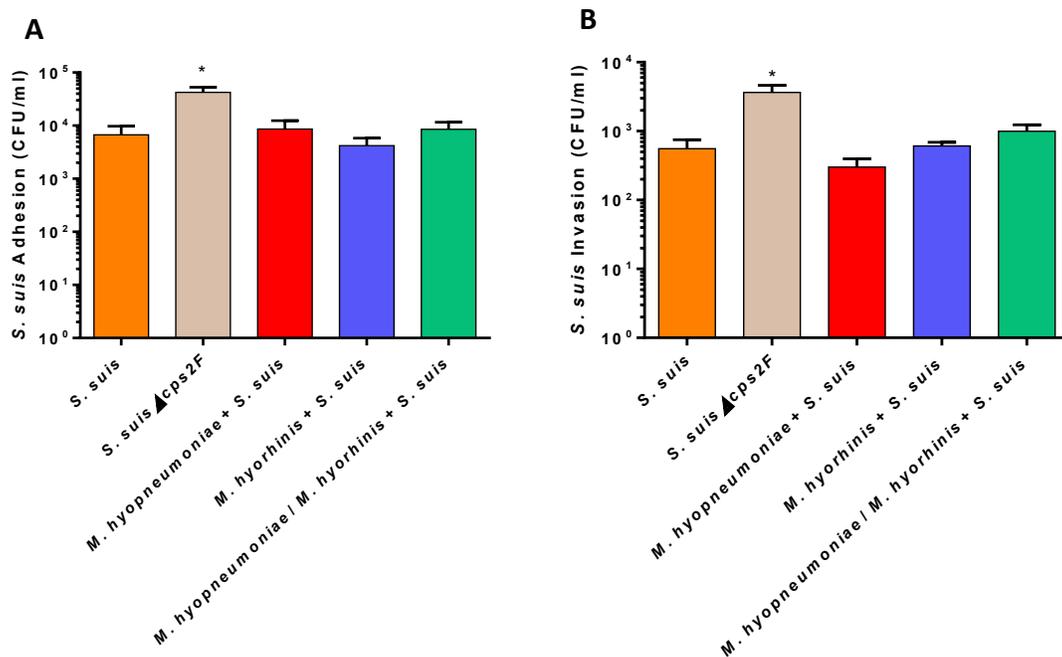


Figure 1: Adhesion and invasion of NPTrs by *S. suis* serotype 2 P1/7 and encapsulated mutant strains. Adhesion (A) and invasion (B) of the *S. suis* wild-type and mutant strains to NPTr porcine tracheal epithelial cells after 2 h of incubation at an MOI of 5. Data represent the mean \pm SEM (n = 4). * ($P < 0.05$) indicates a significant difference between the wild-type and its non-encapsulated mutant strain.

3.2 Pre-infection of PAMs and BM-DCs with *M. hyopneumoniae* and/or *M. hyorhinis* does not affect phagocytosis of *S. suis*

One of the main roles of alveolar macrophages and dendritic cells is to phagocytose and then process ingested microorganisms (33, 34). Therefore, the rate of phagocytosis of *S. suis* was studied in the presence of PAMs and BM-DCs previously pre-infected (or not) with *M. hyopneumoniae* and/or *M. hyorhinis*. The phagocytosis rates of both cell types were significantly higher in the presence of fresh plasma, confirming complement involvement in the process ($P < 0.05$) (Figure 2A to 2D) (35). Also, as previously described, the Δ cps2F non-encapsulated mutant strain was significantly more phagocytosed than its wild-type strain (in the presence of either fresh or heat inactivated plasma) ($P < 0.05$), indicating a normal behavior of the cells used (17,

28). In the presence of fresh plasma, the phagocytosis of the P1/7 strain was higher when using PAMs when compared to BM-DCs cells ($P < 0.05$) (Figures 2A and 2C), similarly to what was previously reported (36). Mycoplasma or mock-preinfected PAMs phagocytosed *S. suis* at a similar rate for both cells types and under both conditions (fresh or inactivated plasma) used (Figures 2A to 2D), indicating that pre-infection with either or both mycoplasmas does not influence the phagocytosis activity of these cells towards *S. suis*.

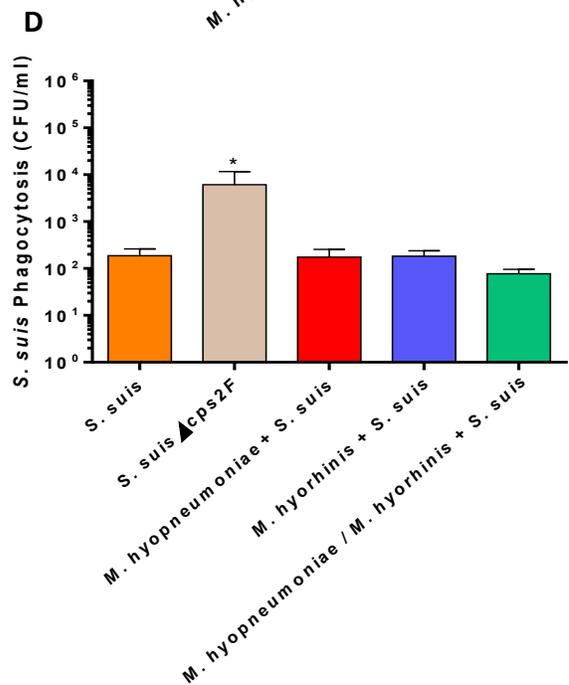
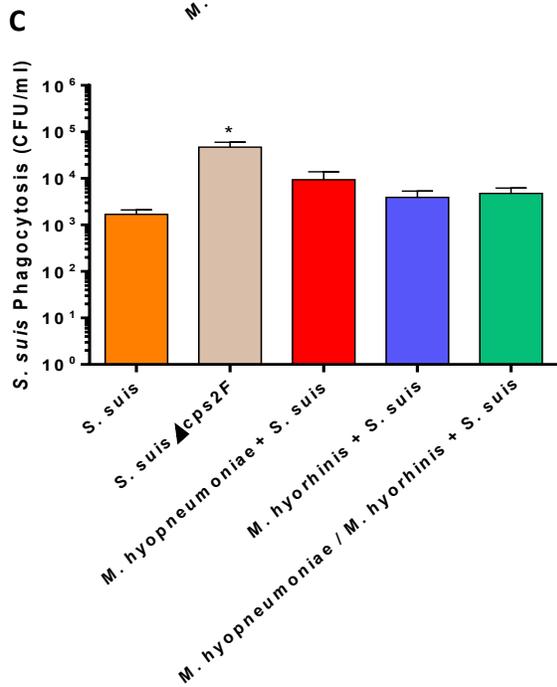
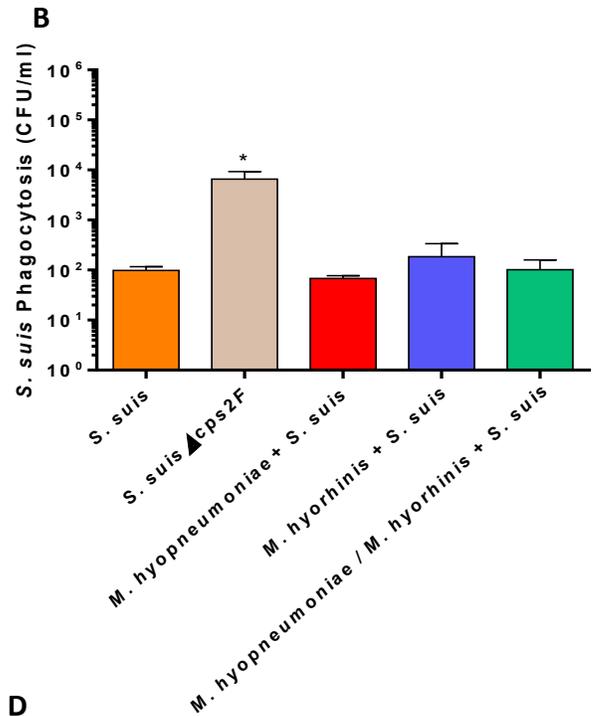
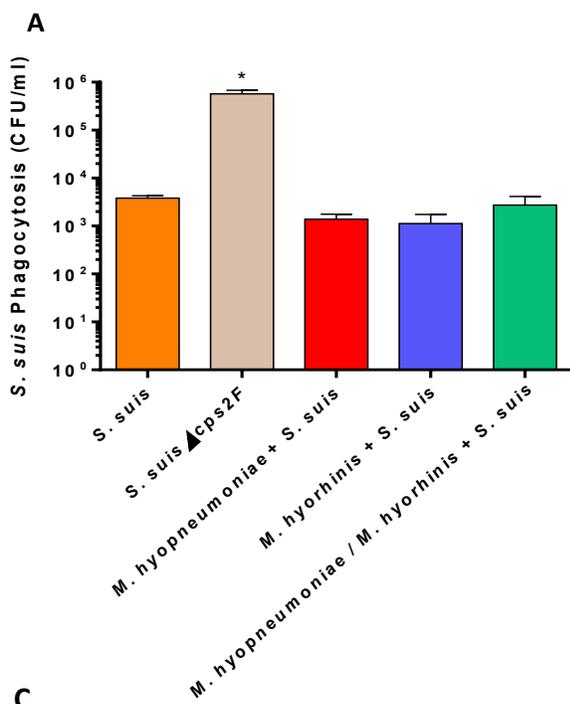


Figure 2: Phagocytosis of *S. suis* serotype 2 strain P1/7 and its $\Delta cps2F$ non-encapsulated mutant by PAMs and BM-DCs. After pre-infection (or not) with *M. hyopneumoniae* and/or *M. hyorhinis*, the cells were infected with *S. suis* for 60 minutes at an MOI of 20 (PAMs: A & B) and 30 minutes at MOI of 10 (BM-DC: C & D). The phagocytosis rate of *S. suis* in the presence of fresh porcine plasma (A & C) or heat-inactivated plasma (B & D) is expressed as colony forming units (CFU/mL) after 2 hours of antibiotic treatment. Data represent the mean \pm SEM (n = 4). The asterisk shows a significant difference between the wild-type strain P1/7 and its $\Delta cps2F$ mutant strain ($P < 0.05$).

3.3 Pre-infection of PAMs and BM-DCs with *M. hyopneumoniae* and/or *M. hyorhinis* does not affect the intracellular survival rate of *S. suis*

Resistance to intracellular killing mechanisms of phagocytes may contribute to the pathogenesis of the infection. Therefore, the intracellular survival rate of *S. suis* in the presence of fresh plasma was assessed. To compare the intracellular survival rate of *S. suis* P1/7 or $\Delta cps2F$, the value of 100% was assigned to the phagocytosis rate observed after 60 or 30 minutes of incubation for PAMs and BM-DCs, respectively, followed by 2 h of antibiotic treatment. As previously reported (37), no differences in intracellular survival between the wild-type P1/7 and its unencapsulated mutant was observed (Figures 3A and 3B). A pre-infection of PAMs by any or both of the mycoplasmas tested did not increase the intracellular survival of *S. suis* (Figure 3A). Moreover, after 3 hours of antibiotic treatment, the intracellular survival of the P1/7 strain or its $\Delta cps2F$ in PAMs decreased significantly from 100% to about 40%. After 5 hours of antibiotic treatment there were almost no bacteria left (5% intracellular bacteria). And after 7 hours of antibiotic treatment few bacteria were found with an intracellular survival rate of less than 1%. Figure 3B shows similar results observed with BM-DCs. After 3h of incubation survival was at least 50% lower than observed for PAMs, although no differences were detected in the presence or absence of pre-infection with mycoplasmas. Survival rates after 5 h and 7 h of incubation were similar to those observed for PAMs. Similarly, no difference was observed between the wild-type strain and the

non-encapsulated mutant strain with PAMs and BM-DCs. Pre-infection with mycoplasma did not increase intracellular survival of *S. suis*.

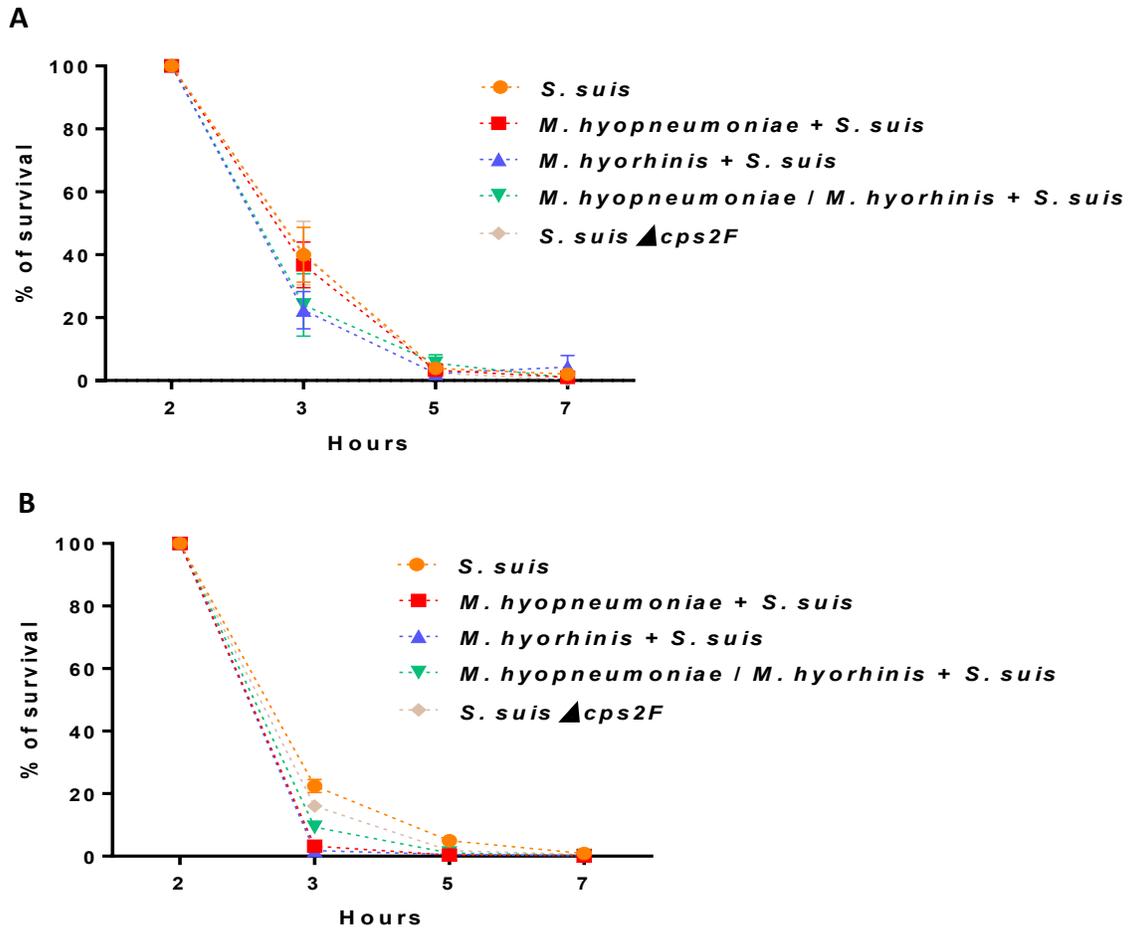


Figure 3: Intracellular survival of *S. suis* serotype 2 strain P1/7 and its Δ *cps2F* non-encapsulated mutant within PAMs and BM-DCs. After pre-infection (or not) with *M. hyopneumoniae* and/or *M. hyorhinis*, cells were infected with *S. suis* for 60 minutes at an MOI of 20 (PAMs: A) and 30 minutes at MOI of 10 (BM-DC: B) in the presence of fresh porcine plasma. Antibiotics were then added for 3 h, 5 h and 7 h. The survival rate of 100% represents the phagocytosis rate (similar to that observed in the previous experiment, Figure 2) after 2 h of antibiotic treatment. The intracellular survival rate of *S. suis* in the presence of fresh pig plasma is expressed as colony forming units (CFU/mL). Data represent the mean \pm SEM (n = 4).

3.4 Pre-infection of NPTr, PAMS and BM-DCs cells with *M. hyopneumoniae* and/or *M. hyorhinis* significantly increases cytotoxicity

It has been shown that *M. hyopneumoniae* can adhere to the surface of epithelial cells, damage the host epithelial barrier, and weaken these cells (30, 38). Therefore, we next analyzed the cytotoxic effect of pre-infection with *M. hyopneumoniae* and/or *M. hyorhinis* and subsequent infection with *S. suis* on epithelial, PAMs and BM-DCs cells.

When tested with NPTr cells, at the bacterial concentration used, cells infected with one or both mycoplasmas presented low percentage of cytotoxicity (around 5%) when they were not co-infected with *S. suis* (Figure 4A). Cells infected with only *S. suis* showed a low percentage of cytotoxicity after 6 h, 12 h, 18 h and 24 h of incubation with a mean of 1.3%, 2.9%, 6.2% and 11.8% of toxicity, respectively (Figure 4A). In contrast, cells pre-infected with mycoplasmas and then infected with *S. suis* showed significantly increased cytotoxicity ($P < 0.05$) compared to single infections (*S. suis* or mycoplasmas) at 18 h and 24 h of incubation. It was also noted that after 18h of incubation, cells pre-infected with both mycoplasmas and then infected by *S. suis* showed already a greater toxicity (77%) than cells pre-infected with either *M. hyopneumoniae* (48%) or *M. hyorhinis* (25%) and then co-infected with *S. suis*. After 24 h of incubation, the cells co-infected with *M. hyopneumoniae* or both mycoplasmas and *S. suis* was similarly very high (more than 80%). Interestingly, after 24 h of incubation the percentage of cytotoxicity of the cells pre-infected with *M. hyopneumoniae* or with both mycoplasmas and then co-infected with *S. suis* presented a higher level of cytotoxicity when compared to those co-infected by *M. hyorhinis* and *S. suis* ($P < 0.05$) (Figure 4A).

Similarly, to epithelial cells, PAMs pre-infected with either or both mycoplasmas presented a similar low percentage of cytotoxicity when compared to the NPTr cells after 6 h, 8 h, 10 h and 12 h of incubation (Figure 4B). A low percentage of cytotoxicity (less than 10%) was also found for cells infected with *S. suis* but, differently from epithelial cells, only until 8 h of incubation. However, at 10 h and 12 h of incubation, *S. suis* infected PAMs showed an increased cytotoxicity

(approximately 45%) (Figure 4B). Interestingly, there was a rapid, higher, and significant increase of cytotoxicity when cells were pre-infected by any of the mycoplasmas (or both) and then infected by *S. suis*, with a significant differences observed as soon as 8 h and until 12 h of incubation. At 10 h of incubation after the infection with *S. suis*, cells pre-infected by *M. hyopneumoniae* presented the highest cytotoxicity level when compared to those infected by *M. hyorhinis* or both. At 12 h of incubation, all mycoplasma pre-infected cells (and co-infected with *S. suis*) presented similar and high cytotoxicity (> 75%) (Figure 4B).

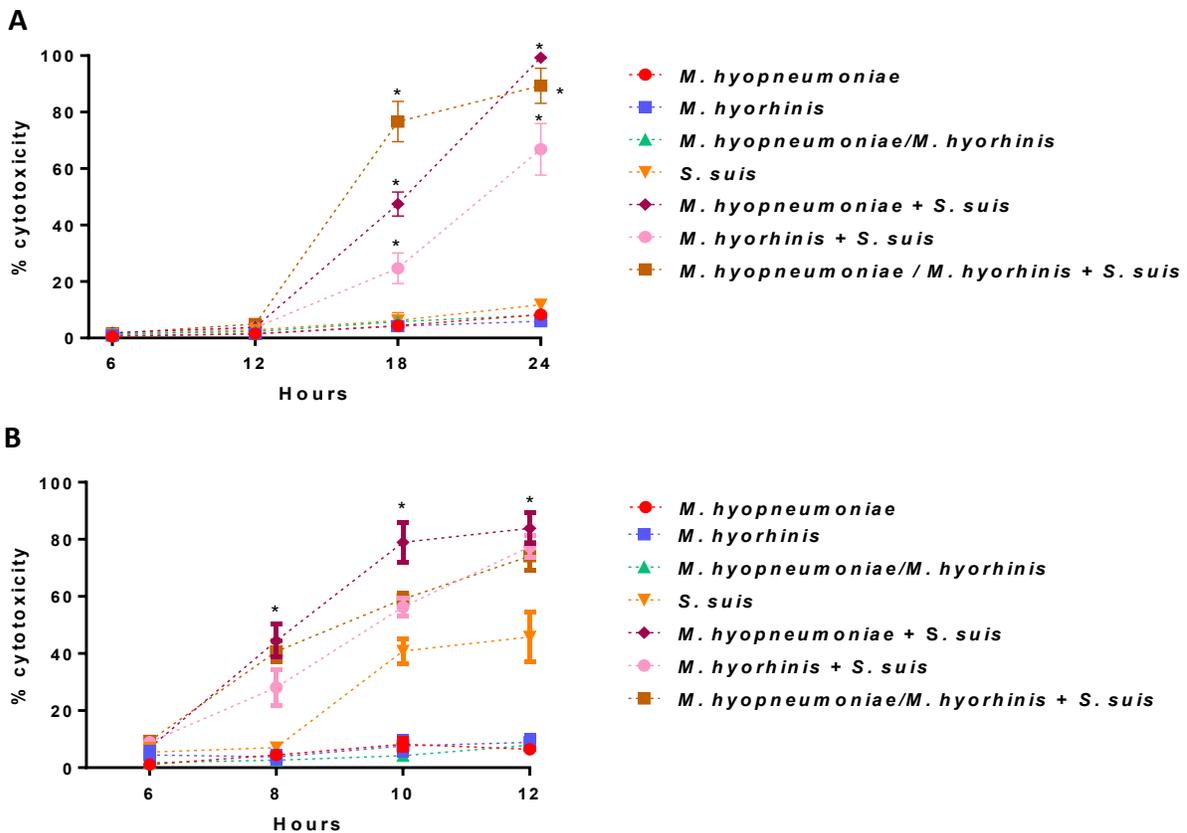


Figure 4: Effect of a pre-infection of mycoplasmas on the cytotoxic effect of *S. suis* on NPTr and PAMs. After pre-infection (or not) with *M. hyopneumoniae* and/or *M. hyorhinis*, cells were infected with *S. suis* P1/7 strain from 6 h to 24 h for NPTr (A) at an MOI of 10 and from 6 h to 12 h for PAMs (B) at a MOI of 1. Data represent mean \pm SEM (n = 4). The asterisk shows a significant difference between cells pre-infected with mycoplasmas + *S. suis* and cells infected with *S. suis* only and cells pre-infected with mycoplasma only (P < 0.05).

The effect of pre-infection with mycoplasmas on a subsequent infection with *S. suis* of BM-DCs could not be evaluated. In fact, between 6 h and 8 h after infection with *S. suis* (with or without pre-infection with mycoplasmas) a cytotoxicity of higher than 50% was observed. This was mainly due to the high susceptibility of these cells *in vitro* (Supplemental Figure 1).

3.5 Pre-infection with mycoplasmas, followed by a *S. suis* infection of NPTr, PAMs and BM-DCs differently modulates the relative expression of mRNA of pro-inflammatory cytokines IL-6 and/or CXCL8

In general, epithelial cells induced a similar expression of IL-6 when stimulated either with *S. suis* alone or *M. hyopneumoniae* and/or *M. hyorhinis* alone (Figure 5A). Pre-infection with *M. hyopneumoniae* followed by activation by *S. suis* did not significantly induce higher expression of this cytokine when compared to cells activated with *S. suis* alone ($P > 0.05$) (Figure 5A). However, a significantly higher mRNA induction of this cytokine was observed when cells were pre-infected by *M. hyorhinis* or both mycoplasmas in comparison to activation by *S. suis* alone (Figure 5A). In the case of CXCL8, in general, a higher expression of mRNA was observed when compared to that of IL-6 (Figures 5A and 5B). However, *S. suis* (as well as *M. hyorhinis* or both mycoplasmas together) induced a significantly higher level of this chemokine than *M. hyopneumoniae* alone ($P < 0.05$). Cells pre-infected with *M. hyorhinis* alone, but not with *M. hyopneumoniae* alone, as well as cells pre-infected with both mycoplasmas, and in both cases then infected with *S. suis*, induced higher levels of mRNA than those activated by *S. suis* only ($P < 0.05$) (Figure 5B). However, for both cytokines, the observed activation was likely additive rather than synergistic (Figure 5A).

As expected, activation of PAMs showed a clear higher induction of cytokines than epithelial cells (Figures 5C and 5D). Interestingly, PAMs infected by *M. hyorhinis* (but not *M. hyopneumoniae*) alone, induced a higher level of IL-6 than PAMs that were infected only with *S. suis*. Furthermore, the level of IL-6 is also higher when PAMs were infected only with both mycoplasmas together, compared to cells infected with *S. suis* alone (Figure 5C). Cells infected by both *M. hyorhinis* and *S. suis* induced higher levels of IL-6 than those infected by *S. suis* alone; however, this difference

was likely additive, and most of the activation appears to be caused by *M. hyorhinis*. In the case of CXCL8, both mycoplasmas, each alone or in combination, induced similar levels of this chemokine which were significantly higher than those induced by *S. suis* alone ($P < 0.05$) (Figure 5D). Results showed, in general, that *M. hyopneumoniae* has an additive effect in the inflammatory response in the presence of *S. suis*, whereas the co-infection of *M. hyorhinis* (with either *S. suis* or *M. hyopneumoniae*) induced a synergistic effect on the expression of the inflammation factors: IL-6 and CXCL-8 (Figure 5D).

Pre-infection of BM-DCs by one or both mycoplasmas induced, in general, similar levels of IL-6 and CXCL8 than those induced by *S. suis* alone (Figures 5E and 5F). For IL-6, a somehow synergistic effect was observed when cells were pre-activated by any (or both) of the mycoplasmas and then co-infected by *S. suis* (Figure 5E). This effect is less clear and overactivation of co-infected cells seems to be, for CXCL8, an additive effect (Figure 5F).

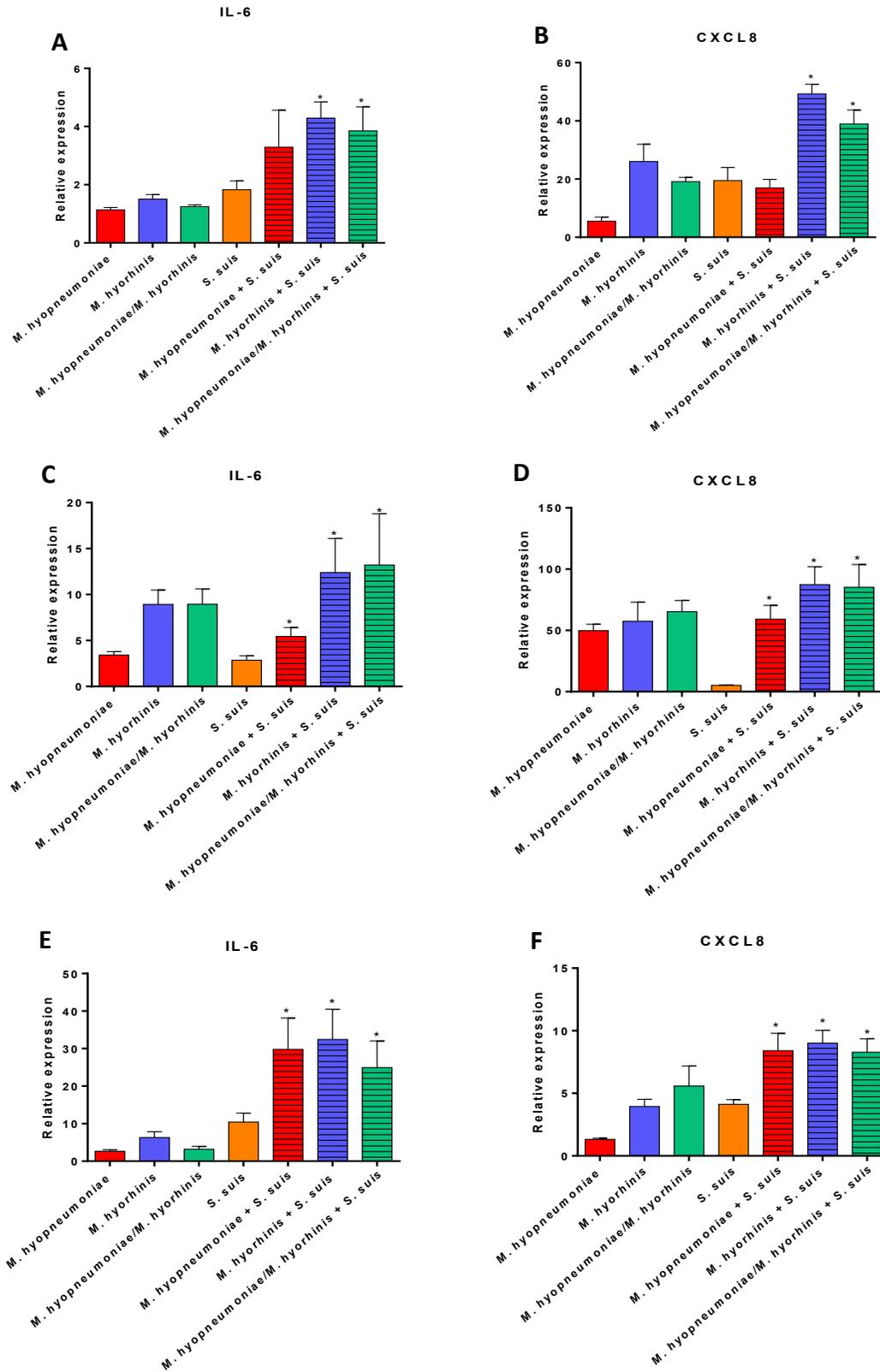


Figure 5: Relative expression of IL-6 and CXCL-8 cytokines expressed by NPT cells (A & B), PAMs (C & D) and BM-DCs (E & F) by RT-qPCR. After pre-infection of porcine cells with *M.*

hyopneumoniae and/or *M. hyorhinis*, cells were infected with *S. suis* P1/7 strain for 12 h at an MOI of 10 (NPTr) and for 6 h at an MOI of 1 (BM-DC and PAMs). Data represent mean \pm SEM (n = 4). * ($P < 0,05$) shows a significant difference between cells infected with *S. suis* only and cells pre-infected with *M. hyopneumoniae* and/or *M. hyorhinis* and then infected with *S. suis*.

4. Discussion

Bacterial and/or viral co-infections are frequent in pig farms. These co-infections may, in some circumstances, increase clinical signs leading to important economic losses. The PRDC includes a range of “primary” and “secondary” pathogens. The large number of pathogens found in animals makes it difficult to understand the role of each one in the induction of respiratory disease, particularly when pathogens invade through the respiratory route but cause systemic diseases, as is the case of *S. suis* (5). The interactions between microorganisms and the host immune response are complex and not always well understood (12, 39) even though the study of microbial co-infections in pigs is a rapidly expanding area of research (7).

In classical *S. suis* infections in pigs, adhesion to and invasion of the respiratory mucosa are considered the first steps in the development of invasive disease. *S. suis* can adhere to (and, although this remains controversial, perhaps also invade) epithelial cells (40). For the porcine mycoplasmas included in this study, adhesion to respiratory cells is also the first step in the pathogenesis of the infection. Indeed, *M. hyopneumoniae* can adhere to the surface of epithelial cells thanks to adhesins, which leads to ciliostasis, followed by the progressive disappearance of cilia, intense mucus production and a reduction in ciliary activity (30, 38). This reduction in ciliary activity could facilitate the colonization of “secondary” swine pathogens such as *A. pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* and *Glaesserella parasuis*, and lead to the severity of pulmonary lesions (39, 41). Several proteins have been involved in the adhesion of *M. hyopneumoniae* to host cells (30, 41, 42). Among them, one membrane protein could be responsible for the adhesion of *M. hyopneumoniae* to tracheal epithelial cells (43). In addition, it has been reported that *M. hyopneumoniae* increases the attachment of *P. multocida* type A to the respiratory epithelium (44, 45). On the other hand, little is known about the pathogenesis of *M. hyorhinis* but some lipoproteins, as well as the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,

found on the surface of *M. hyorhinis*, have been reported to bind to the surface of epithelial cells (31, 46).

S. suis adhesion may be enhanced during co-infection with other pathogens. Indeed, a study by Wang et al. (25), which used the same model described in the current investigation, demonstrated that *S. suis* adhesion and invasion were effectively enhanced by SIV pre-infection. However, when we assessed the effect of pre-infection with *M. hyopneumoniae* and/or *M. hyorhinis* we did not observe any significant influence of either or both mycoplasmas on *S. suis* adhesion and invasion of tracheal epithelial cells. These results are similar to those previously observed in a co-infection model of *S. suis* and *G. parasuis* (24). The lack of effect of the pre-infection with the mycoplasmas cannot be explained by a significant mortality of these microorganisms during the 24 h pre-infection period. Indeed, the number of live mycoplasmas did not decrease (and in some cases, increased) before the cells were infected with *S. suis*. However, since the medium used for the cells was not necessarily a mycoplasma specific medium, we cannot rule out that *M. hyopneumoniae* or *M. hyorhinis* may have not expressed or displayed adequately some factors needed for adhesion. Indeed, a previous study has shown that some *M. hyopneumoniae* genes can be up- or down-regulated depending on environmental conditions such as the culture medium used for growing the strains, or stress (47). Although adhesion to tracheal epithelial cells has been reported for *M. hyopneumoniae*, it would be interesting to confirm possible interactions between *S. suis* and porcine mycoplasmas using an *ex vivo* model, such as precision-cut lung slices (PCLS) (48). It should be noted, however, that the effect of SIV pre-infection on the adhesion/invasion of *S. suis* to epithelial cells could be observed, with the experimental method of the study and with the *ex vivo* PCLS model (6, 25).

After crossing the respiratory epithelial barrier, *S. suis* disseminate throughout the body (49). The lung is an organ that is constantly in contact with pathogens, and phagocytic cells (such as PAMs) play an essential role in the innate immune response against pathogens through bacterial phagocytosis and elimination (50). Dendritic cells are part of the innate immune system that act as sentinels throughout the body, so a large proportion of these cells are also found in the lungs (51). Resistance to phagocytosis and/or intracellular bacterial elimination may contribute to the pathogenesis of the infection. It has been proposed that *S. suis* is able to destabilize the lipid rafts

on the surface of macrophages which contain lactosylceramide, preventing the phagocytosis of encapsulated strains (52). In this way, *S. suis* reduces phagocytosis and remains extracellular (53). In the current study we confirmed that the absence of a capsule increases the phagocytosis of *S. suis* by both PAMs and BM-DCs (24, 28). In addition, we also confirmed that the complement plays an important role in the phagocytosis process (28). There are very few, and contradictory, studies on the effect of co-infections on the phagocytosis and intracellular survival of *S. suis*. One study reported impairment of *S. suis* phagocytosis by PRRSv-infected BM-DCs, whereas another study showed increased phagocytosis by the same cell type (17, 54). There are also very few studies on the effect of mycoplasmas on the phagocytic activity of macrophages. A study showed that *M. hyopneumoniae* can adhere to PAMs, but it is almost not phagocytosed (55). Another study showed that PAMs pre-infected by *M. hyopneumoniae* presented reduced phagocytosis against *A. pleuropneumoniae* (56). No data are available in the literature on the effect of *M. hyorhinis* on phagocytosis activity of PAMs; indeed, it is still unknown if these cells are able to phagocytose this pathogen. Results of the current study showed that a pre-infection with either *M. hyopneumoniae* or *M. hyorhinis* (or both combined) does not influence the phagocytosis rate of *S. suis*.

After phagocytosis, bacteria end up in an intracellular vesicle called a phagolysosome, where they are degraded by numerous enzymes and free radicals such as reactive oxygen species (ROS) (33, 34). A previous study showed altered expression of more than 2,000 genes in the genome of porcine alveolar macrophages following infection with *M. hyopneumoniae* (57). It can be hypothesized that porcine mycoplasmas may modify the expression of some of PAMs genes and thus favor the intracellular survival of *S. suis*. We therefore investigated whether pre-infection of PAMs and BM-DCs with *M. hyopneumoniae* and/or *M. hyorhinis* could increase the intracellular survival of *S. suis* after phagocytosis. To achieve an optimal phagocytosis rate of *S. suis*, this experiment was performed in the presence of fresh pig plasma. Results clearly showed that a pre-infection with mycoplasmas does not influence the intracellular survival of *S. suis*. Indeed, as reported earlier, *S. suis* only survived a few hours, and the absence or presence of its capsular polysaccharide did not influence the survival rate (28). It has been previously reported that pre-infection with PRRSv increases intracellular survival of *S. suis* (54). However, another study shows

that pre-infection with PRRSv had no influence on *S. suis* survival (17), as was the case with mycoplasma in the current study.

Toxicity towards host cells is important in *S. suis* pathogenesis. Suilysin (a hemolysin that is present mainly in virulent strains from Europe and Asia) (4) is one factor used by *S. suis* to damage and invade host cells (40, 58). Although is not considered a critical virulence factor (59), the toxic effect of suilysin is important in many steps of the pathogenesis of the infection (60). Two studies have shown that co-infection increases toxicity caused by *S. suis*. The first study used a *Bordetella bronchiseptica*-*S. suis* co-infection models, and the second SIV-*S. suis* one (61, 62). In the case of *M. hyopneumoniae*, it has been long known that the pathogen adhesion causes ciliostasis and subsequent cilium loss and epithelial cell death (42). Very few data are available on the cytotoxic effect of *M. hyorhinis*, other than that reported with porcine dendritic cells (18). In the current study, conditions were established to work under non-toxic conditions 24 h after the infection of cells with one or both mycoplasmas, since the objective was to study a synergistic effect with *S. suis*. A clear increase in cytotoxic effect was demonstrated when the NPTr cells and PAMs were pre-infected with mycoplasmas and later infected with *S. suis*. In the case of NPTr, cells were highly resistant to toxicity induced by *S. suis* alone, but after a pre-infection with either or both mycoplasmas, the toxicity increased at high values (> 60%) after 24 h of incubation. PAMs were already more susceptible to the effect of *S. suis* alone; however, a pre-infection with mycoplasmas significantly increase the toxicity of the cells to similar values to those observed with epithelial cells. *M. hyopneumoniae* cytotoxicity has been considering a virulence mechanism, as the bacterial infection may induce dead/apoptosis of host cells (42). In the case of *M. hyorhinis*, similar effects may be hypothesized. A reduced viability of epithelial cells and PAMs during a co-infection may open the door for a subsequent systemic invasion of *S. suis*. However, this hypothesis should be confirmed since results obtained in the current study refer mainly to *in vitro* tests in closed environments. In addition, further studies on the role of apoptosis (clearly demonstrated as being induced by *M. hyopneumoniae* (30, 63, 64) on the subsequent infection with *S. suis* remain to be performed.

Inflammation is a hallmark of *S. suis* infections (2). Septicemia with septic shock induced by *S. suis* results from exacerbated inflammation, and the pig or human host may die within hours of

infection. In addition, *S. suis* can induce the production of various pro-inflammatory cytokines by porcine, murine, and human cells (40). *M. hyopneumoniae* is also known to induce the stimulation and secretion of pro-inflammatory cytokines by macrophages *in vitro* and *in vivo* (8, 65). *M. hyorhinis* lipoproteins induce the production of pro-inflammatory cytokines by monocytes, splenocytes and BM-DCs (18, 66, 67). Furthermore, in cases of bacterial and/or viral co-infections the production of pro-inflammatory cytokines is increased which could be detrimental for co-infected animals. Indeed, *in vitro* co-infection studies of PRRSv or SIV and *S. suis* showed an increased production of pro-inflammatory cytokines (17, 25). *In vivo* co-infection of PRRSv and *M. hyopneumoniae* in pigs, also increased inflammatory mediators (68). Taken separately, these three pathogens induce a significant inflammation that can lead to serious consequences on the health of the animal (2, 12, 42). The question is whether pre-infection of NPTr, PAMs and BM-DCs with mycoplasmas and then infected with *S. suis* would increase the expression of inflammatory mediators IL-6 and CXCL8 that were used as models in the current study. Results showed, in general, an increased activation of the inflammatory mediators tested. However, in most cases, this was the consequence of an additive (rather a synergistic) effect of the pathogens during the co-infection. Results also showed that *M. hyorhinis* seems to have a more powerful capacity to induce cytokine expression than *M. hyopneumoniae*, consistent with previous suggestions (18). Taken together, the *in vitro* results indicate that it is difficult to conclude that pre-infection of pig cells with *M. hyopneumoniae* and/or *M. hyorhinis* and subsequent infection with *S. suis* will induce a cytokine storm.

5. Conclusions

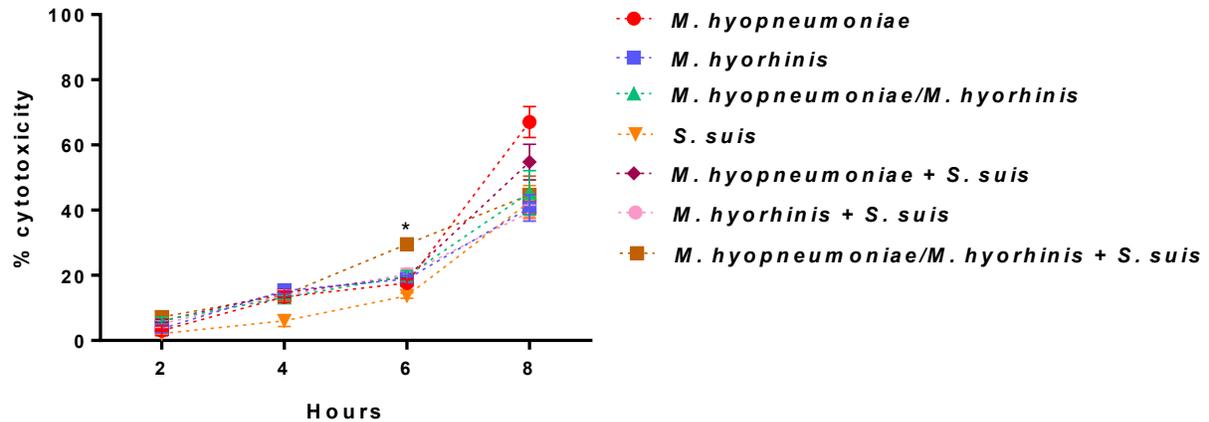
This study showed relatively limited *in vitro* interactions between *M. hyopneumoniae* and/or *M. hyorhinis* and *S. suis* serotype 2. A previous infection with one or both mycoplasmas did not influence the adhesion and invasion properties of epithelial cells or resistance to phagocytosis (including intracellular survival) by macrophages and dendritic cells. The most important observed effect after pre-infection with mycoplasmas was a clear increase in toxicity towards cells once co-infected with *S. suis*. An increase in the relative expression of inflammatory mediators (usually as the consequence of an additive effect due to the presence of different pathogens) was

also observed. It may be hypothesized that, if one or both mycoplasmas are present along with *S. suis* in the lower respiratory tract at the same time, increase damage to epithelial cells and phagocytes as well as an increase release of inflammatory mediators may eventually enhance the invasive properties of *S. suis*. Further *in vitro* experiments with additional mycoplasma and *S. suis* strains as well as *in vivo* studies should be carried out to reach more definitive conclusions.

Supplementary Materials: The following are available online at (adresse URL), **Table 1:** Titration of *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinitis* expressed in color-changing units per milliliter (CCU/mL) before and after pre-infection Newborn Pig Tracheal cell line (NPTr), primary pulmonary alveolar macrophages (PAMs) and primary bone marrow-derived porcine dendritic cells (BM-DC), **Figure S1:** Effect of a pre-infection of mycoplasmas on the cytotoxic effect of *S. suis* on BM-DCs.

Supplementary Table 1: Titration of *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinitis* expressed in color-changing units per milliliter (CCU/mL) before and after pre-infection Newborn Pig Tracheal cell line (NPTr), primary pulmonary alveolar macrophages (PAMs) and primary bone marrow-derived porcine dendritic cells (BM-DC)

Cells	Mycoplasma	Before pre-infection (CCU/ml)	After pre-infection (CCU/ml)
NPTr	<i>M. hyopneumoniae</i>	5×10^8	5×10^8
	<i>M. hyorhinitis</i>	$4,5 \times 10^6$	$1,95 \times 10^8$
PAMs	<i>M. hyopneumoniae</i>	$1,95 \times 10^7$	$2,45 \times 10^8$
	<i>M. hyorhinitis</i>	$3,5 \times 10^6$	$3,5 \times 10^8$
BM-DCs	<i>M. hyopneumoniae</i>	$4,5 \times 10^7$	$4,5 \times 10^8$
	<i>M. hyorhinitis</i>	$3,5 \times 10^5$	3×10^8



Supplementary Figure 1: Percent cytotoxicity of BM-DCs. After pre-infection of BM-DCs with *M. hyopneumoniae* and/or *M. hyorhinis*, cells were infected with *S. suis* P1/7 from 2 h to 8 h for BM-DCs at an MOI of 1. Data represent mean \pm SEM (n = 4). * (P < 0,005) shows a significant difference between cells pre-infected with mycoplasma + P1/7 and cells infected with P1/7 only and cells pre-infected with mycoplasma only.

Author Contributions: Conceptualization, M.G. and H.P.; methodology, H.P., S.L., M.L., M.G., and M.S.; writing—original draft preparation, H.P. and M.G.; writing—review and editing, H.P. and M.G.; supervision, M.G., M.S and C.M-C.; project administration, M.G.; funding acquisition, M.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Funding: This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (04435 to M.G.)

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the University of Montreal (protocol code 1570, 12 December 2020).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors would like to thank Sonia Lacouture (laboratory of M.G.) and Mélanie Lehoux (laboratory of M. S.) for technical help and advice.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Segura, M.; Calzas, C.; Grenier, D.; Gottschalk, M. Initial steps of the pathogenesis of the infection caused by *Streptococcus suis*: fighting against nonspecific defenses. *FEBS Lett* 2016, 590, 3772-3799, doi:10.1002/1873-3468.12364.
2. Segura, M. *Streptococcus suis* Research: Progress and Challenges. *Pathogens* 2020, 9, doi:10.3390/pathogens9090707.
3. Gottschalk, M.; Xu, J.; Calzas, C.; Segura, M. *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? *Future Microbiol* 2010, 5, 371-391, doi:10.2217/fmb.10.2.
4. Segura, M.; Fittipaldi, N.; Calzas, C.; Gottschalk, M. Critical *Streptococcus suis* Virulence Factors: Are They All Really Critical? *Trends Microbiol* 2017, 25, 585-599, doi:10.1016/j.tim.2017.02.005.
5. Obradovic, M.R.; Segura, M.; Segales, J.; Gottschalk, M. Review of the speculative role of co-infections in *Streptococcus suis*-associated diseases in pigs. *Vet Res* 2021, 52, 49, doi:10.1186/s13567-021-00918-w.
6. Meng, F.; Tong, J.; Votsch, D.; Peng, J.Y.; Cai, X.; Willenborg, M.; Herrler, G.; Wu, N.H.; Valentin-Weigand, P. Viral Coinfection Replaces Effects of Sullysin on *Streptococcus suis* Adherence to and Invasion of Respiratory Epithelial Cells Grown under Air-Liquid Interface Conditions. *Infect Immun* 2019, 87, doi:10.1128/IAI.00350-19.
7. Saade, G.; Deblanc, C.; Bougon, J.; Marois-Crehan, C.; Fablet, C.; Auray, G.; Belloc, C.; Leblanc-Maridor, M.; Gagnon, C.A.; Zhu, J.; et al. Coinfections and their molecular consequences in the porcine respiratory tract. *Vet Res* 2020, 51, 80, doi:10.1186/s13567-020-00807-8.
8. Maes, D.; Sibila, M.; Kuhnert, P.; Segales, J.; Haesebrouck, F.; Pieters, M. Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: Knowledge gaps for improved disease control. *Transbound Emerg Dis* 2018, 65 Suppl 1, 110-124, doi:10.1111/tbed.12677.
9. Sibila, M.; Pieters, M.; Molitor, T.; Maes, D.; Haesebrouck, F.; Segales, J. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Vet J* 2009, 181, 221-231, doi:10.1016/j.tvjl.2008.02.020.
10. Wallgren, P.; Norregard, E.; Molander, B.; Persson, M.; Ehlorsson, C.J. Serological patterns of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida* and *Streptococcus suis* in pig herds affected by pleuritis. *Acta Vet Scand* 2016, 58, 71, doi:10.1186/s13028-016-0252-1.
11. Kobisch, M.; Friis, N.F. Swine mycoplasmoses. *Rev Sci Tech* 1996, 15, 1569-1605, doi:10.20506/rst.15.4.983.
12. Thacker, E.L.; Minion, F.C. Disease of swine; 2012; Volume 10th edition.
13. Fourour, S.; Tocqueville, V.; Paboeuf, F.; Lediguerher, G.; Morin, N.; Kempf, I.; Marois-Crehan, C. Pathogenicity study of *Mycoplasma hyorhinis* and *M. flocculare* in specific-pathogen-free pigs pre-infected with *M. hyopneumoniae*. *Vet Microbiol* 2019, 232, 50-57, doi:10.1016/j.vetmic.2019.04.010.

14. Buttenschon, J.; Friis, N.F.; Aalbaek, B.; Jensen, T.K.; Iburg, T.; Mousing, J. Microbiology and pathology of fibrinous pericarditis in Danish slaughter pigs. *Zentralbl Veterinarmed A* 1997, *44*, 271-280, doi:10.1111/j.1439-0442.1997.tb01111.x.
15. Nathues, H.; Kubiak, R.; Tegeler, R.; grosse Beilage, E. Occurrence of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in suckling and nursery pigs in a region of high pig density. *Vet Rec* 2010, *166*, 194-198, doi:10.1136/vr.b4757.
16. Kang, I.; Kim, D.; Han, K.; Seo, H.W.; Oh, Y.; Park, C.; Lee, J.; Gottschalk, M.; Chae, C. Optimized protocol for multiplex nested polymerase chain reaction to detect and differentiate *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, and *Mycoplasma hyorhinis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from pigs with polyserositis. *Can J Vet Res* 2012, *76*, 195-200.
17. Auray, G.; Lachance, C.; Wang, Y.; Gagnon, C.A.; Segura, M.; Gottschalk, M. Transcriptional Analysis of PRRSV-Infected Porcine Dendritic Cell Response to *Streptococcus suis* Infection Reveals Up-Regulation of Inflammatory-Related Genes Expression. *PLoS One* 2016, *11*, e0156019, doi:10.1371/journal.pone.0156019.
18. Fourour, S.; Marois-Crehan, C.; Martelet, L.; Fablet, C.; Kempf, I.; Gottschalk, M.; Segura, M. Intra-Species and Inter-Species Differences in Cytokine Production by Porcine Antigen-Presenting Cells Stimulated by *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, and *M. flocculare*. *Pathogens* 2019, *8*, doi:10.3390/pathogens8010034.
19. Friis, N.F. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis* pneumoniae and *Mycoplasma flocculare* a survey. *Nord Vet Med* 1975, *27*, 337-339.
20. Fourour, S.; Fablet, C.; Tocqueville, V.; Dorenlor, V.; Eono, F.; Eveno, E.; Kempf, I.; Marois-Crehan, C. A new multiplex real-time TaqMan((R)) PCR for quantification of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* and *M. flocculare*: exploratory epidemiological investigations to research mycoplasmal association in enzootic pneumonia-like lesions in slaughtered pigs. *J Appl Microbiol* 2018, *125*, 345-355, doi:10.1111/jam.13770.
21. Innis, M.A.; Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; White, T.J.; Sninsky, J.J. Detection of human immunodeficiency virus. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*; Academic Press: 1990.
22. Slater, J.D.; Allen, A.G.; May, J.P.; Bolitho, S.; Lindsay, H.; Maskell, D.J. Mutagenesis of *Streptococcus equi* and *Streptococcus suis* by transposon Tn917. *Vet Microbiol* 2003, *93*, 197-206, doi:10.1016/s0378-1135(03)00030-0.
23. Lecours, M.P.; Gottschalk, M.; Houde, M.; Lemire, P.; Fittipaldi, N.; Segura, M. Critical role for *Streptococcus suis* cell wall modifications and suilysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells. *J Infect Dis* 2011, *204*, 919-929, doi:10.1093/infdis/jir415.
24. Mathieu-Denoncourt, A.; Letendre, C.; Auger, J.P.; Segura, M.; Aragon, V.; Lacouture, S.; Gottschalk, M. Limited Interactions between *Streptococcus Suis* and *Haemophilus Parasuis* in *In Vitro* Co-Infection Studies. *Pathogens* 2018, *7*, doi:10.3390/pathogens7010007.
25. Wang, Y.; Gagnon, C.A.; Savard, C.; Music, N.; Srednik, M.; Segura, M.; Lachance, C.; Bellehumeur, C.; Gottschalk, M. Capsular sialic acid of *Streptococcus suis* serotype 2 binds to swine influenza virus and enhances bacterial interactions with virus-infected tracheal epithelial cells. *Infect Immun* 2013, *81*, 4498-4508, doi:10.1128/IAI.00818-13.

26. Dang, Y.; Lachance, C.; Wang, Y.; Gagnon, C.A.; Savard, C.; Segura, M.; Grenier, D.; Gottschalk, M. Transcriptional approach to study porcine tracheal epithelial cells individually or dually infected with swine influenza virus and *Streptococcus suis*. BMC Vet Res 2014, 10, 86, doi:10.1186/1746-6148-10-86.
27. Martelet, L.; Lacouture, S.; Goyette-Desjardins, G.; Beauchamp, G.; Surprenant, C.; Gottschalk, M.; Segura, M. Porcine Dendritic Cells as an *In Vitro* Model to Assess the Immunological Behaviour of *Streptococcus suis* Subunit Vaccine Formulations and the Polarizing Effect of Adjuvants. Pathogens 2017, 6, doi:10.3390/pathogens6010013.
28. Lecours, M.P.; Segura, M.; Lachance, C.; Mussa, T.; Surprenant, C.; Montoya, M.; Gottschalk, M. Characterization of porcine dendritic cell response to *Streptococcus suis*. Vet Res 2011, 42, 72, doi:10.1186/1297-9716-42-72.
29. Corsaut, L.; Misener, M.; Canning, P.; Beauchamp, G.; Gottschalk, M.; Segura, M. Field Study on the Immunological Response and Protective Effect of a Licensed Autogenous Vaccine to Control *Streptococcus suis* Infections in Post-Weaned Piglets. Vaccines (Basel) 2020, 8, doi:10.3390/vaccines8030384.
30. Liu, W.; Zhou, D.; Yuan, F.; Liu, Z.; Duan, Z.; Yang, K.; Guo, R.; Li, M.; Li, S.; Fang, L.; et al. Surface proteins mhp390 (P68) contributes to cilium adherence and mediates inflammation and apoptosis in *Mycoplasma hyopneumoniae*. Microb Pathog 2019, 126, 92-100, doi:10.1016/j.micpath.2018.10.035.
31. Xiong, Q.; Zhang, B.; Wang, J.; Ni, B.; Ji, Y.; Wei, Y.; Xiao, S.; Feng, Z.; Liu, M.; Shao, G. Characterization of the role in adherence of *Mycoplasma hyorhinis* variable lipoproteins containing different repeat unit copy numbers. Vet Microbiol 2016, 197, 39-46, doi:10.1016/j.vetmic.2016.10.025.
32. Auger, J.P.; Payen, S.; Roy, D.; Dumesnil, A.; Segura, M.; Gottschalk, M. Interactions of *Streptococcus suis* serotype 9 with host cells and role of the capsular polysaccharide: Comparison with serotypes 2 and 14. PLoS One 2019, 14, e0223864, doi:10.1371/journal.pone.0223864.
33. Shapouri-Moghaddam, A.; Mohammadian, S.; Vazini, H.; Taghadosi, M.; Esmaeili, S.A.; Mardani, F.; Seifi, B.; Mohammadi, A.; Afshari, J.T.; Sahebkar, A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. J Cell Physiol 2018, 233, 6425-6440, doi:10.1002/jcp.26429.
34. Savina, A.; Amigorena, S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. Immunol Rev 2007, 219, 143-156, doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00552.x.
35. Chabot-Roy, G.; Willson, P.; Segura, M.; Lacouture, S.; Gottschalk, M. Phagocytosis and killing of *Streptococcus suis* by porcine neutrophils. Microb Pathog 2006, 41, 21-32, doi:10.1016/j.micpath.2006.04.001.
36. Auger, J.P.; Boa, A.C.; Segura, M.; Gottschalk, M. Antigen I/II Participates in the Interactions of *Streptococcus suis* Serotype 9 With Phagocytes and the Development of Systemic Disease. Front Cell Infect Microbiol 2019, 9, 124, doi:10.3389/fcimb.2019.00124.
37. Segura, M.A.; Cleroux, P.; Gottschalk, M. *Streptococcus suis* and group B *Streptococcus* differ in their interactions with murine macrophages. FEMS Immunol Med Microbiol 1998, 21, 189-195, doi:10.1111/j.1574-695X.1998.tb01165.x.

38. DeBey, M.C.; Ross, R.F. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infect Immun* 1994, 62, 5312-5318, doi:10.1128/iai.62.12.5312-5318.1994.
39. Thacker, E.L. Immunology of the porcine respiratory disease complex. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2001, 17, 551-565, doi:10.1016/s0749-0720(15)30006-2.
40. Fittipaldi, N.; Segura, M.; Grenier, D.; Gottschalk, M. Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. *Future Microbiol* 2012, 7, 259-279, doi:10.2217/fmb.11.149.
41. Hsu, T.; Minion, F.C. Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. *Infect Immun* 1998, 66, 4762-4766, doi:10.1128/IAI.66.10.4762-4766.1998.
42. Leal Zimmer, F.M.A.; Paes, J.A.; Zaha, A.; Ferreira, H.B. Pathogenicity & virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Virulence* 2020, 11, 1600-1622, doi:10.1080/21505594.2020.1842659.
43. Pan, Q.; Xu, Q.; Liu, T.; Zhang, Y.; Xin, J. *Mycoplasma hyopneumoniae* membrane protein Mhp271 interacts with host UPR protein GRP78 to facilitate infection. *Mol Microbiol* 2022, 118, 208-222, doi:10.1111/mmi.14963.
44. Park, C.; Jeong, J.; Kang, I.; Choi, K.; Park, S.J.; Chae, C. Increased fucosyl glycoconjugate by *Mycoplasma hyopneumoniae* enhances adherences of *Pasteurella multocida* type A in the ciliated epithelial cells of the respiratory tract. *BMC Vet Res* 2016, 12, 25, doi:10.1186/s12917-016-0650-7.
45. Ackermann, M.R.; Debey, M.C.; Debey, B.M. Bronchiolar metaplasia and Ulex europaeus agglutinin I (UEA-I) affinity in *Mycoplasma hyopneumoniae*-infected lungs of six pigs. *Vet Pathol* 1991, 28, 533-535, doi:10.1177/030098589102800611.
46. Wang, J.; Li, Y.; Pan, L.; Li, J.; Yu, Y.; Liu, B.; Zubair, M.; Wei, Y.; Pillay, B.; Olaniran, A.O.; et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) moonlights as an adhesin in *Mycoplasma hyorhinis* adhesion to epithelial cells as well as a plasminogen receptor mediating extracellular matrix degradation. *Vet Res* 2021, 52, 80, doi:10.1186/s13567-021-00952-8.
47. Beier, L.S.; Siqueira, F.M.; Schrank, I.S. Evaluation of growth and gene expression of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* in defined medium. *Mol Biol Rep* 2018, 45, 2469-2479, doi:10.1007/s11033-018-4413-3.
48. Viana, F.; O'Kane, C.M.; Schroeder, G.N. Precision-cut lung slices: A powerful *ex vivo* model to investigate respiratory infectious diseases. *Mol Microbiol* 2022, 117, 578-588, doi:10.1111/mmi.14817.
49. Haas, B.; Grenier, D. Understanding the virulence of *Streptococcus suis*: A veterinary, medical, and economic challenge. *Med Mal Infect* 2018, 48, 159-166, doi:10.1016/j.medmal.2017.10.001.
50. Varol, C.; Mildner, A.; Jung, S. Macrophages: development and tissue specialization. *Annu Rev Immunol* 2015, 33, 643-675, doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112220.
51. Bieber, K.; Autenrieth, S.E. Dendritic cell development in infection. *Mol Immunol* 2020, 121, 111-117, doi:10.1016/j.molimm.2020.02.015.

52. Houde, M.; Gottschalk, M.; Gagnon, F.; Van Calsteren, M.R.; Segura, M. *Streptococcus suis* capsular polysaccharide inhibits phagocytosis through destabilization of lipid microdomains and prevents lactosylceramide-dependent recognition. *Infect Immun* 2012, 80, 506-517, doi:10.1128/IAI.05734-11.
53. Charland, N.; Kobisch, M.; Martineau-Doize, B.; Jacques, M.; Gottschalk, M. Role of capsular sialic acid in virulence and resistance to phagocytosis of *Streptococcus suis* capsular type 2. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1996, 14, 195-203, doi:10.1111/j.1574-695X.1996.tb00287.x.
54. Li, J.; Wang, J.; Liu, Y.; Yang, J.; Guo, L.; Ren, S.; Chen, Z.; Liu, Z.; Zhang, Y.; Qiu, W.; et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus NADC30-like strain accelerates *Streptococcus suis* serotype 2 infection *in vivo* and *in vitro*. *Transbound Emerg Dis* 2019, 66, 729-742, doi:10.1111/tbed.13072.
55. Deeney, A.S.; Maglennon, G.A.; Chapat, L.; Crussard, S.; Jolivet, E.; Rycroft, A.N. *Mycoplasma hyopneumoniae* evades phagocytic uptake by porcine alveolar macrophages *in vitro*. *Vet Res* 2019, 50, 51, doi:10.1186/s13567-019-0667-6.
56. Caruso, J.P.; Ross, R.F. Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infections on alveolar macrophage functions in swine. *Am J Vet Res* 1990, 51, 227-231.
57. Bin, L.; Luping, D.; Bing, S.; Zhengyu, Y.; Maojun, L.; Zhixin, F.; Yanna, W.; Haiyan, W.; Guoqing, S.; Kongwang, H. Transcription analysis of the porcine alveolar macrophage response to *Mycoplasma hyopneumoniae*. *PLoS One* 2014, 9, e101968, doi:10.1371/journal.pone.0101968.
58. Bercier, P.; Gottschalk, M.; Grenier, D. *Streptococcus suis* suilysin compromises the function of a porcine tracheal epithelial barrier model. *Microb Pathog* 2020, 139, 103913, doi:10.1016/j.micpath.2019.103913.
59. Lun, S.; Perez-Casal, J.; Connor, W.; Willson, P.J. Role of suilysin in pathogenesis of *Streptococcus suis* capsular serotype 2. *Microb Pathog* 2003, 34, 27-37, doi:10.1016/s0882-4010(02)00192-4.
60. Tenenbaum, T.; Asmat, T.M.; Seitz, M.; Schrotten, H.; Schwerk, C. Biological activities of suilysin: role in *Streptococcus suis* pathogenesis. *Future Microbiol* 2016, 11, 941-954, doi:10.2217/fmb-2016-0028.
61. Votsch, D.; Willenborg, M.; Baumgartner, W.; Rohde, M.; Valentin-Weigand, P. *Bordetella bronchiseptica* promotes adherence, colonization, and cytotoxicity of *Streptococcus suis* in a porcine precision-cut lung slice model. *Virulence* 2021, 12, 84-95, doi:10.1080/21505594.2020.1858604.
62. Meng, F.; Wu, N.H.; Nerlich, A.; Herrler, G.; Valentin-Weigand, P.; Seitz, M. Dynamic Virus-Bacterium Interactions in a Porcine Precision-Cut Lung Slice Coinfection Model: Swine Influenza Virus Paves the Way for *Streptococcus suis* Infection in a Two-Step Process. *Infect Immun* 2015, 83, 2806-2815, doi:10.1128/IAI.00171-15.
63. Bai, F.; Ni, B.; Liu, M.; Feng, Z.; Xiong, Q.; Xiao, S.; Shao, G. *Mycoplasma hyopneumoniae*-derived lipid-associated membrane proteins induce apoptosis in porcine alveolar macrophage via increasing nitric oxide production, oxidative stress, and caspase-3 activation. *Vet Immunol Immunopathol* 2013, 155, 155-161, doi:10.1016/j.vetimm.2013.07.004.

64. Ni, B.; Bai, F.F.; Wei, Y.; Liu, M.J.; Feng, Z.X.; Xiong, Q.Y.; Hua, L.Z.; Shao, G.Q. Apoptosis induced by lipid-associated membrane proteins from *Mycoplasma hyopneumoniae* in a porcine lung epithelial cell line with the involvement of caspase 3 and the MAPK pathway. *Genet Mol Res* 2015, 14, 11429-11443, doi:10.4238/2015.September.25.10.
65. Browning, G.F.; Marena, M.S.; Noormohammadi, A.H.; Markham, P.F. The central role of lipoproteins in the pathogenesis of mycoplasmoses. *Vet Microbiol* 2011, 153, 44-50, doi:10.1016/j.vetmic.2011.05.031.
66. Kostyal, D.A.; Butler, G.H.; Beezhold, D.H. *Mycoplasma hyorhinis* molecules that induce tumor necrosis factor alpha secretion by human monocytes. *Infect Immun* 1995, 63, 3858-3863, doi:10.1128/iai.63.10.3858-3863.1995.
67. Kornspan, J.D.; Tsur, M.; Tarshis, M.; Rottem, S.; Brenner, T. *Mycoplasma hyorhinis* induces proinflammatory responses in mice lymphocytes. *J Basic Microbiol* 2015, 55, 679-684, doi:10.1002/jobm.201400287.
68. Thanawongnuwech, R.; Thacker, B.; Halbur, P.; Thacker, E.L. Increased production of proinflammatory cytokines following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004, 11, 901-908, doi:10.1128/CDLI.11.5.901-908.2004.

IV. Discussion

S. suis est un pathogène porcin important causant principalement des méningites et des septicémies chez les porcelets post-sevrés. C'est également un agent zoonotique impliqué dans des cas de méningites et de choc septique (1, 5). *S. suis* colonise le tractus respiratoire des porcelets et est retrouvé principalement au niveau des amygdales et des cavités nasales des porcs du monde entier (5, 25). La bactérie n'est pas un pathogène respiratoire stricte, mais elle a pu être retrouvée dans des cas de pneumonies et elle est donc considérée comme un agent pathogène secondaire (4, 183). On retrouve au sein des souches de *S. suis* une grande variété phylogénétique et les souches de *S. suis* sont divisées en plusieurs sérotypes. Le sérotype 2 est le sérotype le plus étudié, car il est le plus fréquemment isolé de cas cliniques porcins et humains. Les études sur la pathogénèse de *S. suis* se sont surtout focalisées sur le type hautement virulent chinois ST7 ou le type virulent ST1 Européen de sérotype 2 (7). C'est pourquoi le type ST1 Européen a été choisi dans ce projet. De plus, il est difficile de définir une liste précise des « vrais » facteurs de virulence présents chez *S. suis*, car en fonction de la souche utilisée, du modèle d'étude utilisé, de la voie d'inoculation utilisée et de la lignée cellulaire utilisée les résultats ne seront pas les mêmes d'une étude à l'autre (2). Cependant, la capsule et l'hémolysine suilysine (toxine retrouvée chez la majorité des souches Européennes de type ST1) de *S. suis* sont des facteurs de virulence impliqués dans la pathogénèse de la bactérie. En effet, *S. suis* est capable de survivre dans la circulation sanguine principalement grâce à sa capsule et peut également échapper à la phagocytose induite par les macrophages/monocytes, neutrophiles et les cellules dendritiques retrouvés dans la circulation sanguine (1, 2, 6, 9, 171, 172). L'hémolysine de *S. suis* a une action cytotoxique sur différents types cellulaires comme les microglies, les astrocytes, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les BMEC et les macrophages (1, 5, 6, 9, 71, 165). De plus, cette toxine favorise l'adhésion et l'invasion des monocytes humains (1, 6, 9) et des cellules épithéliales différenciées porcines d'un modèle de culture ALI (74). Enfin, *S. suis* a la capacité d'induire la production de nombreuses molécules de l'inflammation par les macrophages et les cellules dendritiques (168, 169, 172) conduisant à une inflammation exacerbée délétère pour l'hôte.

M. hyopneumoniae est l'agent étiologique de la pneumonie enzootique et l'agent initiateur du PRDC. En effet, ce pathogène est capable de prédisposer les porcs à d'autres infections

bactériennes ou virales (15, 17). *M. hyopneumoniae* va adhérer à la surface des cellules ciliées présentes dans le tractus respiratoire des porcs grâce à des adhésines de surface et va induire une réduction de l'activité ciliaire, qui se traduit par une ciliostase, la disparition progressive des cils, une production abondante de mucus et éventuellement la mort des cellules épithéliales (22, 116). Ce processus va endommager la barrière épithéliale des porcs pouvant créer un passage pour d'autres micro-organismes pathogènes. De plus, lorsque *M. hyopneumoniae* est présent dans les poumons il est capable de moduler le système immunitaire soit en induisant une immunostimulation soit une immunosuppression. En effet, *M. hyopneumoniae* comme *S. suis* induit une réponse inflammatoire importante lorsque le pathogène est reconnu par les PAMs ou les DC (15, 22, 99, 177). Il est suggéré qu'une forte production de cytokines pro-inflammatoires peut conduire aux dommages cellulaires retrouvés dans les poumons au niveau des lésions pulmonaires (15, 22). De plus, il a été mis en évidence que *M. hyopneumoniae* n'est pas facilement phagocyté par les macrophages alvéolaires porcins retrouvés dans les poumons (21, 118). Cette bactérie est également capable d'induire un effet immunosuppresseur sur le système immunitaire afin de persister plus longtemps chez son hôte et de favoriser l'infection d'autres pathogènes. En effet, *M. hyopneumoniae* peut induire un effet apoptotique (mort cellulaire programmée) sur les macrophages alvéolaires, les monocytes et les lymphocytes. Il a été décrit également que les LAMPs de *M. hyopneumoniae* ont un effet apoptotique sur une lignée cellulaire immortalisée SJPL (15, 22, 123, 125, 213). On retrouve également une différence de virulence parmi les isolats de *M. hyopneumoniae*. C'est pourquoi dans cette étude nous avons utilisé la souche 682 qui a été isolée d'un élevage en 2016, hébergeant des porcs présentant des difficultés respiratoires et présentant un contrôle abattoir avec des notes de pneumonie très élevée.

M. hyorhinis est également un pathogène porcine induisant des polysérosites (péricardite, pleurésie, péritonite et arthrite) chez les porcelets post-sevrés (23, 84). Peu de choses sont connues sur la pathogénèse de *M. hyorhinis*, mais on sait qu'il est capable d'adhérer à la surface des cellules épithéliales du tractus respiratoire des porcs grâce à un répertoire varié de lipoprotéines de surface Vlp (95, 96). Les lipoprotéines de surface lui permettent d'échapper aux cellules du système immunitaire. En effet, il a été mis en évidence que *M. hyorhinis* exprimant de longues lipoprotéines à sa surface, est protégé contre les anticorps retrouvés dans le sérum de

porcs infectés (91, 100). De plus, les lipoprotéines de *M. hyorhinis* vont être reconnus par le système immunitaire et induire la production de nombreuses cytokines inflammatoires (94, 101, 102). *M. hyorhinis* est également lié à des cas de cancers humains et il a été montré que la bactérie pouvait induire un effet apoptotique sur les cellules cancéreuses (103, 104). De plus, *M. hyorhinis* a été retrouvé dans des cas de pneumonie en présence de *M. hyopneumoniae*, mais son rôle dans l'induction de la pneumonie reste controversé. En effet, *M. hyorhinis* pourrait induire des lésions pulmonaires, mais dans une moindre mesure que *M. hyopneumoniae*. Lorsque *M. hyorhinis* est en co-infection avec *M. hyopneumoniae*, il n'augmente pas la gravité de la pneumonie induite par *M. hyopneumoniae*, mais altère la réponse du système immunitaire (17). Il existe également une hétérogénéité au sein des isolats de *M. hyorhinis*. En effet, ils présentent à leur surface une grande variété antigénique et des différences de virulence ont été constatées dans des modèles *in vivo* (87). C'est pourquoi nous avons utilisé dans notre étude la souche 380, isolé d'un troupeau en 2016, hébergeant des porcs présentant des difficultés respiratoires et présentant un contrôle abattoir avec des scores de lésions pulmonaires élevés.

S. suis, *M. hyopneumoniae* et *M. hyorhinis* sont retrouvés au sein du PRDC et ces trois pathogènes sont présents au niveau du tractus respiratoire des porcs. Le PRDC est un trouble multifactoriel, coûteux pour les industries porcines du monde entier, principalement dû à une infection simultanée ou séquentielle de divers micro-organismes. Les co-infections sont fréquemment retrouvées dans les élevages porcins exacerbant ou prolongeant les signes cliniques des porcs. En effet, de nombreuses études mettent en évidence des co-infections impliquant *S. suis* et d'autres bactéries comme *A. pleuropneumoniae* (196) et *B. bronchiseptica* (197) ou des virus comme le PRRSV (13, 181-186), le swIAV (14, 187-190) et le PCV2 (192, 193), exacerbant la pathogénèse de *S. suis*. On retrouve également des co-infections impliquant *M. hyopneumoniae* et le PRRSV (199-201, 203), le PCV2 (208), le swIAV (204-206) et *A. pleuropneumoniae* (195, 214) ainsi que *M. hyorhinis* et les virus PRRSV (16) et PCV2 (210) induisant une augmentation des signes cliniques et de la réponse inflammatoire. De plus, la dynamique mise en place lors des co-infections entre les pathogènes et la réponse immunitaire mise en place par l'hôte face à ces pathogènes n'est pas très bien comprise. C'est pourquoi, dans notre projet nous avons étudié l'impact des mycoplasmes porcins sur les premières étapes de colonisation de *S. suis* ainsi que sur la réponse

immunitaire mise en place par les macrophages alvéolaires et les cellules dendritiques porcines face à ces pathogènes.

- **La pré-infection des NPTr par *M. hyopneumoniae* et/ou *M. hyorhinis* n'a pas augmenté l'adhésion et l'invasion de *S. suis***

Les premières étapes dans une infection invasive à *S. suis* chez le porc, sont l'adhésion et l'invasion du tractus respiratoire. Dans la revue de Segura et *al.* (5), il est énuméré plus de 30 protéines de *S. suis* responsables de l'adhésion bactérienne à différentes lignées cellulaires épithéliales chez le porc et chez l'humain (NPTr, Hep-2, HeLa). La bactérie aurait également la capacité d'envahir les cellules épithéliales, cependant cette capacité reste controversée dans la littérature (6). Pour les mycoplasmes porcins de ce projet, l'adhésion est également la première étape de leurs pathogénèses. En effet, *M. hyopneumoniae* est capable d'adhérer à la surface des cellules épithéliales grâce à des adhésines (120), conduisant à la réduction de l'activité ciliaire, suivie d'une ciliostase, de la disparition progressive des cils associée à une intense production de mucus (116). Cette diminution d'activité ciliaire pourrait faciliter la colonisation des agents pathogènes retrouvés chez le porc comme *A. pleuropneumoniae*, *P. multocida*, *G. parasuis* (20). De plus, il a été montré que *M. hyopneumoniae* pouvait faciliter l'attachement de *P. multocida* type A à l'épithélium respiratoire (211). Pour *M. hyorhinis* peu de choses sont actuellement documentés sur sa pathogénèse, mais on sait que les lipoprotéines de surface ainsi que la glycéraldéhyde-3-phosphate de cette bactérie, va lui permettre d'adhérer aux cellules épithéliales (95, 97). Enfin, il a été montré que la pré-infection des cellules épithéliales par le SIV améliorait l'adhésion et l'invasion de *S. suis* (14). C'est pourquoi, il est intéressant d'étudier l'effet de la pré-infection de *M. hyopneumoniae* et/ou *M. hyorhinis* sur l'adhésion et l'invasion de *S. suis*.

Cependant, comme on peut le voir avec la figure n°1 de l'article scientifique, la pré-infection des cellules NPTr par *M. hyopneumoniae* et/ou *M. hyorhinis* n'a pas augmenté l'adhésion et l'invasion de *S. suis*. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans une étude de co-infection entre *G. parasuis* et *S. suis* (8). Des études mettent en évidence l'utilisation de modèles potentiellement mieux adaptés pour l'étude de la colonisation de *S. suis* dans le tractus respiratoire. En effet, la présence des cils et de la bonne activité ciliaire des cellules NPTr n'est pas assurée, ce qui pourrait potentiellement empêcher la bonne adhésion de *M. hyopneumoniae* et/ou *M. hyorhinis*, ainsi

empêchant d'induire les dommages cellulaires. En effet, une étude de Meng et *al.*, a mis en évidence avec un modèle *ex-vivo* de cellules épithéliales respiratoires différenciées (PCLS) que l'adhésion de *S. suis* a été efficacement améliorée par la pré-infection du *SIV* (189). Cependant, l'étude de Wang et *al.* (14), en utilisant le même modèle d'étude que dans ce projet, a mis en évidence que l'adhésion et l'invasion de *S. suis* étaient fortement améliorées par la pré-infection par le *SIV*. Il serait également intéressant de réaliser cette expérience avec des souches ne possédant pas la suilysine pour voir si l'adhésion et l'invasion de *S. suis* seraient augmentées. Récemment, une étude montre que la pré-infection des cellules épithéliales respiratoires porcines primaires différenciées sous interface air-liquide (ALI) par le *SIV* augmente l'adhésion et l'invasion d'une souche de *S. suis* déficiente en suilysine (190).

De plus, les mycoplasmes possèdent un génome de taille réduite limitant la synthèse de nombreux composés essentiels à leur croissance (77, 78). Ces composés sont apportés par le milieu de culture des mycoplasmes (milieu de Friis) qui est riche et complexe. Or, lors de la pré-infection des mycoplasmes avec les NPTr, ceux-ci vont devoir croître dans un milieu spécifique aux cellules et non aux mycoplasmes. Ce changement de milieu de culture pourrait potentiellement empêcher la bonne expression des protéines d'adhésion de *M. hyopneumoniae* et *M. hyorhinis* empêchant ainsi d'induire les dommages aux cellules. En effet, lors de stress environnementaux certains gènes de *M. hyopneumoniae* peuvent être régulés à la hausse ou à la baisse. Cependant, la viabilité des mycoplasmes n'a pas été affectée dans les différents milieux de culture utilisés aussi bien pour les cellules NPTr que pour les PAMs et les BM-DCs (voir tableau n°1 supplémentaire dans l'article scientifique). En effet, le nombre des mycoplasmes n'a pas diminué et dans certains cas à même augmenter dans les différents milieux de culture après 24 h de pré-infection.

En revanche, notre étude a confirmé le rôle de la CPS dans la diminution de l'adhésion et l'invasion de *S. suis* puisque des différences ont été observées entre les résultats obtenus avec la souche sauvage encapsulée et la souche non-encapsulée (voir figure n°1 dans l'article). Des études ont permis de mettre en évidence que la CPS pouvait cacher les protéines impliquées dans l'adhésion de *S. suis* ce qui suggère qu'elle pourrait réduire l'adhésion de *S. suis* (5, 6). Enfin, le temps de pré-infection de 24 h pour les mycoplasmes a été choisi en fonction de protocoles expérimentaux

décrits dans la littérature, mais on peut supposer que ce temps de pré-infection n'était pas assez long pour la bonne adhésion des mycoplasmes aux cellules. C'est pourquoi un temps de pré-infection de 48 h a été testé avec *M. hyopneumoniae* (voir figure n°1 en annexe), décrivant comment l'adhésion de *S. suis* n'a pas été augmentée après la pré-infection des cellules NPTr par *M. hyopneumoniae* pendant 48 h.

L'effet des mycoplasmes sur l'adhésion et l'invasion de *S. suis* pourrait également être testé en présence de souches présentant une virulence plus faible que la souche de type ST1 utilisée dans cette étude. En effet, il a été montré dans une étude que l'infection précoce de *S. suis* sérotype 2 chez des porcs pouvait augmenter la pathogénèse d'une souche asiatique de *PRRSV* non mortelle pour les porcs : dans les groupes co-infectés, il a été observé une augmentation de la morbidité et mortalité des porcs avec une réponse inflammatoire et des lésions tissulaires plus importantes (185).

- **La pré-infection des PAMs et BM-DCs par *M. hyopneumoniae* et/ou *M. hyorhinis* n'a pas diminué la phagocytose de *S. suis* et n'a pas permis d'augmenter sa survie intracellulaire**

Après avoir traversé la barrière épithéliale, les trois agents pathogènes vont disséminer à travers l'organisme. Le poumon est en contact constant avec des agents pathogènes, les cellules phagocytaires comme les PAMs vont jouer un rôle essentiel dans l'élimination des agents pathogènes. Les cellules dendritiques jouent un rôle de sentinelles dans tout l'organisme, ces cellules vont également se retrouver dans les poumons et induire l'élimination des agents pathogènes. La résistance des micro-organismes à ces mécanismes (phagocytose et survie intracellulaire) peut jouer un rôle essentiel dans la pathogénèse. C'est pourquoi, la phagocytose et la survie intracellulaire de *S. suis* par les PAMs et les BM-DCs pré-infectés par *M. hyopneumoniae* et/ou *M. hyorhinis*, ont été étudiées.

On sait que *S. suis* est peu phagocyté par les PAMs et les BM-DCs en condition non opsonisante grâce à sa capsule (171, 172, 215). L'étude de Houde et *al.*, démontre que *S. suis* encapsulé pourrait perturber les radeaux lipidiques présents à la surface des macrophages murins empêchant le déclenchement des mécanismes de la phagocytose (167). Notre étude (voir figure n°2 de l'article), permet de confirmer que l'absence de capsule, augmente la phagocytose de *S.*

suis par les PAMs et les BM-DCs (8, 172). L'étude de Bin et *al.*, met en évidence l'expression modifiée de plus de 2 000 gènes des PAMs à la suite d'une infection à *M. hyopneumoniae* (216). On peut alors supposer que *M. hyopneumoniae* pourrait induire un changement dans les gènes impliqués dans les mécanismes de phagocytose. Une étude a mis en évidence que les PAMs pré-infectés par *M. hyopneumoniae* était moins capable de phagocyter *A. pleuropneumoniae* (214). Cependant, la pré-infection des PAMs et des BM-DCs par *M. hyopneumoniae* et/ou *M. hyorhinis* n'a pas diminué le taux de phagocytose de *S. suis* en présence du plasma frais de porc ou en présence du plasma inactivé par la chaleur (voir figure n°2 dans l'article). Les mêmes résultats ont été observés sans plasma de porc, où le taux de phagocytose de *S. suis* était quasiment similaires au taux de phagocytose en présence du plasma inactivé (voir figure n°2 dans l'annexe). Cependant, l'étude a permis de confirmer le rôle du complément en augmentant la phagocytose de *S. suis* par les PAMs et les BM-DCs (voir figure n°2 de l'article) (172). Des études contradictoires sur la phagocytose de *S. suis* ont été décrites dans la littérature. En effet, une étude a mis en évidence que les BM-DCs pré-infectées par le *PRRSV* pouvait diminuer la phagocytose de *S. suis* (181). Cependant, une autre étude a mis en évidence que les BM-DCs, également pré-infectées par le *PRRSV* pouvait augmenter la phagocytose de *S. suis* (13).

Les résultats de notre étude, peuvent également supposer que les mycoplasmes et *S. suis* ne sont pas reconnues par les mêmes récepteurs cellulaires. Cependant, des études mettent en évidence que *S. suis* peut être reconnue par le récepteur TLR-2 en associant le récepteur CD14 (10, 11). Et *M. hyopneumoniae* peut être reconnu par les récepteurs TLR-2 et 6 (99) mais de nombreux autres récepteurs existent à la surface des PAMs (voir la figure n°8 de la revue de littérature) et des BM-DCs. En effet, les DC immatures présentent à leur surface un large éventail de récepteurs phagocytaires et un nombre important et diversifié de récepteurs TLR (139). À la surface des PAMs on peut également retrouver d'autres récepteurs impliqués dans la reconnaissance, mais aussi dans l'internalisation des micro-organismes. En effet, le récepteur Sn joue un rôle important dans la capture et l'internalisation des agents pathogènes en se liant aux résidus d'acide sialique (qui est présent dans la CPS de *S. suis*) (152). Le récepteur CD163 retrouvé à la surface des PAMs peut reconnaître des bactéries à coloration de Gram négative et positive (*Escherichia coli* et *Streptococcus mutans*) (157, 158).

Les PAMs et BM-DCs ont la capacité, après la phagocytose, d'éliminer les agents pathogènes dans les phagolysosomes. En effet, de nombreuses enzymes sont présentes dans les phagolysosomes des cellules immunitaires comme les glycosidases (telles que la galactosidase, la mannosidase, la glucuronidase et l'hexosaminidase) et les protéases (y compris les cathepsines B, L, H et S, la furine et la dipeptidyl peptidase II) pour les PAMs (138). Les phagosomes des DC présentent diverses endopeptidases, exopeptidases, estérases et réductases, telles que la thiol réductase lysosomale. On y retrouve également des ROS (139). Comme décrit précédemment, *M. hyopneumoniae* pourrait perturber l'expression génique des PAMs et donc pourrait jouer un rôle sur l'assemblage du phagosome et du lysosome ou sur la bonne expression des enzymes présentes dans le phagolysosome. Or, dans notre étude nous avons pu montrer que la pré-infection des PAMs et BM-DCs par *M. hyopneumoniae* et/ou *M. hyorhinis* n'augmentait pas la survie intracellulaire de *S. suis* (voir figure n°3 de l'article scientifique) et la bactérie n'a survécu que quelques heures en présence des cellules immunitaires. De plus, la capsule de *S. suis* n'a pas influencé sa survie intracellulaire. Dans la littérature, il a été rapporté que la pré-infection par le PRRSV soit augmentait la survie intracellulaire de *S. suis* (181) soit n'avait aucun effet sur sa survie intracellulaire (13).

- **La pré-infection des NPTr, des PAMs et des BM-DCs par *M. hyopneumoniae* et/ou *M. hyorhinis* augmente significativement la cytotoxicité des cellules**

La suilysine (hémolysine) de *S. suis* est la seule exotoxine identifiée chez cette bactérie présente principalement chez les souches virulentes d'Europe et d'Asie (2). Comme dit précédemment cette exotoxine a un effet cytotoxique sur différents types cellulaires. Récemment, il a été montré que la suilysine de *S. suis* perturbait l'intégrité de la barrière épithéliale trachéale de porc ce qui pourrait faciliter la dissémination de la bactérie et le passage d'autres agents pathogènes (72). Deux études ont mis en évidence que la co-infection de *S. suis* et du SIV ainsi que la co-infection de *S. suis* et de *B. bronchiseptica* augmentaient la toxicité causée par *S. suis* seul (189, 197). Une étude mentionne le fait que *M. hyorhinis* aurait un effet cytotoxique sur les BM-DCs (177). De plus, la colonisation de *M. hyopneumoniae* sur les cellules ciliées endommage la barrière épithéliale ce qui pourrait être considéré comme un effet toxique sur ces cellules. Les cellules endommagées ou en train de mourir peuvent relarguer une enzyme : la lactate déshydrogénase

(LDH). C'est pourquoi on s'est intéressé à l'effet de la co-infection de *M. hyopneumoniae* et/ou *M. hyorhinis* et *S. suis* sur les cellules porcines en mesurant le taux de LDH libérée dans le milieu extracellulaire.

Avec cette étude, on a pu mettre en évidence un effet cytotoxique significativement augmenté lorsque les cellules NPTr ont été pré-infectées avec les mycoplasmes puis infectées avec *S. suis* après 18 h et 24 h d'incubation. Nous avons également montré un effet cytotoxique significativement augmenté lorsque les PAMs ont été pré-infectés avec *M. hyopneumoniae* et/ou *M. hyorhinis* puis infectés avec *S. suis* après 8 h, 10 h et 12 h d'incubation (voir figure n°4 de l'article scientifique). En revanche, on observe une augmentation significative de la cytotoxicité pour les BM-DCs seulement lorsque les cellules ont été pré-infectées avec *M. hyopneumoniae* et *M. hyorhinis* puis infectées avec *S. suis* après 6 h d'incubation (voir figure n°1 supplémentaire de l'article scientifique). De plus, on remarque que *S. suis* seul induit un pourcentage élevé de cytotoxicité sur les PAMs et les BM-DCs. En revanche, les cellules NPTr étaient plus résistantes à la toxicité induite par *S. suis* seul, mais après la pré-infection des cellules avec les mycoplasmes, la cytotoxicité est fortement augmentée, avec des valeurs élevées. Il a été montré dans la littérature, que les souches de types Européennes seules ont un effet cytotoxique sur les cellules épithéliales. Ce qui est cohérent, car le modèle utilisé n'est pas le même : l'étude de la cytotoxicité observée après l'infection avec *S. suis* a été réalisée avec des cellules épithéliales humaines (217). Cependant, on remarque que l'effet cytotoxique est important et rapide avec les BM-DCs, suggérant que ces cellules sont plus sensibles que les PAMs et les cellules NPTr à cette co-infection. Ces résultats supposent que l'action des mycoplasmes et de *S. suis* induit d'importants dommages chez les cellules porcines. Les cellules endommagées peuvent relarguer des déchets dans le milieu extracellulaire ce qui pourrait attirer d'autres cellules du système immunitaire et induire par la suite un contexte inflammatoire important. De plus, le test LDH nous permet de mettre en évidence la mortalité des cellules, on peut donc se demander si les mycoplasmes n'induiraient pas la mort des cellules porcines par un mécanisme d'apoptose ou de nécrose.

- **La pré-infection par *M. hyopneumoniae* et/ou *M. hyorhinis* tend à augmenter l'effet apoptotique sur les BM-DCs**

Nous avons pu observer précédemment que la pré-infection des cellules NPTr, des PAMs et des BM-DCs par les mycoplasmes puis l'infection par *S. suis* induisaient une hausse importante de la cytotoxicité des cellules porcines. Il est avéré que les agents pathogènes ont développé des mécanismes pour moduler les voies de mort cellulaire afin d'éliminer les cellules immunitaires ou d'échapper aux défenses de l'hôte qui peuvent limiter l'infection (60). C'est pourquoi on s'est intéressé à l'effet de la pré-infection des cellules NPTr, PAMs et BM-DCs par *M. hyopneumoniae* et/ou *M. hyorhinis* sur les mécanismes d'induction de mort cellulaire, ce qui pourrait donner une explication sur la forte cytotoxicité observée.

Comme on peut le voir avec la figure n°3 A dans l'annexe, le taux d'apoptose précoce et tardive n'a pas été augmenté lorsque les cellules NPTr ont été pré-infectées avec *M. hyopneumoniae* et/ou *M. hyorhinis* puis infectées avec *S. suis*. De plus, on remarque que les cellules seules (non infectées avec les bactéries) montrent un pourcentage d'apoptose équivalant aux cellules pré-infectées avec les mycoplasmes et/ou infectées avec *S. suis*. Une étude met en évidence que les LAMPs de *M. hyopneumoniae* induisent de l'apoptose sur une lignée cellulaire épithéliale respiratoire porcine immortalisée (SJPL) avec un pourcentage maximum de 32,3 % (125). Cependant, cette étude n'a pas été réalisée avec le même modèle *in vitro* que dans notre étude et les auteurs ont utilisé seulement les lipoprotéines de surface de *M. hyopneumoniae* et non la bactérie entière ce qui pourrait expliquer la différence dans les résultats obtenus avec *M. hyopneumoniae* (le pourcentage d'apoptose de notre étude est d'environ 12,7 %).

Nous avons également pu constater que le taux d'apoptose précoce et tardive n'a pas été augmenté lorsque les PAMs ont été pré-infectées avec *M. hyopneumoniae* et/ou *M. hyorhinis* puis infectées avec *S. suis* (figure n°3 B de l'annexe). Le pourcentage d'apoptose est plus élevé lorsque les cellules ont seulement été pré-infectées avec *M. hyopneumoniae* ou *M. hyorhinis*. Le taux d'apoptose, pour les autres conditions, est identique aux taux d'apoptose observés avec les cellules seules. Il a été montré que *M. hyopneumoniae* peut induire une action apoptotique sur les macrophages alvéolaires et d'autres cellules du système immunitaire (15, 22, 123). En effet, l'étude de Bai et al. (123), met en évidence un taux d'apoptose d'environ 25 % lorsque les PAMs

ont été infectés avec *M. hyopneumoniae* et un taux d'apoptose supérieur lorsque les cellules ont été infectées avec ces LAMPs, alors que notre étude montre un pourcentage d'apoptose d'environ 18,7 %. Cependant, cette étude a été réalisée avec la lignée cellulaire PAM 3D4/21 et non des cellules primaires telles qu'utilisées dans notre étude et les conditions d'incubation de *M. hyopneumoniae* avec les PAMs étaient différentes. De plus, il est connu que les macrophages induisent de l'autofluorescence ce qui rend difficile l'interprétation de ces résultats.

En revanche, on observe une tendance (non significative) de l'augmentation du taux d'apoptose précoce et tardive lorsque les BM-DCs ont été pré-infectées avec *M. hyopneumoniae* et/ou *M. hyorhinis* puis infectées avec *S. suis* (figure n°3 C dans l'annexe). Ces résultats pourraient suggérer que la combinaison des mycoplasmes et de *S. suis* augmenterait l'apoptose des cellules dendritiques porcines permettant ainsi à ces bactéries d'échapper au système immunitaire. Cependant, comme on peut le voir dans la figure 4 dans l'annexe, l'association des mycoplasmes et de *S. suis* montre une forte toxicité envers les cellules et une perte importante des cellules dendritiques. D'autres tests restent à réaliser pour une meilleure compréhension de ce mécanisme comme la méthode Tunnel, l'observation des corps apoptotiques, la coloration du noyau au DAPI et l'analyse de l'expression des caspases.

- **La pré-infection des cellules NPT_r, des PAMs et des BM-DCs par *M. hyopneumoniae* et/ou *M. hyorhinis* augmente l'expression de l'IL-6 et/ou la CXCL-8**

Les trois pathogènes induisent chez le porc une réponse inflammatoire importante. En effet, *S. suis* encapsulé permet d'induire la libération par les DC porcins d'IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p40 et de TNF- α (172). On sait également que *M. hyopneumoniae* induit la stimulation et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 et TNF- α par les macrophages en expérimentation *in vitro* et *in vivo* (15, 22, 99). Il est suggéré qu'une forte production de cytokines pro-inflammatoires peut conduire aux dommages cellulaires retrouvés dans les lésions pulmonaires. Les lipoprotéines de *M. hyorhinis* induisent la production de TNF- α par une lignée de monocyte humain et induisent la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'INF- γ et l'IL-17 par des splénocytes de souris (94, 102). La stimulation des BM-DCs par *M. hyorhinis* induit également la production de l'IL-12 (177). De plus, dans des cas de co-infections

bactériennes et/ou virales la production de cytokines pro-inflammatoires est augmentée ce qui pourrait être nuisible pour les animaux co-infectés. En effet, des études de co-infections *in vitro* par *S. suis* et le *PRRSV* ou le *SIV* ont mis en évidence une augmentation des cytokines pro-inflammatoires (13, 14). La co-infection du *PRRSV* et de *M. hyopneumoniae* a mis également en évidence l'augmentation de l'expression des médiateurs de l'inflammation (200). Les cytokines IL-6 et IL-8 (CXCL8) sont des cytokines pro-inflammatoires importantes, c'est pourquoi l'expression relative par RT-qPCR de ces cytokines a été étudiée pour les NPT_r, PAMs et BM-DCs quand ces cellules ont été pré-infectées par *M. hyopneumoniae* et/ou *M. hyorhinis* puis infectées par *S. suis*.

Avec cette étude, on observe de manière générale que l'expression relative de l'IL-6 et de l'IL-8 est significativement augmentée lorsque les cellules NPT_r, les PAMs et les BM-DCs sont pré-infectées avec *M. hyopneumoniae* et/ou *M. hyorhinis* puis infectées avec *S. suis* comparé aux cellules seulement infectées par *S. suis* (voir figure n°5 de l'article scientifique). De manière générale, l'expression relative de l'IL-8 est plus importante pour les cellules NPT_r et les PAMs que l'expression relative de l'IL-6 (voir figure n°5 de l'article scientifique). En effet, la CXCL8 fait partie de la famille des chimiokines permettant ainsi d'envoyer un signal de détresse aux autres cellules du système immunitaire afin de les faire venir sur le site de l'infection. En revanche, l'expression relative de l'IL-8 par les BM-DCs est moins importante que l'expression relative de l'IL-6, ce qui pourrait être expliqué par le pourcentage de cytotoxicité mesuré après 6 h d'incubation avec un pourcentage maximal de 30 % pour les cellules pré-infectées par *M. hyopneumoniae* et *M. hyorhinis* puis infectées par *S. suis*. Les BM-DCs vont être plus dégradées que les deux autres types cellulaires donc potentiellement l'expression de l'IL-8 sera moindre. De plus, avec les résultats précédents on peut voir que les BM-DCs présentent un taux d'apoptose important ce qui peut possiblement réduire l'expression de la chimiokine IL-8. L'importante expression des cytokines pro-inflammatoires pourrait être le résultat d'une inflammation exacerbée ce qui pourrait être délétère chez l'hôte. Enfin, il a été montré dans cette étude (voir figure n°5 de l'article scientifique) que *M. hyorhinis* semble avoir une capacité d'induction des médiateurs de l'inflammation plus importante que *M. hyopneumoniae*, comme ce qui a été décrit dans la littérature (177).

De manière générale, les résultats *in vitro* obtenus indiquent qu'il est difficile d'affirmer qu'une pré-infection par *M. hyopneumoniae* et/ou *M. hyorhinis* induirait une tempête de cytokines après infection par *S. suis*. Il faut savoir que seuls quelques études ont montré la présence simultanée de ces mycoplasmes et de *S. suis* (218, 219) dans les lésions pulmonaires, même si ces bactéries sont couramment présentes dans de nombreux élevages porcins.

V. Conclusion et perspectives

Conclusion générale :

Ce projet de maîtrise a pu mettre en évidence que la pré-infection de *M. hyopneumoniae* et/ou *M. hyorhinis* :

- Induit une augmentation des médiateurs de l'inflammation, un effet apoptotique et à long terme un effet cytotoxique important sur les cellules porcines ce qui pourrait potentiellement nuire à la santé de l'hôte.
- N'a pas augmenté l'adhésion et l'invasion de *S. suis* avec les cellules NPTr.
- N'a pas diminué la phagocytose de *S. suis* par les PAMs et les BM-DCs :
 - ➔ En présence du plasma de porc frais, mais a permis de mettre en évidence que *S. suis* encapsulé est plus phagocyté par les PAMs et les BM-DCs en présence du complément. Cette étude a permis également de mettre en évidence que les PAMs ont une capacité plus importante de phagocyter *S. suis* que les BM-DCs.
 - ➔ En présence du plasma de porc inactivé par la chaleur.
 - ➔ Sans la présence du plasma de porc.
- N'a pas augmenté la survie intracellulaire de *S. suis* dans les PAMs et les BM-DCs. De plus, la capsule de *S. suis* n'a pas réussi à protéger la bactérie dans le phagolysosome des cellules.
- A permis d'augmenter la cytotoxicité des cellules NPTr, des PAMs et des BM-DCs. Ce qui pourrait potentiellement endommager la barrière épithéliale, induire une immunosuppression du système immunitaire et des lésions tissulaires plus importantes.
- A augmenté l'apoptose des BM-DCs (de façon non significative), ce qui pourrait conduire à un effet immunosuppresseur augmentant potentiellement la persistance des bactéries chez l'hôte. Cependant, des expériences approfondies sur les voies de mort cellulaire sont à réaliser.
- A augmenté l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-8 par les cellules porcines. Ce qui peut induire un contexte inflammatoire important, même s'il est difficile avec cette étude d'affirmer que la pré-infection des cellules par les mycoplasmes induit une tempête de cytokines importantes.

Perspectives :

- Réaliser une expérience *in vivo* afin de mettre en évidence un potentiel effet de la pré-infection des mycoplasmes puis de l'infection de *S. suis* sur la sévérité de la maladie ou l'augmentation de la morbidité et/ou de la mortalité.
- Réaliser les expériences *in vitro* avec des souches de *S. suis* ne produisant pas de suilysine et/ou présentant une virulence moindre que celle de la souche de type ST1 étudiée. Afin de mettre en évidence si la pré-infection des mycoplasmes aiderait une souche de virulence inférieure à exacerber sa pathogénèse.
- Utiliser un modèle d'étude *ex vivo* qui se rapproche plus des conditions naturelles, pour mettre en évidence la colonisation de *S. suis* : ALI ou PCLS. Observer également par microscopie confocale ou électronique comment les trois pathogènes peuvent adhérer aux cellules ciliées.
- Approfondir les analyses sur les mécanismes de mort cellulaire induite par cette co-infection en mesurant le taux d'expression des caspases, avec une technique Tunnel et en mesurant l'expression des gènes impliqués dans les voies de l'apoptose.
- Analyser l'expression des cytokines pro-inflammatoires par une technique ELISA afin de mettre en évidence la sécrétion des protéines dans le milieu extracellulaire. De plus, mesurer les cytokines anti-inflammatoires par RT-qPCR et ELISA pour l'IL-10 et l'IL-12 afin de mettre en évidence un éventuel effet immunosuppresseur de la co-infection.
- Pour finir, analyser les récepteurs et co-récepteurs de surface impliqués dans la présentation de l'antigène aux lymphocytes T. Afin de mettre en évidence si la pré-infection des mycoplasmes permet de diminuer la présentation peptique de *S. suis* type ST1 par le CMH-II et les co-récepteurs CD80/86 ce qui pourrait permettre une meilleure persistance de *S. suis* chez l'hôte.

Références bibliographiques

1. Haas B, Grenier D. Understanding the virulence of *Streptococcus suis*: A veterinary, medical, and economic challenge. *Med Mal Infect*. 2018;48(3):159-66.
2. Segura M, Fittipaldi N, Calzas C, Gottschalk M. Critical *Streptococcus suis* Virulence Factors: Are They All Really Critical? *Trends Microbiol*. 2017;25(7):585-99.
3. Higgins R, Gottschalk M. An update on *Streptococcus suis* identification. *J Vet Diagn Invest*. 1990;2(3):249-52.
4. Robertson ID, Blackmore DK. Experimental studies on the comparative infectivity and pathogenicity of *Streptococcus suis* type 2. I. Porcine and human isolates in pigs. *Epidemiol Infect*. 1990;105(3):469-78.
5. Segura M, Calzas C, Grenier D, Gottschalk M. Initial steps of the pathogenesis of the infection caused by *Streptococcus suis*: fighting against nonspecific defenses. *FEBS Lett*. 2016;590(21):3772-99.
6. Fittipaldi N, Segura M, Grenier D, Gottschalk M. Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. *Future Microbiol*. 2012;7(2):259-79.
7. Goyette-Desjardins G, Auger JP, Xu J, Segura M, Gottschalk M. *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent—an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. *Emerg Microbes Infect*. 2014;3(6):e45.
8. Mathieu-Denoncourt A, Letendre C, Auger JP, Segura M, Aragon V, Lacouture S, et al. Limited Interactions between *Streptococcus Suis* and *Haemophilus Parasuis* in *In Vitro* Co-Infection Studies. *Pathogens*. 2018;7(1).
9. Dutkiewicz J, Zajac V, Sroka J, Wasinski B, Cisak E, Sawczyn A, et al. *Streptococcus suis*: a re-emerging pathogen associated with occupational exposure to pigs or pork products. Part II - Pathogenesis. *Ann Agric Environ Med*. 2018;25(1):186-203.
10. Graveline R, Segura M, Radzioch D, Gottschalk M. TLR2-dependent recognition of *Streptococcus suis* is modulated by the presence of capsular polysaccharide which modifies macrophage responsiveness. *Int Immunol*. 2007;19(4):375-89.
11. Lecours MP, Segura M, Fittipaldi N, Rivest S, Gottschalk M. Immune receptors involved in *Streptococcus suis* recognition by dendritic cells. *PLoS One*. 2012;7(9):e44746.
12. Obradovic MR, Segura M, Segales J, Gottschalk M. Review of the speculative role of co-infections in *Streptococcus suis*-associated diseases in pigs. *Vet Res*. 2021;52(1):49.
13. Auray G, Lachance C, Wang Y, Gagnon CA, Segura M, Gottschalk M. Transcriptional Analysis of PRRSV-Infected Porcine Dendritic Cell Response to *Streptococcus suis* Infection Reveals Up-Regulation of Inflammatory-Related Genes Expression. *PLoS One*. 2016;11(5):e0156019.
14. Wang Y, Gagnon CA, Savard C, Music N, Srednik M, Segura M, et al. Capsular sialic acid of *Streptococcus suis* serotype 2 binds to swine influenza virus and enhances bacterial interactions with virus-infected tracheal epithelial cells. *Infect Immun*. 2013;81(12):4498-508.
15. Maes D, Sibila M, Kuhnert P, Segales J, Haesebrouck F, Pieters M. Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: Knowledge gaps for improved disease control. *Transbound Emerg Dis*. 2018;65 Suppl 1:110-24.
16. Lee JA, Oh YR, Hwang MA, Lee JB, Park SY, Song CS, et al. *Mycoplasma hyorhinis* is a potential pathogen of porcine respiratory disease complex that aggravates pneumonia caused by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol*. 2016;177:48-51.

17. Fourour S, Tocqueville V, Paboeuf F, Lediguerher G, Morin N, Kempf I, et al. Pathogenicity study of *Mycoplasma hyorhinis* and *M. flocculare* in specific-pathogen-free pigs pre-infected with *M. hyopneumoniae*. *Vet Microbiol.* 2019;232:50-7.
18. Wallgren P, Norregard E, Molander B, Persson M, Ehlorsson CJ. Serological patterns of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida* and *Streptococcus suis* in pig herds affected by pleuritis. *Acta Vet Scand.* 2016;58(1):71.
19. Choi YK, Goyal SM, Joo HS. Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs. *Can Vet J.* 2003;44(9):735-7.
20. Thacker EL. Immunology of the porcine respiratory disease complex. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2001;17(3):551-65.
21. Deeney AS, Maglennon GA, Chapat L, Crussard S, Jolivet E, Rycroft AN. *Mycoplasma hyopneumoniae* evades phagocytic uptake by porcine alveolar macrophages *in vitro*. *Vet Res.* 2019;50(1):51.
22. Liu W, Zhou D, Yuan F, Liu Z, Duan Z, Yang K, et al. Surface proteins mhp390 (P68) contributes to cilium adherence and mediates inflammation and apoptosis in *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Microb Pathog.* 2019;126:92-100.
23. Kobisch M, Friis NF. Swine mycoplasmoses. *Rev Sci Tech.* 1996;15(4):1569-605.
24. Hommez J, Devriese LA, Henrichsen J, Castryck F. Identification and characterization of *Streptococcus suis*. *Vet Microbiol.* 1986;11(4):349-55.
25. Okura M, Osaki M, Nomoto R, Arai S, Osawa R, Sekizaki T, et al. Current Taxonomical Situation of *Streptococcus suis*. *Pathogens.* 2016;5(3).
26. Hill JE, Gottschalk M, Brousseau R, Harel J, Hemmingsen SM, Goh SH. Biochemical analysis, cpn60 and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*. *Vet Microbiol.* 2005;107(1-2):63-9.
27. Nomoto R, Maruyama F, Ishida S, Tohya M, Sekizaki T, Osawa R. Reappraisal of the taxonomy of *Streptococcus suis* serotypes 20, 22 and 26: *Streptococcus parasuis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015;65(Pt 2):438-43.
28. Tohya M, Arai S, Tomida J, Watanabe T, Kawamura Y, Katsumi M, et al. Defining the taxonomic status of *Streptococcus suis* serotype 33: the proposal for *Streptococcus ruminantium* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017;67(9):3660-5.
29. Hatrongjit R, Fittipaldi N, Gottschalk M, Kerdsin A. Tools for Molecular Epidemiology of *Streptococcus suis*. *Pathogens.* 2020;9(2).
30. Okura M, Lachance C, Osaki M, Sekizaki T, Maruyama F, Nozawa T, et al. Development of a two-step multiplex PCR assay for typing of capsular polysaccharide synthesis gene clusters of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol.* 2014;52(5):1714-9.
31. Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Mittal KR, Henrichsen J. Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol.* 1989;27(12):2633-6.
32. Perch B, Pedersen KB, Henrichsen J. Serology of capsulated streptococci pathogenic for pigs: six new serotypes of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol.* 1983;17(6):993-6.
33. Lacouture S, Okura M, Takamatsu D, Corsaut L, Gottschalk M. Development of a mismatch amplification mutation assay to correctly serotype isolates of *Streptococcus suis* serotypes 1, 2, 1/2, and 14. *J Vet Diagn Invest.* 2020;32(3):490-4.
34. Smith HE, Veenbergen V, van der Velde J, Damman M, Wisselink HJ, Smits MA. The cps genes of *Streptococcus suis* serotypes 1, 2, and 9: development of rapid serotype-specific PCR assays. *J Clin Microbiol.* 1999;37(10):3146-52.
35. Kerdsin A, Akeda Y, Hatrongjit R, Detchawna U, Sekizaki T, Hamada S, et al. *Streptococcus suis* serotyping by a new multiplex PCR. *J Med Microbiol.* 2014;63(Pt 6):824-30.

36. Estrada AA, Gottschalk M, Rossow S, Rendahl A, Gebhart C, Marthaler DG. Serotype and Genotype (Multilocus Sequence Type) of *Streptococcus suis* Isolates from the United States Serve as Predictors of Pathotype. *J Clin Microbiol.* 2019;57(9).
37. Kerdsin A, Hatrongjit R, Gottschalk M, Takeuchi D, Hamada S, Akeda Y, et al. Emergence of *Streptococcus suis* serotype 9 infection in humans. *J Microbiol Immunol Infect.* 2017;50(4):545-6.
38. Athey TB, Auger JP, Teatero S, Dumesnil A, Takamatsu D, Wasserscheid J, et al. Complex Population Structure and Virulence Differences among Serotype 2 *Streptococcus suis* Strains Belonging to Sequence Type 28. *PLoS One.* 2015;10(9):e0137760.
39. Baele M, Chiers K, Devriese LA, Smith HE, Wisselink HJ, Vaneechoutte M, et al. The gram-positive tonsillar and nasal flora of piglets before and after weaning. *J Appl Microbiol.* 2001;91(6):997-1003.
40. Perez-Sancho M, Vela AI, Garcia-Seco T, Gonzalez S, Dominguez L, Fernandez-Garayzabal JF. Usefulness of MALDI-TOF MS as a Diagnostic Tool for the Identification of *Streptococcus* Species Recovered from Clinical Specimens of Pigs. *PLoS One.* 2017;12(1):e0170784.
41. Hatrongjit R, Akeda Y, Hamada S, Gottschalk M, Kerdsin A. Multiplex PCR for identification of six clinically relevant streptococci. *J Med Microbiol.* 2017;66(11):1590-5.
42. Marois C, Bougeard S, Gottschalk M, Kobisch M. Multiplex PCR assay for detection of *Streptococcus suis* species and serotypes 2 and 1/2 in tonsils of live and dead pigs. *J Clin Microbiol.* 2004;42(7):3169-75.
43. Okwumabua O, O'Connor M, Shull E. A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase. *FEMS Microbiol Lett.* 2003;218(1):79-84.
44. Perez-Sancho M, Vela AI, Garcia-Seco T, Gottschalk M, Dominguez L, Fernandez-Garayzabal JF. Assessment of MALDI-TOF MS as Alternative Tool for *Streptococcus suis* Identification. *Front Public Health.* 2015;3:202.
45. Berthelot-Herault F, Gottschalk M, Labbe A, Cariolet R, Kobisch M. Experimental airborne transmission of *Streptococcus suis* capsular type 2 in pigs. *Vet Microbiol.* 2001;82(1):69-80.
46. Pallares FJ, Halbur PG, Schmitt CS, Roth JA, Opriessnig T, Thomas PJ, et al. Comparison of experimental models for *Streptococcus suis* infection of conventional pigs. *Can J Vet Res.* 2003;67(3):225-8.
47. Nakayama T, Takeuchi D, Matsumura T, Akeda Y, Fujinaga Y, Oishi K. Alcohol consumption promotes the intestinal translocation of *Streptococcus suis* infections. *Microb Pathog.* 2013;65:14-20.
48. Ferrando ML, Fuentes S, de Greeff A, Smith H, Wells JM. ApuA, a multifunctional alpha-glucan-degrading enzyme of *Streptococcus suis*, mediates adhesion to porcine epithelium and mucus. *Microbiology (Reading).* 2010;156(Pt 9):2818-28.
49. Benga L, Goethe R, Rohde M, Valentin-Weigand P. Non-encapsulated strains reveal novel insights in invasion and survival of *Streptococcus suis* in epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2004;6(9):867-81.
50. Lalonde M, Segura M, Lacouture S, Gottschalk M. Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines. *Microbiology (Reading).* 2000;146 (Pt 8):1913-21.
51. Ferrando ML, de Greeff A, van Rooijen WJ, Stockhofe-Zurwieden N, Nielsen J, Wichgers Schreur PJ, et al. Host-pathogen Interaction at the Intestinal Mucosa Correlates With Zoonotic Potential of *Streptococcus suis*. *J Infect Dis.* 2015;212(1):95-105.
52. Ferrando ML, Schultsz C. A hypothetical model of host-pathogen interaction of *Streptococcus suis* in the gastro-intestinal tract. *Gut Microbes.* 2016;7(2):154-62.
53. Meng Y, Wang Q, Ma Z, Li W, Niu K, Zhu T, et al. Streptococcal autolysin promotes dysfunction of swine tracheal epithelium by interacting with vimentin. *PLoS Pathog.* 2022;18(8):e1010765.
54. Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part II: Role in Immunity. *Front Immunol.* 2015;6:257.

55. Gottschalk M, Xu J, Calzas C, Segura M. *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? *Future Microbiol.* 2010;5(3):371-91.
56. Vanier G, Segura M, Lecours MP, Grenier D, Gottschalk M. Porcine brain microvascular endothelial cell-derived interleukin-8 is first induced and then degraded by *Streptococcus suis*. *Microb Pathog.* 2009;46(3):135-43.
57. Gottschalk M, Segura M, Xu J. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. *Anim Health Res Rev.* 2007;8(1):29-45.
58. Kaczanowski S. Apoptosis: its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging. *Phys Biol.* 2016;13(3):031001.
59. Heckmann BL, Tummers B, Green DR. Crashing the computer: apoptosis vs. necroptosis in neuroinflammation. *Cell Death Differ.* 2019;26(1):41-52.
60. Wang S, Wang G, Tang YD, Li S, Qin L, Wang M, et al. *Streptococcus suis* Serotype 2 Infection Induces Splenomegaly with Splenocyte Apoptosis. *Microbiol Spectr.* 2022:e0321022.
61. Wang S, Lyu C, Duan G, Meng F, Yang Y, Yu Y, et al. *Streptococcus suis* Serotype 2 Infection Causes Host Immunomodulation through Induction of Thymic Atrophy. *Infect Immun.* 2020;88(4).
62. Liu H, Zhu S, Sun Y, Li N, Gu J, Sun C, et al. Selection of Potential Virulence Factors Contributing to *Streptococcus suis* Serotype 2 Penetration into the Blood-Brain Barrier in an *In Vitro* Co-Culture Model. *J Microbiol Biotechnol.* 2017;27(1):161-70.
63. Liu H, Lei S, Jia L, Xia X, Sun Y, Jiang H, et al. *Streptococcus suis* serotype 2 enolase interaction with host brain microvascular endothelial cells and RPSA-induced apoptosis lead to loss of BBB integrity. *Vet Res.* 2021;52(1):30.
64. Wu T, Jia L, Lei S, Jiang H, Liu J, Li N, et al. Host HSPD1 Translocation from Mitochondria to the Cytoplasm Induced by *Streptococcus suis* Serovar 2 Enolase Mediates Apoptosis and Loss of Blood-Brain Barrier Integrity. *Cells.* 2022;11(13).
65. Van Calsteren MR, Gagnon F, Lacouture S, Fittipaldi N, Gottschalk M. Structure determination of *Streptococcus suis* serotype 2 capsular polysaccharide. *Biochem Cell Biol.* 2010;88(3):513-25.
66. Van Calsteren MR, Gagnon F, Calzas C, Goyette-Desjardins G, Okura M, Takamatsu D, et al. Structure determination of *Streptococcus suis* serotype 14 capsular polysaccharide. *Biochem Cell Biol.* 2013;91(2):49-58.
67. Van Calsteren MR, Goyette-Desjardins G, Gagnon F, Okura M, Takamatsu D, Roy R, et al. Explaining the Serological Characteristics of *Streptococcus suis* Serotypes 1 and 1/2 from Their Capsular Polysaccharide Structure and Biosynthesis. *J Biol Chem.* 2016;291(16):8387-98.
68. Goyette-Desjardins G, Vinogradov E, Okura M, Takamatsu D, Gottschalk M, Segura M. Structure determination of *Streptococcus suis* serotypes 7 and 8 capsular polysaccharides and assignment of functions of the *cps* locus genes involved in their biosynthesis. *Carbohydr Res.* 2019;473:36-45.
69. Vinogradov E, Goyette-Desjardins G, Okura M, Takamatsu D, Gottschalk M, Segura M. Structure determination of *Streptococcus suis* serotype 9 capsular polysaccharide and assignment of functions of the *cps* locus genes involved in its biosynthesis. *Carbohydr Res.* 2016;433:25-30.
70. Goyette-Desjardins G, Vinogradov E, Okura M, Takamatsu D, Gottschalk M, Segura M. *Streptococcus suis* serotype 3 and serotype 18 capsular polysaccharides contain di-N-acetyl-bacillosamine. *Carbohydr Res.* 2018;466:18-29.
71. Vanier G, Segura M, Friedl P, Lacouture S, Gottschalk M. Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun.* 2004;72(3):1441-9.
72. Bercier P, Gottschalk M, Grenier D. *Streptococcus suis* suilysin compromises the function of a porcine tracheal epithelial barrier model. *Microb Pathog.* 2020;139:103913.
73. Fittipaldi N, Fuller TE, Teel JF, Wilson TL, Wolfram TJ, Lowery DE, et al. Serotype distribution and production of muramidase-released protein, extracellular factor and suilysin by field strains of *Streptococcus suis* isolated in the United States. *Vet Microbiol.* 2009;139(3-4):310-7.

74. Meng F, Wu NH, Seitz M, Herrler G, Valentin-Weigand P. Efficient suilysin-mediated invasion and apoptosis in porcine respiratory epithelial cells after streptococcal infection under air-liquid interface conditions. *Sci Rep.* 2016;6:26748.
75. Takamatsu D, Nishino H, Ishiji T, Ishii J, Osaki M, Fittipaldi N, et al. Genetic organization and preferential distribution of putative pilus gene clusters in *Streptococcus suis*. *Vet Microbiol.* 2009;138(1-2):132-9.
76. Rosengarten R, Citti C, Glew M, Lischewski A, Droesse M, Much P, et al. Host-pathogen interactions in mycoplasma pathogenesis: virulence and survival strategies of minimalist prokaryotes. *Int J Med Microbiol.* 2000;290(1):15-25.
77. Razin S, Hayflick L. Highlights of mycoplasma research--an historical perspective. *Biologicals.* 2010;38(2):183-90.
78. Citti C, Dordet-Frisoni E, Nouvel LX, Kuo CH, Baranowski E. Horizontal Gene Transfers in *Mycoplasmas* (Mollicutes). *Curr Issues Mol Biol.* 2018;29:3-22.
79. Gupta RS, Sawnani S, Adeolu M, Alnajjar S, Oren A. Phylogenetic framework for the phylum *Tenericutes* based on genome sequence data: proposal for the creation of a new order *Mycoplasmoidales* ord. nov., containing two new families *Mycoplasmoidaceae* fam. nov. and *Metamycoplasmataceae* fam. nov. harbouring *Eperythrozoon*, *Ureaplasma* and five novel genera. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2018;111(9):1583-630.
80. Parker AM, Sheehy PA, Hazelton MS, Bosward KL, House JK. A review of *mycoplasma* diagnostics in cattle. *J Vet Intern Med.* 2018;32(3):1241-52.
81. Sirand-Pugnet P, Citti C, Barre A, Blanchard A. Evolution of *mollicutes*: down a bumpy road with twists and turns. *Res Microbiol.* 2007;158(10):754-66.
82. Friis NF, Ahrens P, Hagedorn-Olsen T, Nielsen EO, Kokotovic B. *Mycoplasma hyopharyngis* isolation from swine. *Acta Vet Scand.* 2003;44(1-2):103-4.
83. Fourour S, Fablet C, Tocqueville V, Dorenlor V, Eono F, Eveno E, et al. A new multiplex real-time TaqMan((R)) PCR for quantification of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* and *M. flocculare*: exploratory epidemiological investigations to research mycoplasmal association in enzootic pneumonia-like lesions in slaughtered pigs. *J Appl Microbiol.* 2018;125(2):345-55.
84. Kobisch M, Marois C. Les mycoplasmoses porcines. 2008.
85. Scheiber T, Thacker B. *Mycoplasma hyosynoviae*, *Mycoplasma hyorhinis* and *Mycoplasma suis* overview: Disease basics, clinical presentations, diagnostics, treatments and prevention/ control strategies. 2012.
86. Clavijo MJ, Murray D, Oliveira S, Rovira A. Infection dynamics of *Mycoplasma hyorhinis* in three commercial pig populations. *Vet Rec.* 2017;181(3):68.
87. Clavijo MJ, Sreevatsan S, Johnson TJ, Rovira A. Molecular epidemiology of *Mycoplasma hyorhinis* porcine field isolates in the United States. *PLoS One.* 2019;14(10):e0223653.
88. Tocqueville V, Ferre S, Nguyen NH, Kempf I, Marois-Crehan C. Multilocus sequence typing of *Mycoplasma hyorhinis* strains identified by a real-time TaqMan PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2014;52(5):1664-71.
89. Clavijo MJ, Oliveira S, Zimmerman J, Rendahl A, Rovira A. Field evaluation of a quantitative polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma hyorhinis*. *J Vet Diagn Invest.* 2014;26(6):755-60.
90. Stakenborg T, Vicca J, Butaye P, Imberechts H, Peeters J, de Kruif A, et al. A multiplex PCR to identify porcine *mycoplasmas* present in broth cultures. *Vet Res Commun.* 2006;30(3):239-47.
91. Citti C, Wise KS. *Mycoplasma hyorhinis* vlp gene transcription: critical role in phase variation and expression of surface lipoproteins. *Mol Microbiol.* 1995;18(4):649-60.
92. Citti C, Watson-McKown R, Droesse M, Wise KS. Gene families encoding phase- and size-variable surface lipoproteins of *Mycoplasma hyorhinis*. *J Bacteriol.* 2000;182(5):1356-63.
93. Wise KS. Adaptive surface variation in mycoplasmas. *Trends Microbiol.* 1993;1(2):59-63.

94. Kornspan JD, Tsur M, Tarshis M, Rottem S, Brenner T. *Mycoplasma hyorhinis* induces proinflammatory responses in mice lymphocytes. *J Basic Microbiol.* 2015;55(5):679-84.
95. Xiong Q, Zhang B, Wang J, Ni B, Ji Y, Wei Y, et al. Characterization of the role in adherence of *Mycoplasma hyorhinis* variable lipoproteins containing different repeat unit copy numbers. *Vet Microbiol.* 2016;197:39-46.
96. Xiong Q, Wang J, Ji Y, Ni B, Zhang B, Ma Q, et al. The functions of the variable lipoprotein family of *Mycoplasma hyorhinis* in adherence to host cells. *Vet Microbiol.* 2016;186:82-9.
97. Wang J, Li Y, Pan L, Li J, Yu Y, Liu B, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) moonlights as an adhesin in *Mycoplasma hyorhinis* adhesion to epithelial cells as well as a plasminogen receptor mediating extracellular matrix degradation. *Vet Res.* 2021;52(1):80.
98. Wang J, Yu Y, Li Y, Li S, Wang L, Wei Y, et al. A multifunctional enolase mediates cytoadhesion and interaction with host plasminogen and fibronectin in *Mycoplasma hyorhinis*. *Vet Res.* 2022;53(1):26.
99. Browning GF, Marena MS, Noormohammadi AH, Markham PF. The central role of lipoproteins in the pathogenesis of mycoplasmoses. *Vet Microbiol.* 2011;153(1-2):44-50.
100. Citti C, Kim MF, Wise KS. Elongated versions of Vlp surface lipoproteins protect *Mycoplasma hyorhinis* escape variants from growth-inhibiting host antibodies. *Infect Immun.* 1997;65(5):1773-85.
101. Muhlradt PF, Kiess M, Meyer H, Sussmuth R, Jung G. Structure and specific activity of macrophage-stimulating lipopeptides from *Mycoplasma hyorhinis*. *Infect Immun.* 1998;66(10):4804-10.
102. Kostyal DA, Butler GH, Beezhold DH. *Mycoplasma hyorhinis* molecules that induce tumor necrosis factor alpha secretion by human monocytes. *Infect Immun.* 1995;63(10):3858-63.
103. Liu W, Shou C. *Mycoplasma hyorhinis* and *Mycoplasma fermentans* induce cell apoptosis and changes in gene expression profiles of 32D cells. *Biol Res.* 2011;44(4):383-91.
104. Obara H, Harasawa R. Nitric oxide causes anoikis through attenuation of E-cadherin and activation of caspase-3 in human gastric carcinoma AZ-521 cells infected with *Mycoplasma hyorhinis*. *J Vet Med Sci.* 2010;72(7):869-74.
105. Browning GF, Noormohammadi AH, Markham PF. Identification and Characterization of Virulence Genes in *Mycoplasmas* 2014.
106. Beko K, Felde O, Sulyok KM, Kreizinger Z, Hrivnak V, Kiss K, et al. Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma hyorhinis* strains isolated from swine in Hungary. *Vet Microbiol.* 2019;228:196-201.
107. Gautier-Bouchardon AV. Antimicrobial Resistance in *Mycoplasma* spp. *Microbiol Spectr.* 2018;6(4).
108. Martinson B, Zoghby W, Barrett K, Bryson L, Christmas R, Minion FC, et al. Efficacy of an inactivated *Mycoplasma hyorhinis* vaccine in pigs. *Vaccine.* 2018;36(3):408-12.
109. Wei YW, Zhu HZ, Huang LP, Xia DL, Wu HL, Bian HQ, et al. Efficacy in pigs of a new inactivated vaccine combining porcine circovirus type 2 and *Mycoplasma hyorhinis*. *Vet Microbiol.* 2020;242:108588.
110. Sibila M, Pieters M, Molitor T, Maes D, Haesebrouck F, Segales J. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Vet J.* 2009;181(3):221-31.
111. Charlebois A, Marois-Crehan C, Helie P, Gagnon CA, Gottschalk M, Archambault M. Genetic diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates of abattoir pigs. *Vet Microbiol.* 2014;168(2-4):348-56.
112. Mayor D, Jores J, Korczak BM, Kuhnert P. Multilocus sequence typing (MLST) of *Mycoplasma hyopneumoniae*: a diverse pathogen with limited clonality. *Vet Microbiol.* 2008;127(1-2):63-72.
113. Marois C, Dory D, Fablet C, Madec F, Kobisch M. Development of a quantitative Real-Time TaqMan PCR assay for determination of the minimal dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 116 required to induce pneumonia in SPF pigs. *J Appl Microbiol.* 2010;108(5):1523-33.
114. Marois C, Le Carrou J, Kobisch M, Gautier-Bouchardon AV. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. *Vet Microbiol.* 2007;120(1-2):96-104.

115. Feng ZX, Shao GQ, Liu MJ, Wang HY, Gan Y, Wu XS. Development and validation of a SIgA-ELISA for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Vet Microbiol.* 2010;143(2-4):410-6.
116. Hsu T, Minion FC. Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. *Infect Immun.* 1998;66(10):4762-6.
117. DeBey MC, Ross RF. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infect Immun.* 1994;62(12):5312-8.
118. Minion FC, Adams C, Hsu T. R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. *Infect Immun.* 2000;68(5):3056-60.
119. Seymour LM, Jenkins C, Deutscher AT, Raymond BB, Padula MP, Tacchi JL, et al. Mhp182 (P102) binds fibronectin and contributes to the recruitment of plasmin(ogen) to the *Mycoplasma hyopneumoniae* cell surface. *Cell Microbiol.* 2012;14(1):81-94.
120. Leal Zimmer FMA, Paes JA, Zaha A, Ferreira HB. Pathogenicity & virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Virulence.* 2020;11(1):1600-22.
121. Seymour LM, Deutscher AT, Jenkins C, Kuit TA, Falconer L, Minion FC, et al. A processed multidomain *mycoplasma hyopneumoniae* adhesin binds fibronectin, plasminogen, and swine respiratory cilia. *J Biol Chem.* 2010;285(44):33971-8.
122. Muneta Y, Minagawa Y, Shimoji Y, Ogawa Y, Hikono H, Mori Y. Immune response of gnotobiotic piglets against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Vet Med Sci.* 2008;70(10):1065-70.
123. Bai F, Ni B, Liu M, Feng Z, Xiong Q, Xiao S, et al. *Mycoplasma hyopneumoniae*-derived lipid-associated membrane proteins induce apoptosis in porcine alveolar macrophage via increasing nitric oxide production, oxidative stress, and caspase-3 activation. *Vet Immunol Immunopathol.* 2013;155(3):155-61.
124. Stennicke HR, Salvesen GS. Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1387(1-2):17-31.
125. Ni B, Bai FF, Wei Y, Liu MJ, Feng ZX, Xiong QY, et al. Apoptosis induced by lipid-associated membrane proteins from *Mycoplasma hyopneumoniae* in a porcine lung epithelial cell line with the involvement of caspase 3 and the MAPK pathway. *Genet Mol Res.* 2015;14(3):11429-43.
126. Bogema DR, Deutscher AT, Woolley LK, Seymour LM, Raymond BB, Tacchi JL, et al. Characterization of cleavage events in the multifunctional cilium adhesin Mhp684 (P146) reveals a mechanism by which *Mycoplasma hyopneumoniae* regulates surface topography. *mBio.* 2012;3(2).
127. Bogema DR, Scott NE, Padula MP, Tacchi JL, Raymond BBA, Jenkins C, et al. Sequence TTKF downward arrow QE defines the site of proteolytic cleavage in Mhp683 protein, a novel glycosaminoglycan and cilium adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Biol Chem.* 2011;286(48):41217-29.
128. Ferrarini MG, Siqueira FM, Mucha SG, Palama TL, Jobard E, Elena-Herrmann B, et al. Insights on the virulence of swine respiratory tract *mycoplasmas* through genome-scale metabolic modeling. *BMC Genomics.* 2016;17:353.
129. Galvao Ferrarini M, Mucha SG, Parrot D, Meiffrein G, Ruggiero Bachega JF, Comte G, et al. Hydrogen peroxide production and myo-inositol metabolism as important traits for virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Mol Microbiol.* 2018;108(6):683-96.
130. Garza-Moreno L, Segales J, Pieters M, Romagosa A, Sibila M. Acclimation strategies in gilts to control *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Vet Microbiol.* 2018;219:23-9.
131. Simionatto S, Marchioro SB, Maes D, Dellagostin OA. *Mycoplasma hyopneumoniae*: from disease to vaccine development. *Vet Microbiol.* 2013;165(3-4):234-42.
132. Matthijs AMF, Auray G, Boyen F, Schoos A, Michiels A, Garcia-Nicolas O, et al. Efficacy of three innovative bacterin vaccines against experimental infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Res.* 2019;50(1):91.

133. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801.
134. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197-216.
135. Alonso L, Fuchs E. Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100 Suppl 1(Suppl 1):11830-5.
136. Cederlund A, Gudmundsson GH, Agerberth B. Antimicrobial peptides important in innate immunity. *FEBS J*. 2011;278(20):3942-51.
137. Ransohoff RM, Brown MA. Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest*. 2012;122(4):1164-71.
138. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*. 2018;233(9):6425-40.
139. Savina A, Amigorena S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev*. 2007;219:143-56.
140. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:335-76.
141. Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: development and tissue specialization. *Annu Rev Immunol*. 2015;33:643-75.
142. Gordon S, Pluddemann A. Tissue macrophages: heterogeneity and functions. *BMC Biol*. 2017;15(1):53.
143. Ploeger DT, Hosper NA, Schipper M, Koerts JA, de Rond S, Bank RA. Cell plasticity in wound healing: paracrine factors of M1/ M2 polarized macrophages influence the phenotypical state of dermal fibroblasts. *Cell Commun Signal*. 2013;11(1):29.
144. Schneberger D, Aharonson-Raz K, Singh B. Monocyte and macrophage heterogeneity and Toll-like receptors in the lung. *Cell Tissue Res*. 2011;343(1):97-106.
145. Cresswell P. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:259-93.
146. Wang J, Li F, Tian Z. Role of microbiota on lung homeostasis and diseases. *Sci China Life Sci*. 2017;60(12):1407-15.
147. Bieber K, Autenrieth SE. Dendritic cell development in infection. *Mol Immunol*. 2020;121:111-7.
148. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811.
149. Letendre C, Auger JP, Lemire P, Galbas T, Gottschalk M, Thibodeau J, et al. *Streptococcus suis* Serotype 2 Infection Impairs Interleukin-12 Production and the MHC-II-Restricted Antigen Presentation Capacity of Dendritic Cells. *Front Immunol*. 2018;9:1199.
150. Tanaka-Matsuda M, Ando A, Rogel-Gaillard C, Chardon P, Uenishi H. Difference in number of loci of swine leukocyte antigen classical class I genes among haplotypes. *Genomics*. 2009;93(3):261-73.
151. Piriou-Guzylack L, Salmon H. Membrane markers of the immune cells in swine: an update. *Vet Res*. 2008;39(6):54.
152. Zhang L, Xu R, Wei F, Li W, Li X, Zhang G, et al. Activation of sialoadhesin down-regulates the levels of innate antiviral cytokines in porcine alveolar macrophages in vitro. *Virus Res*. 2020;275:197792.
153. Delputte PL, Van Gorp H, Favoreel HW, Hoebeker I, Delrue I, Dewerchin H, et al. Porcine sialoadhesin (CD169/Siglec-1) is an endocytic receptor that allows targeted delivery of toxins and antigens to macrophages. *PLoS One*. 2011;6(2):e16827.
154. Novakovic P, Harding JC, Ladinig A, Al-Dissi AN, MacPhee DJ, Detmer SE. Relationships of CD163 and CD169 positive cell numbers in the endometrium and fetal placenta with type 2 *PRRSV* RNA concentration in fetal thymus. *Vet Res*. 2016;47(1):76.

155. Jones C, Virji M, Crocker PR. Recognition of sialylated meningococcal lipopolysaccharide by siglecs expressed on myeloid cells leads to enhanced bacterial uptake. *Mol Microbiol.* 2003;49(5):1213-25.
156. Calvert JG, Slade DE, Shields SL, Jolie R, Mannan RM, Ankenbauer RG, et al. CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *J Virol.* 2007;81(14):7371-9.
157. Kowal K, Silver R, Slawinska E, Bielecki M, Chyczewski L, Kowal-Bielecka O. CD163 and its role in inflammation. *Folia Histochem Cytobiol.* 2011;49(3):365-74.
158. Fabrik BO, van Bruggen R, Deng DM, Ligtenberg AJ, Nazmi K, Schornagel K, et al. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood.* 2009;113(4):887-92.
159. Paillot R, Laval F, Audonnet JC, Andreoni C, Juillard V. Functional and phenotypic characterization of distinct porcine dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. *Immunology.* 2001;102(4):396-404.
160. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007;45(2):27-37.
161. Stenken JA, Poschenrieder AJ. Bioanalytical chemistry of cytokines--a review. *Anal Chim Acta.* 2015;853:95-115.
162. Allavena P, Piemonti L, Longoni D, Bernasconi S, Stoppacciaro A, Ruco L, et al. IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *Eur J Immunol.* 1998;28(1):359-69.
163. Haegel-Kronenberger H, Bohbot A, Galon J, Hanau D. Cytokines et cellules dendritiques. 1998.
164. Brazeau C, Gottschalk M, Vincelette S, Martineau-Doize B. *In vitro* phagocytosis and survival of *Streptococcus suis* capsular type 2 inside murine macrophages. *Microbiology (Reading).* 1996;142 (Pt 5):1231-7.
165. Segura M, Gottschalk M. *Streptococcus suis* interactions with the murine macrophage cell line J774: adhesion and cytotoxicity. *Infect Immun.* 2002;70(8):4312-22.
166. Segura M, Gottschalk M, Olivier M. Encapsulated *Streptococcus suis* inhibits activation of signaling pathways involved in phagocytosis. *Infect Immun.* 2004;72(9):5322-30.
167. Houde M, Gottschalk M, Gagnon F, Van Calsteren MR, Segura M. *Streptococcus suis* capsular polysaccharide inhibits phagocytosis through destabilization of lipid microdomains and prevents lactosylceramide-dependent recognition. *Infect Immun.* 2012;80(2):506-17.
168. Segura M, Stankova J, Gottschalk M. Heat-killed *Streptococcus suis* capsular type 2 strains stimulate tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by murine macrophages. *Infect Immun.* 1999;67(9):4646-54.
169. de Greeff A, Benga L, Wichgers Schreur PJ, Valentin-Weigand P, Rebel JM, Smith HE. Involvement of NF-kappaB and MAP-kinases in the transcriptional response of alveolar macrophages to *Streptococcus suis*. *Vet Microbiol.* 2010;141(1-2):59-67.
170. Liu G, Wu J, Qiao M, Zhou J, Wu H, Peng X, et al. Transcription elements AREB6 and miR-34a affect apoptosis of PAMs by regulating the expression of SS2-related gene PPP1R11. *Cell Cycle.* 2019;18(9):1033-44.
171. Lecours MP, Gottschalk M, Houde M, Lemire P, Fittipaldi N, Segura M. Critical role for *Streptococcus suis* cell wall modifications and suilysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells. *J Infect Dis.* 2011;204(6):919-29.
172. Lecours MP, Segura M, Lachance C, Mussa T, Surprenant C, Montoya M, et al. Characterization of porcine dendritic cell response to *Streptococcus suis*. *Vet Res.* 2011;42:72.
173. Bin L, Luping D, Bing S, Zhengyu Y, Maojun L, Zhixin F, et al. Transcription analysis of the porcine alveolar macrophage response to *Mycoplasma hyopneumoniae*. *PLoS One.* 2014;9(8):e101968.

174. Henthorn CR, Chris Minion F, Sahin O. Utilization of macrophage extracellular trap nucleotides by *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Microbiology (Reading)*. 2018;164(11):1394-404.
175. Muneta Y, Uenishi H, Kikuma R, Yoshihara K, Shimoji Y, Yamamoto R, et al. Porcine TLR2 and TLR6: identification and their involvement in *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *J Interferon Cytokine Res*. 2003;23(10):583-90.
176. Heidegger S, Jarosch A, Schmickl M, Endres S, Bourquin C, Hotz C. *Mycoplasma hyorhinitis*-Contaminated Cell Lines Activate Primary Innate Immune Cells via a Protease-Sensitive Factor. *PLoS One*. 2015;10(11):e0142523.
177. Fourour S, Marois-Crehan C, Martelet L, Fablet C, Kempf I, Gottschalk M, et al. Intra-Species and Inter-Species Differences in Cytokine Production by Porcine Antigen-Presenting Cells Stimulated by *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinitis*, and *M. flocculare*. *Pathogens*. 2019;8(1).
178. Trueeb BS, Braun RO, Auray G, Kuhnert P, Summerfield A. Differential innate immune responses induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinitis* in various types of antigen presenting cells. *Vet Microbiol*. 2020;240:108541.
179. Lorenzo H, Quesada O, Assuncao P, Castro A, Rodriguez F. Cytokine expression in porcine lungs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Immunol Immunopathol*. 2006;109(3-4):199-207.
180. Opriessnig T, Gimenez-Lirola LG, Halbur PG. Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Anim Health Res Rev*. 2011;12(2):133-48.
181. Li J, Wang J, Liu Y, Yang J, Guo L, Ren S, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus NADC30-like strain accelerates *Streptococcus suis* serotype 2 infection in vivo and in vitro. *Transbound Emerg Dis*. 2019;66(2):729-42.
182. Feng W, Laster SM, Tompkins M, Brown T, Xu JS, Altier C, et al. *In utero* infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus is sufficient to increase susceptibility of piglets to challenge by *Streptococcus suis* type II. *J Virol*. 2001;75(10):4889-95.
183. Thanawongnuwech R, Brown GB, Halbur PG, Roth JA, Royer RL, Thacker BJ. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced increase in susceptibility to *Streptococcus suis* infection. *Vet Pathol*. 2000;37(2):143-52.
184. Brockmeier SL, Loving CL, Palmer MV, Spear A, Nicholson TL, Faaberg KS, et al. Comparison of Asian porcine high fever disease isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to United States isolates for their ability to cause disease and secondary bacterial infection in swine. *Vet Microbiol*. 2017;203:6-17.
185. Sun YF, Jiang X, Zhang A, Ma JF, Yu XX, Li LA, et al. Early infection of *Streptococcus suis* serotype 2 increases the virulence of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome MLV-like virus in pigs. *Res Vet Sci*. 2020;130:68-72.
186. Xu M, Wang S, Li L, Lei L, Liu Y, Shi W, et al. Secondary infection with *Streptococcus suis* serotype 7 increases the virulence of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs. *Virol J*. 2010;7:184.
187. Lin X, Huang C, Shi J, Wang R, Sun X, Liu X, et al. Investigation of Pathogenesis of *H1N1* Influenza Virus and Swine *Streptococcus suis* Serotype 2 Co-Infection in Pigs by Microarray Analysis. *PLoS One*. 2015;10(4):e0124086.
188. Dang Y, Lachance C, Wang Y, Gagnon CA, Savard C, Segura M, et al. Transcriptional approach to study porcine tracheal epithelial cells individually or dually infected with swine influenza virus and *Streptococcus suis*. *BMC Vet Res*. 2014;10:86.
189. Meng F, Wu NH, Nerlich A, Herrler G, Valentin-Weigand P, Seitz M. Dynamic Virus-Bacterium Interactions in a Porcine Precision-Cut Lung Slice Coinfection Model: Swine Influenza Virus Paves the Way for *Streptococcus suis* Infection in a Two-Step Process. *Infect Immun*. 2015;83(7):2806-15.

190. Meng F, Tong J, Votsch D, Peng JY, Cai X, Willenborg M, et al. Viral Coinfection Replaces Effects of Sulisyn on *Streptococcus suis* Adherence to and Invasion of Respiratory Epithelial Cells Grown under Air-Liquid Interface Conditions. *Infect Immun*. 2019;87(8).
191. Opriessnig T, Karuppanan AK, Castro A, Xiao CT. Porcine circoviruses: current status, knowledge gaps and challenges. *Virus Res*. 2020;286:198044.
192. Wang Q, Zhou H, Lin H, Ma Z, Fan H. Porcine circovirus type 2 exploits JNK-mediated disruption of tight junctions to facilitate *Streptococcus suis* translocation across the tracheal epithelium. *Vet Res*. 2020;51(1):31.
193. Wang Q, Zhou H, Hao Q, Li M, Liu J, Fan H. Coinfection with porcine circovirus type 2 and *Streptococcus suis* serotype 2 enhances pathogenicity by dysregulation of the immune responses in piglets. *Vet Microbiol*. 2020;243:108653.
194. MacInnes JI, Gottschalk M, Lone AG, Metcalf DS, Ojha S, Rosendal T, et al. Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, and *Streptococcus suis* in representative Ontario swine herds. *Can J Vet Res*. 2008;72(3):242-8.
195. Marois C, Gottschalk M, Morvan H, Fablet C, Madec F, Kobisch M. Experimental infection of SPF pigs with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 alone or in association with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol*. 2009;135(3-4):283-91.
196. Wang Y, Gong S, Dong X, Li J, Grenier D, Yi L. In vitro Mixed Biofilm of *Streptococcus suis* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* Impacts Antibiotic Susceptibility and Modulates Virulence Factor Gene Expression. *Front Microbiol*. 2020;11:507.
197. Votsch D, Willenborg M, Baumgartner W, Rohde M, Valentin-Weigand P. *Bordetella bronchiseptica* promotes adherence, colonization, and cytotoxicity of *Streptococcus suis* in a porcine precision-cut lung slice model. *Virulence*. 2021;12(1):84-95.
198. Fablet C, Marois C, Dorenlor V, Eono F, Eveno E, Jolly JP, et al. Bacterial pathogens associated with lung lesions in slaughter pigs from 125 herds. *Res Vet Sci*. 2012;93(2):627-30.
199. Li B, Du L, Xu X, Sun B, Yu Z, Feng Z, et al. Transcription analysis on response of porcine alveolar macrophages to co-infection of the highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Virus Res*. 2015;196:60-9.
200. Thanawongnuwech R, Thacker B, Halbur P, Thacker EL. Increased production of proinflammatory cytokines following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004;11(5):901-8.
201. Thanawongnuwech R, Young TF, Thacker BJ, Thacker EL. Differential production of proinflammatory cytokines: in vitro PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* co-infection model. *Vet Immunol Immunopathol*. 2001;79(1-2):115-27.
202. Thanawongnuwech R, Thacker EL. Interleukin-10, interleukin-12, and interferon-gamma levels in the respiratory tract following *mycoplasma hyopneumoniae* and PRRSV infection in pigs. *Viral Immunol*. 2003;16(3):357-67.
203. Thacker EL, Halbur PG, Ross RF, Thanawongnuwech R, Thacker BJ. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. *J Clin Microbiol*. 1999;37(3):620-7.
204. Deblanc C, Gorin S, Queguiner S, Gautier-Bouchardon AV, Ferre S, Amenna N, et al. Pre-infection of pigs with *Mycoplasma hyopneumoniae* modifies outcomes of infection with European swine influenza virus of H1N1, but not H1N2, subtype. *Vet Microbiol*. 2012;157(1-2):96-105.
205. Deblanc C, Delgado-Ortega M, Gorin S, Berri M, Paboeuf F, Berthon P, et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* does not affect the interferon-related anti-viral response but predisposes the pig to a higher level of inflammation following swine influenza virus infection. *J Gen Virol*. 2016;97(10):2501-15.

206. Deblanc C, Robert F, Pinard T, Gorin S, Queguiner S, Gautier-Bouchardon AV, et al. Pre-infection of pigs with *Mycoplasma hyopneumoniae* induces oxidative stress that influences outcomes of a subsequent infection with a swine influenza virus of *H1N1* subtype. *Vet Microbiol.* 2013;162(2-4):643-51.
207. Saporiti V, Franzo G, Sibila M, Segales J. Porcine circovirus 3 (PCV-3) as a causal agent of disease in swine and a proposal of PCV-3 associated disease case definition. *Transbound Emerg Dis.* 2021;68(6):2936-48.
208. Opriessnig T, Thacker EL, Yu S, Fenaux M, Meng XJ, Halbur PG. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Vet Pathol.* 2004;41(6):624-40.
209. Wang H, Feng Z, Wu Y, Wei Y, Gan Y, Hua L, et al. The effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* on porcine circovirus type 2 replication *in vitro* PK-15 cells. *Res Vet Sci.* 2016;105:56-61.
210. Chen D, Wei Y, Huang L, Wang Y, Sun J, Du W, et al. Synergistic pathogenicity in sequential coinfection with *Mycoplasma hyorhinis* and porcine circovirus type 2. *Vet Microbiol.* 2016;182:123-30.
211. Park C, Jeong J, Kang I, Choi K, Park SJ, Chae C. Increased fucosyl glycoconjugate by *Mycoplasma hyopneumoniae* enhances adherences of *Pasteurella multocida* type A in the ciliated epithelial cells of the respiratory tract. *BMC Vet Res.* 2016;12:25.
212. Palzer A, Haedke K, Heinritzi K, Zoels S, Ladinig A, Ritzmann M. Associations among *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyorhinis*, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus infections in pigs with polyserositis. *Can Vet J.* 2015;56(3):285-7.
213. Bai F, Ni B, Liu M, Feng Z, Xiong Q, Shao G. *Mycoplasma hyopneumoniae*-derived lipid-associated membrane proteins induce inflammation and apoptosis in porcine peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. *Vet Microbiol.* 2015;175(1):58-67.
214. Caruso JP, Ross RF. Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infections on alveolar macrophage functions in swine. *Am J Vet Res.* 1990;51(2):227-31.
215. Brazeau C, Gottschalk M, Vincelette S, Martineau-Doize B. *In vitro* phagocytosis and survival of *Streptococcus suis* capsular type 2 inside murine macrophages. *Microbiology (Reading).* 1996;142 (Pt 5):1231-7.
216. Bin L, Luping D, Bing S, Zhengyu Y, Maojun L, Zhixin F, et al. Transcription analysis of the porcine alveolar macrophage response to *Mycoplasma hyopneumoniae*. *PLoS One.* 2014;9(8):e101968.
217. Lalonde M, Segura M, Lacouture S, Gottschalk M. Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines. *Microbiology (Reading).* 2000;146 (Pt 8):1913-21.
218. Nathues H, Kubiak R, Tegeler R, grosse Beilage E. Occurrence of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in suckling and nursery pigs in a region of high pig density. *Vet Rec.* 2010;166(7):194-8.
219. Kang I, Kim D, Han K, Seo HW, Oh Y, Park C, et al. Optimized protocol for multiplex nested polymerase chain reaction to detect and differentiate *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, and *Mycoplasma hyorhinis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from pigs with polyserositis. *Can J Vet Res.* 2012;76(3):195-200.

Annexes

Figures supplémentaires :

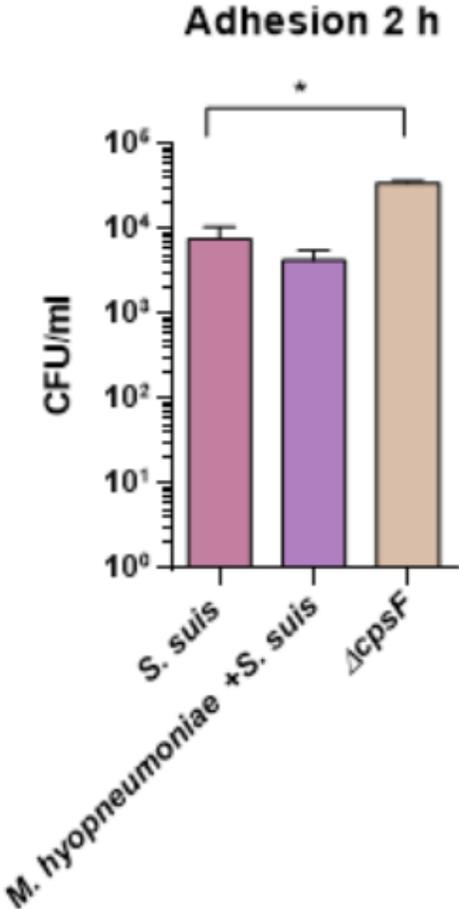


Figure 1 supplémentaire : Adhésion de *S. suis* avec les cellules NPTr pendant 2 h. Au préalable les cellules NPTr ont été pré-infectées avec *M. hyopneumoniae* pendant 48 h.

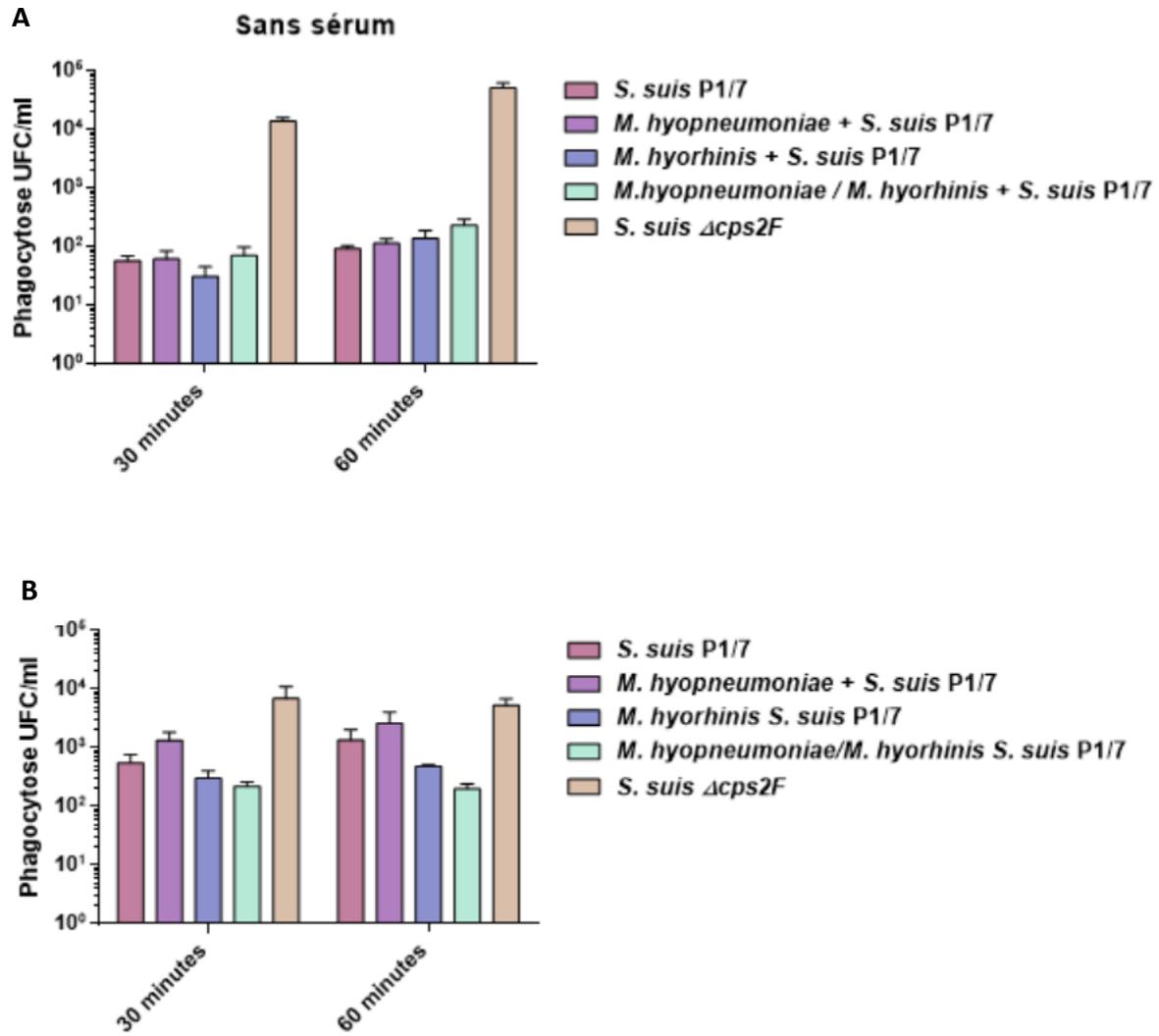


Figure 2 supplémentaire : Phagocytose de *S. suis* sans sérum de porc après 30 et 60 minutes d'incubation en présence des PAMs (A) et des BM-DCs (B).

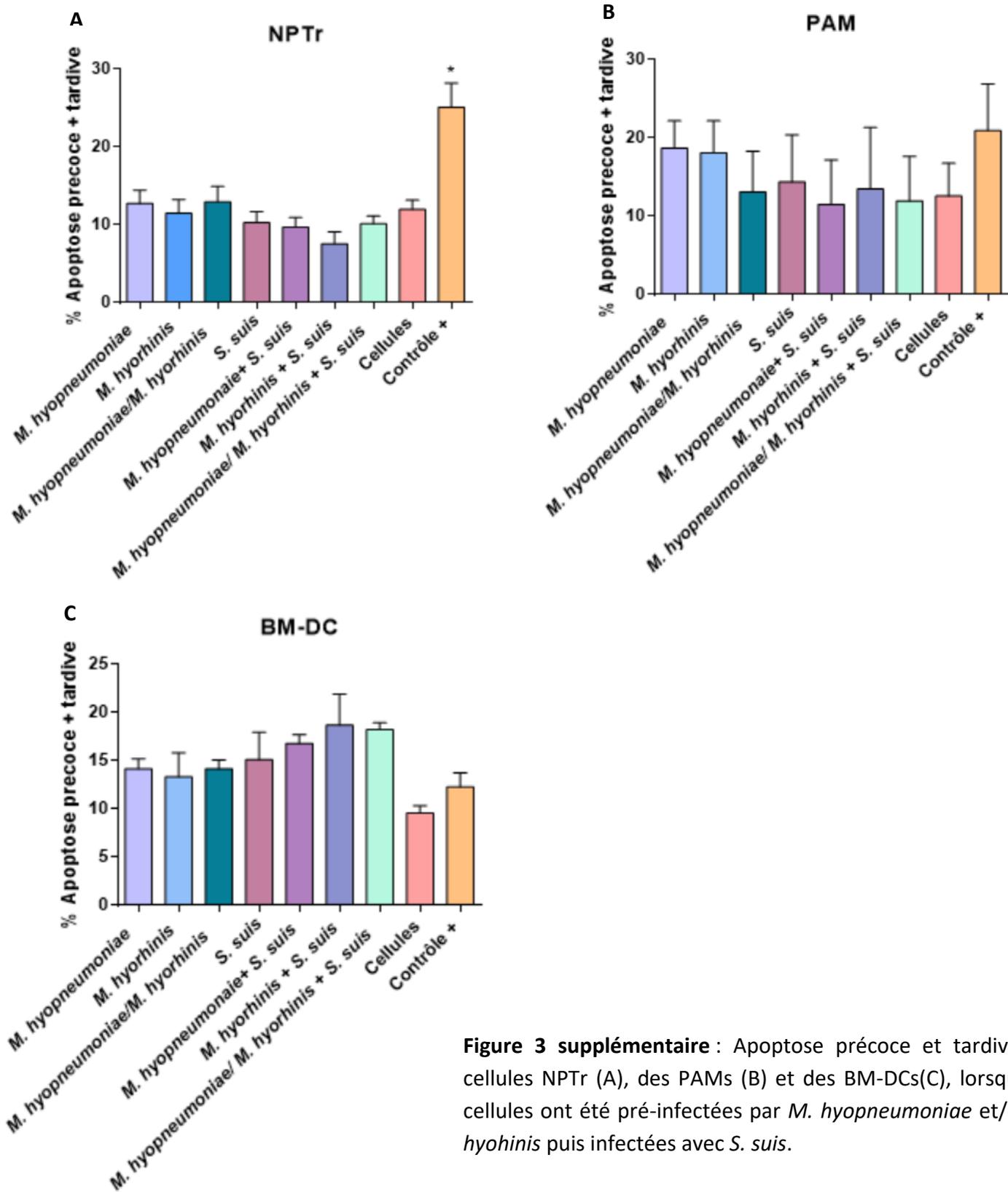
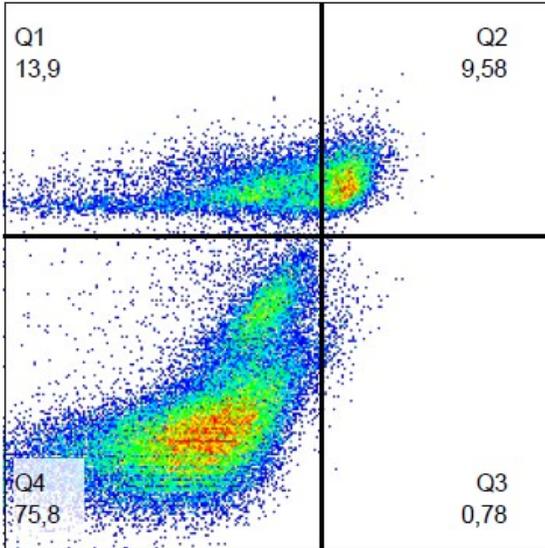


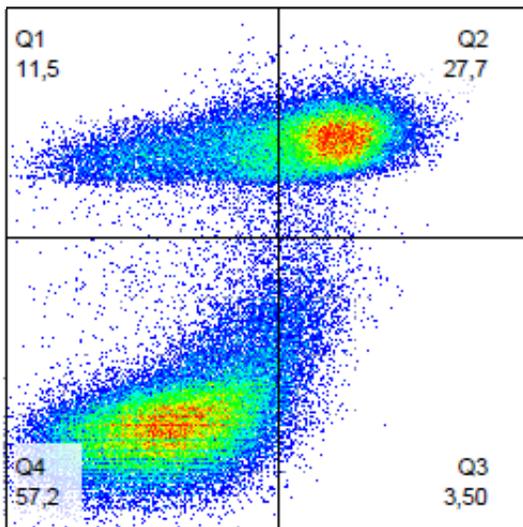
Figure 3 supplémentaire : Apoptose précoce et tardive des cellules NPTTr (A), des PAMs (B) et des BM-DCs(C), lorsque les cellules ont été pré-infectées par *M. hyopneumoniae* et/ou *M. hyorhinis* puis infectées avec *S. suis*.

A



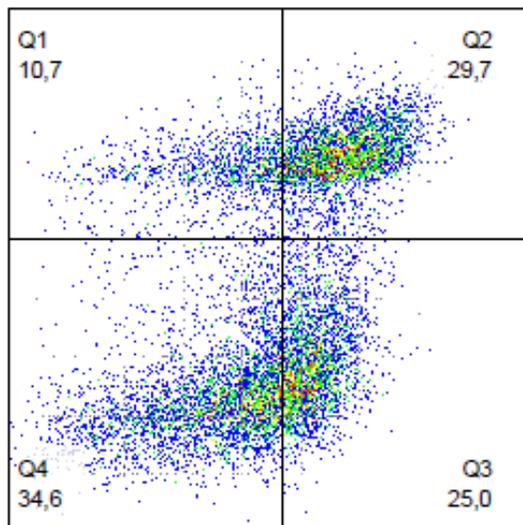
Cellules seules (BM-DCs) : non pré-infectées avec des bactéries

B



BM-DCs pré-infectées seulement avec *M. hyorhinis*

C



BM-DCs pré-infectées avec *M. hyorhinis* puis infectées avec *S. suis*

Figure 4 supplémentaire : Exemple des résultats obtenus lorsque les BM-DCs n'ont pas été pré-infectées (A), ont été pré-infectées avec *M. hyorhinis* seulement (B) et pré-infectées par *M. hyorhinis* puis infectées avec *S. suis* (C). Le cadran Q1 met en évidence les cellules mortes, Q2 montre les cellules en apoptose tardives, Q3 montre les cellules en apoptose précoce et le cadran Q4 met en évidence les cellules vivantes.