

Université de Montréal

Modèles cellulaires pour étudier les interactions entre *Actinobacillus pleuropneumoniae* et  
le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin

par  
Cynthia Lévesque

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  
maître ès sciences (M. Sc.)  
en sciences vétérinaire  
option microbiologie

Décembre, 2010  
© Cynthia Lévesque, 2010

Université de Montréal  
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

Modèles cellulaires pour étudier les interactions entre *Actinobacillus pleuropneumoniae* et  
le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin

présenté par  
Cynthia Lévesque

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr Daniel Dubreuil, président-rapporteur  
Dr Mario Jacques, directeur de recherche  
Dr Carl A. Gagnon, codirecteur  
Dr Mariela Segura, membre du jury

## RÉSUMÉ

Durant une infection pulmonaire, les porcs sont souvent infectés par plus d'un microorganisme. *Actinobacillus pleuropneumoniae* et le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP) sont des pathogènes qui peuvent infecter de manière simultanée les porcs. L'objectif du présent projet est d'étudier l'interaction entre ces pathogènes. Les deux lignées cellulaires permissives au VSRRP utilisées sont les cellules « St-Jude porcine lung » (SJPL) et MARC-145. Les cellules ont été pré-infectées avec le VSRRP, puis infectées avec *A. pleuropneumoniae*. Un dosage de la lactate déshydrogénase a montré qu'une co-infection VSRRP-*A. pleuropneumoniae* comparée à une infection simple augmente significativement la cytotoxicité. Dans les mêmes conditions expérimentales, une pré-infection virale ne semble pas affecter l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* aux cellules. À l'aide de tests ELISA, il a été possible de démontrer la production d'IL-8 et d'INF- $\gamma$  lorsqu'il y a infection des cellules. Pour ce qui est du TNF- $\alpha$ , d'IL-6 et d'IL-10, ces cytokines ne sont pas détectées en présence des pathogènes étudiés. Des expériences de pré-infection bactérienne suivie d'infection virale ont également été réalisées. Il a été démontré que la pré-infection avec *A. pleuropneumoniae* diminuait la réplication du VSRRP chez la lignée cellulaire SJPL, mais cela n'est pas observé avec la lignée cellulaire MARC-145. Les résultats préliminaires ont démontré que cette diminution de la réplication serait causée par une molécule de faible poids moléculaire sécrétée dans le surnageant bactérien et celle-ci serait résistante à la chaleur. Les lignées cellulaires SJPL et MARC-145 représentent de bons modèles pour l'étude des infections mixtes des voies respiratoires du porc.

## ABSTRACT

The respiratory tract of pigs is often colonized by more than one pathogen during an infection. *Actinobacillus pleuropneumoniae* and the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) are pathogens that can be associated with co-infection. The objective of this project was to study interactions between *A. pleuropneumoniae* and PRRSV during mixed infection. The PRRSV-permissive cell lines, St-Jude porcine lung (SJPL) and MARC-145 were used. In the first part, cells were pre-infected with PRRSV followed by an infection with *A. pleuropneumoniae*. Results obtained with a lactate dehydrogenase test showed that a co-infection resulted in a greater cytotoxicity than the single infections. The adherence of *A. pleuropneumoniae* to non-infected or PRRSV-infected cells was similar. Based on ELISAs tests, it was found that the cells produced IL-8 and IFN- $\gamma$  when they were infected, but TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10 were not detected. In the second part, cells were pre-infected with *A. pleuropneumoniae* followed by viral infection. The results showed that a pre-infection with *A. pleuropneumoniae* decreased PRRSV replication in SJPL cells, whereas *A. pleuropneumoniae* did not impair PRRSV replication in MARC-145 cells. Preliminary results indicate that a molecule secreted by *A. pleuropneumoniae* is the factor impairing PRRSV replication in SJPL cells. The factor is probably a small molecular weight molecule that is heat-resistant. In conclusion, both cell lines allowed the study of *A. pleuropneumoniae* and PRRSV interactions during a mixed-infection and these models could be adapted to study interactions of other swine pathogens.

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	i
ABSTRACT .....	ii
TABLE DES MATIÈRES .....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	v
LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS .....	viii
REMERCIEMENTS.....	xi
INTRODUCTION .....	1
REVUE DE LITTÉRATURE .....	4
1. Maladies respiratoires du porc d'importance économique .....	5
2. <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .....	6
2.1 Généralités.....	6
2.2 Facteurs de virulence .....	10
2.3 Réponse immunitaire .....	18
3. Syndrome reproducteur et respiratoire porcin.....	22
3.1 Généralités.....	22
3.2 Agent étiologique .....	23
3.3 Réponse immunitaire .....	33
3.4 Traitements et prévention.....	36
4. Infections mixtes impliquant le VSRRP ou <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	39
5. Conclusion.....	42
MÉTHODOLOGIE .....	43
Lignées cellulaires .....	44
Souches bactériennes et virale.....	44
Titre viral.....	45
Bactéries inactivées.....	45
Surnageant bactérien.....	46
Surnageant bactérien fractionné .....	46
Surnageant bactérien inactivé.....	46
Pré-infection virale suivie d'une infection bactérienne .....	46
Pré-infection bactérienne (bactéries vivantes, surnageant bactérien ou bactéries inactivées) suivie d'une infection virale .....	48

Immunofluorescence .....	49
Cytotoxicité .....	50
Détection de la caspase 3 .....	50
Test d'adhérence .....	51
Production de cytokines .....	51
Quantification de l'ATP lors de stimulation des cellules avec le surnageant bactérien et le VSRRP pour évaluer le métabolisme cellulaire .....	53
Analyses statistiques .....	54
RÉSULTATS .....	55
Permissivité des lignées cellulaires au VSRRP .....	56
Test de cytotoxicité réalisé sur les cellules pré-infectées avec le VSRRP, puis infectées avec <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	58
Test de caspase 3 lorsque la lignée cellulaire SJPL est infectée avec VSRRP et <i>A. pleuropneumoniae</i> ou <i>A. pleuropneumoniae ΔapxICΔapxIIC</i> .....	62
Production de cytokines par les cellules pré-infectées avec le VSRRP et la bactérie <i>A. pleuropneumoniae ΔapxICΔapxIIC</i> .....	64
Test d'adhérence d' <i>A. pleuropneumoniae</i> aux cellules lors d'une pré-infection avec VSRRP .....	68
Détection du VSRRP chez des cellules pré-infectées avec <i>A. pleuropneumoniae ΔapxICΔapxIIC</i> .....	71
Test de cytotoxicité fait sur les cellules pré-infectées avec <i>A. pleuropneumoniae ΔapxICΔapxIIC</i> puis infectées avec VSRRP .....	74
Titre viral du VSRRP lorsque les cellules sont pré-stimulées avec des bactéries inactivées ou des LPS d' <i>A. pleuropneumoniae</i> ou infectées avec <i>A. pleuropneumoniae ΔapxICΔapxIIC</i> puis infectées avec le VSRRP .....	77
Test d'ATPlite fait sur les cellules pré-stimulées avec le surnageant d' <i>A. pleuropneumoniae ΔapxICΔapxIIC</i> puis infectées avec le VSRRP .....	80
Immunofluorescence des cellules pré-stimulées avec le surnageant d' <i>A. pleuropneumoniae ΔApxICΔApxIIC</i> puis infectées avec VSRRP .....	82
Immunofluorescence des cellules pré-stimulées avec le surnageant d' <i>A. pleuropneumoniae ΔApxICΔApxIIC</i> inactivé par la chaleur puis infectées avec VSRRP .....	84
Immunofluorescence des cellules pré-stimulées avec le surnageant d' <i>A. pleuropneumoniae ΔApxICΔApxIIC</i> fractionné puis infectées avec VSRRP .....	87
DISCUSSION .....	90
CONCLUSION .....	97
RÉFÉRENCES .....	99
ANNEXES .....	xii

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Sérotypes d' <i>A. pleuropneumoniae</i> et leur prévalence en Amérique du Nord. Adapté de Gottschalk.....	7
Tableau II : Génotype et expression des toxines Apx chez les sérotypes d' <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	14
Tableau III : Type de plaques utilisées lors des infections avec le VSRRP et la bactérie <i>A. pleuropneumoniae</i> . .....	47
Tableau IV : Informations sur les anticorps utilisés pour la détection des différentes cytokines quantifiées lors d'infection mixte avec le VSRRP et <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	53
Tableau V : Détection de la fluorescence du à la présence du VSRRP dans les cellules de la lignée cellulaire SJPL .....	xxviii

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure de l'antigène-O chez le sérotype 1 d' <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	11
Figure 2 : Structure du noyau oligosaccharidique chez le sérotype 1 d' <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	11
Figure 3 : Représentation de la structure du polysaccharide capsulaire retrouvé chez <i>A. pleuropneumoniae</i> sérotype 1.....	12
Figure 4 : Représentation schématique des différents mécanismes d'acquisition du fer retrouvés chez <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	17
Figure 5 : Représentation schématique du VSRRP .....	24
Figure 6 : L'organisation génomique du VSRRP.....	26
Figure 7 : Protocole pour les pré-infections avec VSRRP, suivit d'une infection avec <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	48
Figure 8 : Protocole pour la pré-infection bactérienne (bactéries vivantes, le surnageant bactérien ou des bactéries inactivées), suivie d'une infection avec le VSRRP.....	49
Figure 9 : Images des cellules infectées avec le VSRRP pendant 72 heures .....	57
Figure 10.1 : Test de cytotoxicité avec le surnageant de la lignée cellulaire SJPL infectées avec le VSRRP pendant 72 heures et la bactérie <i>A. pleuropneumoniae</i> ou <i>A. pleuropneumoniae ΔapxICΔapxIIC</i> .....	60
Figure 10.2 : Test de cytotoxicité avec le surnageant de la lignée cellulaire MARC-145...	61
Figure 11 : Taux de caspase 3 .....	63
Figure 12.1 : Quantification de la production d'IL-8 et d'IFN-γ par la lignée cellulaire SJPL .....	66
Figure 12.2 : Quantification de la production d'IL-8 et d'IFN-γ par la lignée cellulaire MARC-145.....	67
Figure 13 : L'adhérence d' <i>A. pleuropneumoniae</i> ou d' <i>A. pleuropneumoniae ΔapxICΔapxIIC</i> aux lignées cellulaires.....	70
Figure 14.1 : Images de la lignée cellulaire SJPL infectée avec <i>A. pleuropneumoniae ΔApxICΔApxIIC</i> et le VSRRP .....	72
Figure 14.2 : Images de la lignée cellulaire MARC-145 infectée avec <i>A. pleuropneumoniae ΔApxICΔApxIIC</i> et le VSRRP.....	73
Figure 15 : Test de cytotoxicité réalisée suite à une pré-infection .....	76
Figure 16.1 : Titre viral du VSRRP lorsque les cellules de la lignée cellulaire SJPL sont .	78
Figure 16.2 : Titre viral de cellules de la lignée cellulaire MARC-145 infectées.....	79
Figure 17 : Test d'ATPlite .....	81
Figure 18 : Images des cellules incubées avec le surnageant d' <i>A. pleuropneumoniae ΔApxICΔApxIIC</i> et infectées avec le VSRRP.....	83

Figure 19.1 : Images de la lignée cellulaire SJPL incubée avec le surnageant inactivé d' <i>A. pleuropneumoniae</i> $\Delta ApxIC\Delta ApxIIC$ et infectées avec le VSRRP.....	85
Figure 19.2 : Images de la lignée cellulaire MARC-145 incubée avec le surnageant inactivé d' <i>A. pleuropneumoniae</i> $\Delta ApxIC\Delta ApxIIC$ et infectées avec le VSRRP .....	86
Figure 20.1 : Images de la lignée cellulaire SJPL incubée avec le surnageant fractionné d' <i>A. pleuropneumoniae</i> $\Delta ApxIC\Delta ApxIIC$ et infectée avec le VSRRP .....	88
Figure 20.2 : Images de la lignée cellulaire MARC-145 incubée avec le surnageant fractionné d' <i>A. pleuropneumoniae</i> $\Delta ApxIC\Delta ApxIIC$ et infectée avec le VSRRP .....	89
Annexe I : Images des cellules infectées avec le VSRRP.....	xiv
Annexe II : Test de cytotoxicité avec le surnageant des cellules infectées avec le VSRRP et la bactérie <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	xviiiv
Annexe III : Quantification de la production de cytokines par la lignée cellulaire SJPL et la lignée cellulaire MARC-145 .....	xxvii
Annexe IV : L'adhérence d' <i>A. pleuropneumoniae</i> ou aux lignées cellulaires pré-infectées avec le VSRRP .....	xxiii
Annexe V : Images des cellules incubées avec <i>A. pleuropneumoniae</i> $\Delta ApxIC\Delta ApxIIC$ inactivé et infectées avec le VSRRP.....	xxvii
Annexe VI : Images des cellules incubées avec le surnageant d' <i>A. pleuropneumoniae</i> $\Delta ApxIC\Delta ApxIIC$ et infectées avec le VSRRP.....	xxvii

## LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

ABC	ATP binding cassette (cassette liant l'ATP)
Ac	Anticorps
AM	Alveolar macrophage (macrophage alvéolaire)
ANOVA	Analysis of variance (analyse de la variance)
ARN	Acide ribonucléique
ARNdb	Acide ribonucléique double brin
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATCC	American type culture collection (collection de culture Américaine)
ATP	Adénosine triphosphate
BALF	Bronchoalveolar lavage fluid (lavage des fluides bronchoalvéolaire)
BCG	Bacille Calmette-Guérin
BHI	Brain heart infusion (infusion cerveau coeur)
BSA	Bovine serum albumin (sérum d'albumine bovin)
CAMP	Christie-Atkins-Munch-Pertersen
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
CPS	Capsule
DICT	Dose infectieuses en culture de tissus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (milieu modifié Dubelcco Eagle)
DO	Densité optique
DTT	Dithiothréitol
EAV	Equine arteritis virus (artérite virale équine)
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid (acide d'éthylène tétraacétique)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (essai enzymatique immunoabsorbent)
FasL	Fas ligand (ligand Fas)
Fhu	Ferric hydroxamate uptake (preneur d'hydroxamate de fer)
FITC	Fluorescein isothiocyanate (fluorescéine isothiocyanate)
Fur	Ferric uptake regulator (régulateur de fer)
GAG	Glycosaminoglycan
GgO <sub>3</sub>	Gangliotriaosylcéramide
GgO <sub>4</sub>	Gangliotétraosylcéramide
h	Heure
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Acide sulfurique
HCl	Acide chloridrique
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyle)-1-pipérazineéthanesulfonique
HHV-6	Human Herpes virus type-6 (virus de l'herpès humain type 6)
HIV-1	Human immunodeficiency virus type 1 (virus de l'immunodéficence humain type 1)
Ig	Immunoglobuline

IL	Interleukine
INF	Interféron
kDa	kilo Dalton
LDH	Lactate déshydrogénase
LDHV	Lactate dehydrogenase virus (virus de lactate déshydrogénase)
LPS	Lipopolysaccharide
M	Protéine de la matrice
MEM	Minimal essential medium (milieu essentiel minimum)
MOI	Multiplicity of infection (multiplicité de l'infection)
N	Nucléocapside
NaCl	Chlorure de sodium
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (chaîne légère kappa du facteur nucléaire des cellules B activées)
NK	Natural killer
nsp	Non structural protein (protéine non structurale)
NTP	Nucléotide trisphosphate
ORF	Open reading frame (cadre de lecture ouvert)
PAM	Pulmonary alveolar macrophage (macrophage alvéolaire des poumons)
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell (cellules mononucléaire du sang périphérique)
PBS	Phosphate buffer saline (tampon de phosphate salin)
PCV-2	Porcine circovirus type 2 (circovirus porcin type 2)
PEDV	Porcine epidemic diarrhea virus (virus porcin de la diarrhée endémique)
PGA	Poly-N-acétyl-glucosamine
PI	Post-infection
PMN	Polymorphonucléaire
PRDC	Porcine respiratory disease complex (maladie du complexe respiratoire porcin)
PRRSV	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus
rpm	Rotation par minute
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction (réaction en chaîne de polymérisation en transcription inverse)
RTX	Repeat in the structural toxin (répétition dans une toxine structurale)
SDPS	Syndrome de dépérissement en post sevrage
SHFV	Simian hemorrhagic fever virus (virus de la fièvre hémorragique simien)
SJPL	St-Jude porcine lung
TBS	Tris buffered saline (tampon Tris salin)
TMB	Tétraméthyle benzidine
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha (Facteur nécrosant de la tumeur alpha)
UF	Unité de fluorescence
UFC	Unité formatrice de colonie
UL	Unité de luminescence

UTR      Untranslated region (région non traduite)  
UV      Ultraviolet

## REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier Dr Mario Jacques et Dr Carl A. Gagnon pour leur accueil dans leurs laboratoires et pour leur confiance pour mener à terme ce projet. Je dois aussi remercier le CRIP, le CRSNG et le FQRNT d'avoir financé ce projet.

Je remercie aussi Josée Labrie, agente de recherche de Dr Jacques et Dr Nedzad Music, agent de recherche de Dr Gagnon pour leur écoute et leur aide tout au long de mon projet. Aussi, je les remercie de m'avoir enseigné les techniques nécessaires à l'avancement de mes travaux.

Je remercie tous les membres des laboratoires. J'aimerais remercier Dr Yannick Tremblay qui m'a aidé dans la planification de mes expériences et à la correction de textes anglais. Aussi, j'aimerais remercier spécialement Émilie St-Pierre qui fut une stagiaire qui a travaillé avec acharnement sur mon projet et ce malgré les difficultés que nous avons. J'aimerais aussi remercier Dr Vincent Deslandes, Dr Alma Guerrero, Alexandra Grasteau, Victor Alvarez, Matthieu Lauvernier et Jérémy Barbosa.

Je dis un énorme merci à tous mes amis et surtout à toute ma famille pour m'avoir appuyé. Spécialement, à mes parents et mon frère qui ont été toujours là pour m'encourager et me donner des conseils.

Je veux spécialement remercier mon amoureux qui est avec moi autant dans les moments joyeux que les moments plus difficiles.

# **INTRODUCTION**

Les maladies respiratoires chez les porcs sont causées par des infections bactériennes et/ou virales. Il est reconnu, dans l'industrie porcine, que les maladies respiratoires peuvent être causées par la présence de plusieurs pathogènes. Cela est connu comme les maladies du complexe respiratoire porcine (Choi, *et al.*, 2003). Une équipe de chercheurs en Europe a démontré que parmi 198 porcs démontrant des signes cliniques de maladies respiratoires, 185 porcs étaient infectés par plus d'un pathogène, soit bactérien, soit viral (Gutierrez-Martin, *et al.*, 2000). De plus, cette étude a démontré qu'il y avait beaucoup de co-infections où la bactérie *Actinobacillus pleuropneumoniae* et le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcine (VSRRP) étaient présents. Dans 137 cas d'infections mixtes la présence du VSRRP et/ou d'*A. pleuropneumoniae* a pu être notée et sur ces 137 cas, il y en avait 24 où les pathogènes responsables de la pneumonie étaient *A. pleuropneumoniae* et le VSRRP.

*A. pleuropneumoniae* est une bactérie Gram-négatif qui cause la pleuropneumonie porcine. La phase aiguë de cette maladie cause la mort de nombreux porcs. Pour infecter les porcs, la bactérie utilise plusieurs facteurs de virulence dont les lipopolysaccharides (Bossé, *et al.*, 2002), la capsule (Rycroft & Cullen, 1990), les toxines Apx (Frey, 1994) et les systèmes d'acquisition de fer (Archambault, *et al.*, 1999). Ceux-ci permettent à la bactérie de se multiplier chez son hôte tout en échappant au système immunitaire de celui-ci.

Le VSRRP est un virus à ARN double brin de polarité positive. Ce virus cause des problèmes sévères de reproduction chez la truie et des problèmes respiratoires causés par une pneumonie interstitielle lymphomononucléaire non-spécifique (Rossow, *et al.*, 1994). *In vivo*, le virus peut se répliquer dans différents organes dont les poumons et les reins (Sur, *et al.*, 1996). *In vitro*, le virus peut se multiplier dans des cultures primaires de macrophages alvéolaires pulmonaires de porcs (Benfield, *et al.*, 1992), les lignées cellulaires MARC-145 (Kim, *et al.*, 1993) et St-Jude porcine lung (SJPL) (Lévesque, *et al.*, 2009).

Tel que démontré dans plusieurs études, les maladies respiratoires chez les porcs impliquent souvent plusieurs pathogènes (Choi, *et al.*, 2003). Les mécanismes d'interactions entre ceux-ci sont très peu connus. Ceci est vrai pour les interactions entre le VSRRP et la bactérie *A. pleuropneumoniae*. Il est important de mieux comprendre ces

interactions afin de permettre un meilleur contrôle de ces infections mixtes. C'est pourquoi nous avons entrepris des études *in vitro* permettant d'observer les interactions entre les différents pathogènes et les cellules de l'hôte.

# **REVUE DE LITTÉRATURE**

## 1. Maladies respiratoires du porc d'importance économique

Il existe plusieurs maladies respiratoires porcines qui affectent gravement l'industrie porcine. Voici, en exemple, quelques pathogènes causant ces maladies. *Mycoplasma hyopneumoniae* cause la pneumonie enzootique chez le porc et est endémique dans plusieurs troupeaux. Le taux de morbidité causé par cette bactérie est élevé, tandis que le taux de mortalité est faible (Schwartz, 2004). Pour ce qui est de la bactérie *Bordetella bronchiseptica*, elle est souvent présente dans les troupeaux. Elle cause une bronchopneumonie primaire chez les nouveau-nés. Elle peut être un pathogène respiratoire secondaire chez les porcs malades plus âgés (Brockmeier, *et al.*, 2001). *Pasteurella multocida* est aussi un pathogène respiratoire secondaire qui est fréquemment présent lorsque les porcs sont atteints de pneumonie (Schwartz, 2004). Le circovirus porcin type 2 (PCV-2) est responsable du syndrome de dépérissement en post sevrage (SDPS) (Meehan, *et al.*, 1998). Sur le terrain, lorsque les porcs ont une maladie respiratoire, il y a beaucoup de cas où il y a plus d'un pathogène présent. Ceci est appelé la maladie du complexe respiratoire porcin (porcine respiratory disease complex ou PRDC). Les signes cliniques sont la toux, la léthargie, la perte d'appétit et la respiration laborieuse. Ce complexe, qui peut aussi causer la mort, est caractérisé par la présence de deux pathogènes viraux et/ou bactériens ou plus dans le tractus respiratoire des animaux malades. Les pathogènes retrouvés sont généralement le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP), *M. hyopneumoniae*, le virus de l'influenza porcin, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* et PCV-2 (Choi, *et al.*, 2003). Au cours du projet de recherche, les pathogènes étudiés seront la bactérie *A. pleuropneumoniae* et le VSRRP qui seront décrits en détail dans les prochaines sections. Un résumé des quelques études d'infections mixtes avec certains pathogènes mentionnés précédemment sera également présenté.

## 2. *Actinobacillus pleuropneumoniae*

### 2.1 Généralités

#### 2.1.1 Historique

En 1957, un premier cas de pleuropneumonie fut déclaré aux États-Unis. La bactérie retrouvée dans les lésions pulmonaires fut classée dans le genre *Haemophilus* (Pattison, 1957). Puis, apparurent des éclosions d'infection suite à l'industrialisation de l'élevage porcin. Celles-ci causèrent des pertes économiques. Tout au long de la caractérisation de cette nouvelle bactérie, celle-ci changea de noms quelques fois (Schwartz, 2004). En 1983, des études ont mis en évidence de nouvelles caractéristiques génétiques qui ont fait passer cette bactérie au genre *Actinobacillus*, d'où son appellation d'aujourd'hui *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Cette bactérie fait partie de la famille des *Pasteurellaceae* comme les bactéries du genre *Haemophilus*, *Pasteurella* et *Mannheimia*. La souche type de la bactérie est l'isolat Shope (Shope, 1964) qui porte le numéro 4074. Cette bactérie cause d'importantes pertes économiques en Amérique, en Europe et en Asie (Schwartz, 2004).

#### 2.1.2 Caractéristiques

*A. pleuropneumoniae* est divisée en deux biotypes. Le biotype 1 est dépendant du facteur de croissance NAD (nicotinamide adénine dinucléotide) et le biotype 2 y est indépendant (Niven D.F., 1988). Un classement est aussi fait selon les polysaccharides présents à la surface des bactéries, ce sont les sérotypes. *A. pleuropneumoniae* en possède 15. Le sérotype 5 a deux sous-types a et b (Dubreuil, *et al.*, 2000, Blackall, *et al.*, 2002) (Voir Tableau I). Cette bactérie est un coccobacille Gram négatif encapsulé. L'hémolysine et les toxines produites par la bactérie sont actives contre les cellules épithéliales et alvéolaires des poumons de porcs (Schwartz, 2004). De plus, *A. pleuropneumoniae* est CAMP (Christie-Atdins-Munch-Pertersen) positif et produit de l'uréase (Taylor, 1999).

Plusieurs recherches génomiques chez *A. pleuropneumoniae* ont été effectuées récemment. Deux génomes complets de sérotypes différents ont été séquencés et annotés. Ce sont les génomes de la souche de référence du sérotype 5b (L20) (Foote, *et al.*, 2008) et une souche de champ du sérotype 3 isolée en Chine (JL03) (Xu, *et al.*, 2008). De plus, une

étude de génomique comparative effectuée sur les 15 souches de référence et 21 souches de champ a démontré qu'il y avait 58 gènes conservés chez toutes les souches testées qui codent pour des protéines de la membrane externe et des lipoprotéines (Gouré, *et al.*, 2009).

Tableau I : Sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* et leur prévalence en Amérique du Nord. Adapté de Gottschalk (Gottschalk, 2007).

Sérotypage	Biotypage	Présence en Amérique du Nord	Virulence <sup>a</sup>
<b>1</b>	I	Oui	Forte
<b>2</b>	I et II <sup>b</sup>	Oui <sup>c</sup>	Faible
<b>3/6/8</b>	I	Oui	Variable
<b>4</b>	I et II <sup>b</sup>	Oui <sup>c</sup>	Faible
<b>5a</b>	I	Oui	Forte
<b>5b</b>	I	Oui	Forte
<b>7</b>	I et II <sup>b</sup>	Oui <sup>c</sup>	Forte/Variable
<b>9</b>	I et II <sup>b</sup>	Non	-
<b>10</b>	I	Oui	Faible
<b>11</b>	I	Non	-
<b>12</b>	I	Oui	Variable
<b>13</b>	I et II <sup>d,e</sup>	Oui <sup>e</sup>	???
<b>14</b>	II	Non	-
<b>15</b>	I	Oui <sup>e</sup>	Variable
<b>Non sérotypable</b>	II	Oui <sup>e</sup>	Forte <sup>f</sup>

a : Cette classification est basée sur les souches canadiennes et américaines et peut être significativement différente dans d'autres pays

b : Les souches des biotypes I et II diffèrent au niveau de la virulence et de la production de toxine

c : Uniquement les souches du Biotypage I ont été isolées en Amérique du Nord

d : Uniquement les souches du Biotypage II ont été isolées en Amérique du Nord

e : Observations non publiées

f : Un seul troupeau affecté à ce jour

### 2.1.3 Signes cliniques

Les porcs de tous les âges peuvent être infectés par *A. pleuropneumoniae*. Par contre, les porcs de 6 à 20 semaines sont plus susceptibles à une infection. De plus, la morbidité et la mortalité sont surtout présentes chez les porcs âgés de 10 à 16 semaines (Schwartz, 2004). La pleuropneumonie est une maladie contagieuse et la transmission de la bactérie d'un porc à l'autre se fait principalement par contact direct ou aérosol (Lechtenberg, *et al.*, 1994, Torremorell, *et al.*, 1997, Jobert, *et al.*, 2000, Schwartz, 2004). L'infection se fait en trois étapes : la colonisation, l'évasion du système immunitaire et les dommages aux tissus de l'hôte (Bossé, *et al.*, 2002). Plusieurs symptômes apparaissent selon le stade de la

maladie. Voici l'ordre chronologique d'apparition de ceux-ci : la prostration, une forte fièvre, une respiration plus rapide, de la toux et des renflements, l'ataxie, l'apathie, l'anorexie, des raideurs, des vomissements, de la diarrhée et la détresse respiratoire sévère avec cyanose (Liggett, *et al.*, 1987, Ajito, *et al.*, 1996, Taylor, 1999, Schwartz, 2004). La détresse respiratoire amène la dyspnée. De plus, lors d'infections mortelles, les porcs peuvent avoir des sécrétions contenant du sang au niveau du nez et de la bouche (Rosendal, *et al.*, 1985, Taylor, 1999).

Suite à une éclosion d'infection aiguë, il peut y avoir des cas chroniques de maladie. L'apparition de cas chroniques dépend du sérotype bactérien de l'infection primaire, du statut immunitaire et de la charge bactérienne pulmonaire de l'hôte (Sebunya, *et al.*, 1983, Rosendal, *et al.*, 1985, Rogers, *et al.*, 1990, Hensel, *et al.*, 1993). La bactérie est hébergée dans les amygdales du porc (Rosendal, *et al.*, 1985, Liggett, *et al.*, 1987, Sidibé, *et al.*, 1993).

*A. pleuropneumoniae* se lie préférentiellement aux cellules du tractus respiratoire inférieur, c'est-à-dire que la bactérie adhère sur les cils terminaux de l'épithélium des bronchioles et sur les cellules épithéliales des alvéoles (Bossé, *et al.*, 2002). En se fixant à ces cellules, *A. pleuropneumoniae*, grâce à divers mécanismes, cause des lésions dans le tractus respiratoire. Au niveau des poumons, il peut y avoir des oedèmes sévères, de l'inflammation, de l'hémorragie et la présence de nécrose. Pour ce qui est de la cage thoracique, il peut y avoir du sérum sanguin et des caillots de fibrine. La bactérie peut aussi provoquer des pleurésies fibrineuses et des péricardites. Au niveau des nœuds lymphatiques, il y a des oedèmes, car il y a infiltration de leucocytes polymorphonucléaires (PMNs) et des caillots de fibrine (Bertram, 1985, Rosendal, *et al.*, 1985, Liggett, *et al.*, 1987, Ajito, *et al.*, 1996).

Les animaux qui survivent aux infections peuvent présenter une guérison des lésions, mais dans la majorité des cas, les lésions ne sont pas guéries. Elles laissent des régions nécrotiques et/ou des abcès encapsulés dans les régions fibreuses des tissus conjonctifs.

#### 2.1.4 Traitements et prévention

Pour éviter d'avoir des élevages contaminés par *A. pleuropneumoniae*, il est important de prendre des précautions sanitaires. Lorsqu'il y a des infections endémiques chez les troupeaux il est nécessaire d'avoir une combinaison de vaccins, de médicaments et d'améliorer les conditions de l'élevage pour contrôler ces infections. Les agents utilisés pour traiter ou prévenir les infections sont : tiamuline, tétracycline, certiofure, tilmicosine, enrofloxacin et pénicilline G. Plusieurs souches sont résistantes à la tétracycline. De plus, les cas chroniques de la maladie ne répondent généralement à aucun traitement (Schwartz, 2004).

Pour ce qui est de la vaccination, il existe plusieurs types de vaccins et ils sont classés en deux catégories : ceux de première génération et ceux de deuxième génération (Ramjeet, *et al.*, 2008). Les vaccins de première génération sont faits à partir des bactéries complètes tuées par la chaleur ou traitées au formaldéhyde. Certains déterminants antigéniques sont présentés au système immunitaire sans qu'il y ait multiplication de la bactérie. Ce type de vaccin ne fait que diminuer légèrement la mortalité des porcs infectés (Jolie, *et al.*, 1995, Furesz, *et al.*, 1997). Aussi, la protection est partielle contre les sérotypes homologues et est inexistante ou très faible contre les sérotypes hétérologues (Jolie, *et al.*, 1995). Le problème est qu'une bactérie inactivée ne colonise pas le tractus respiratoire et cela est important pour l'initiation d'une réponse immunitaire efficace. Entre autres, il est important qu'il y ait des toxines Apx qui soient sécrétées. En l'absence de celles-ci la protection induite par le vaccin est limitée (Haga, *et al.*, 1997, Shea & Mulks, 2002).

Les vaccins appelés de deuxième génération sont sous-unitaires et la majorité de ceux-ci contiennent les toxines Apx (Chiers, *et al.*, 1998, Van Overbeke, *et al.*, 2001, Habrun B, 2002, van den Bosch & Frey, 2003, Tumamao, *et al.*, 2004, Meeusen, *et al.*, 2007). Aucun vaccin sous-unitaire commercialisé n'offre une protection complète contre tous les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*. Il existe aussi des vaccins vivants atténués mais, ceux-ci présentent plusieurs inconvénients. La bactérie peut muter et redevenir virulente et ainsi causer la maladie chez le porc et la propager dans le troupeau (Ramjeet, *et al.*, 2008). Malgré les inconvénients de ceux-ci, il est important de continuer la recherche pour améliorer la sécurité des vaccins vivants et l'efficacité des vaccins sous-unitaires. En fait, il

a été démontré que les porcs qui survivaient à une infection naturelle sont complètement protégés contre les infections homologues et partiellement contre certains sérotypes hétérologues d'*A. pleuropneumoniae* (Nielsen, 1984, Haesebrouk, *et al.*, 1996). Il faut donc poursuivre les recherches afin de développer un vaccin efficace contre tous les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*.

## 2.2 Facteurs de virulence

### 2.2.1 Lipopolysaccharide

Le lipopolysaccharide (LPS) joue un rôle important au niveau de l'adhérence de la bactérie. La contribution des LPS à la pathogénèse et/ou l'adhérence est complexe (Bossé, *et al.*, 2002). Le LPS est composé de trois régions bien définies : le lipide A, le noyau de l'oligosaccharide et l'antigène-O, un polysaccharide consistant en des unités répétées (Jacques, 2004). La structure de l'antigène-O du sérotype 1 est un tétrasaccharide (Altman, *et al.*, 1986) (Figure 1). La présence de trois gènes nécessaires à la biosynthèse du noyau du LPS dans les sérotypes 1 à 12 montre que celui-ci est normalement plus conservé entre les sérotypes que l'antigène-O considéré comme la région la plus variable des LPS (Michael, *et al.*, 2004). Le noyau oligosaccharidique est divisé en noyau interne et externe. Le noyau interne est effectivement très conservé entre les sérotypes (Michael, *et al.*, 2004). De plus, la structure (Figure 2) de celui-ci est retrouvée aussi chez d'autres *Pasteurellaceae* (Brisson, *et al.*, 2002, St Michael, *et al.*, 2005). Le noyau externe est plus variable que le noyau interne. Il existe deux types de noyaux externes. Le type 1 contient un trisaccharide et est retrouvé chez les sérotypes 1, 6, 9 et 11. Pour ce qui est du type 2, celui-ci contient seulement un résidu D-glycéro-D-manno-heptose et est retrouvé chez les sérotypes 2, 3, 4, 5, 7, 8, 12, 13, 14 et 15 (MacLean, *et al.*, 2004, Michael, *et al.*, 2004, Perry & MacLean, 2004, Perry, *et al.*, 2005).

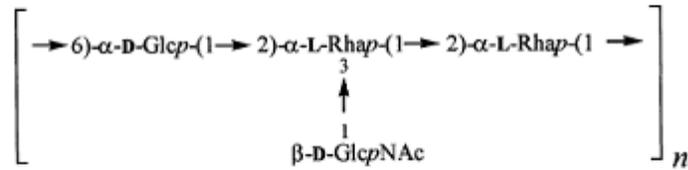


Figure 1 : Structure de l'antigène-O chez le sérotype 1 d'*A. pleuropneumoniae*. Adaptée de Perry *et al.* (Perry M.B., *et al.*, 1990).

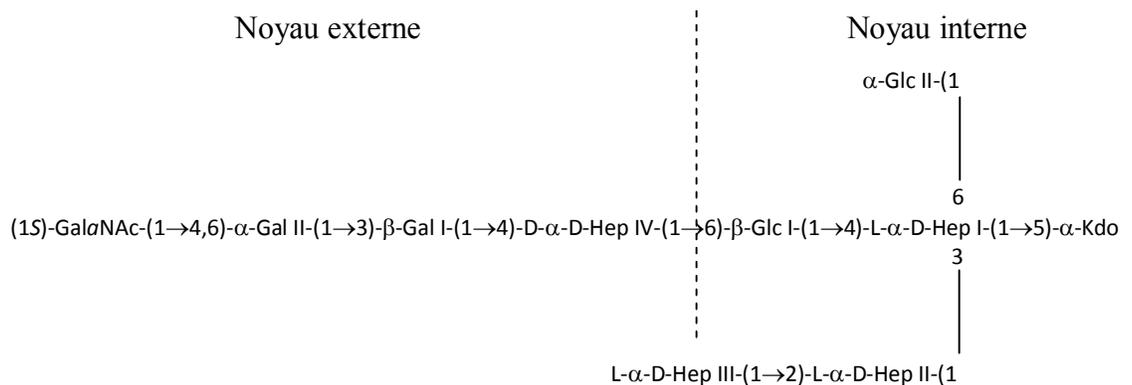


Figure 2 : Structure du noyau oligosaccharidique chez le sérotype 1 d'*A. pleuropneumoniae* (Michael, *et al.*, 2004).

Plusieurs systèmes adhésine-récepteur sont retrouvés chez ce microorganisme : premièrement, il va utiliser des liens de faible affinité pour lier l'antigène-O et les phospholipides ou de courts glycolipides de l'hôte (Abul-Milh, *et al.*, 1999, Van Overbeke, *et al.*, 2002, Boekema, *et al.*, 2003, Jeannotte, *et al.*, 2003). Puis, il relie le noyau du LPS ou des protéines de surface ou les deux pour interagir avec plus d'avidité avec de plus gros récepteurs lipidiques ou des récepteurs protéiniques. Il a été démontré qu'un mutant de la souche de référence du sérotype 1 au niveau du noyau du LPS est avirulent (Rioux, *et al.*, 1999). Cela confirme le rôle important joué par celui-ci durant l'interaction entre la bactérie et l'hôte. Il a aussi été noté que des mutants défectueux au niveau de la biosynthèse de l'antigène-O du LPS adhèrent autant ou plus à une coupe de trachée congelée que la souche sauvage. L'antigène-O ne serait donc pas impliqué dans l'adhérence de la bactérie (Rioux, *et al.*, 1999). Le noyau du LPS se lie au niveau des glycosphingolipides des cellules épithéliales du tractus respiratoire, plus précisément au gangliotriaosylcéramide (GgO<sub>3</sub>) et



### 2.2.3 Toxines Apx

*A. pleuropneumoniae* produit quatre exotoxines : ApxI à IV (Tableau II). Elles font partie de la famille des toxines RTX (repeat in the structural toxin) (Schwartz, 2004). Le rôle primaire des toxines est la production de lésions au niveau des poumons porcins (Tascon, *et al.*, 1994, Kamp, *et al.*, 1997).

La toxine ApxI (105 kDa) est fortement hémolytique et cytotoxique (Frey, *et al.*, 1993). De plus, elle lie fortement le calcium. Elle est codée par l'opéron *apxICABD*. Les gènes présents sont : le gène activateur *apxIC*, les gènes structuraux de la pré-toxine *apxIA* et le gène codant pour l'appareil de sécrétion *apxIB* et *apxID* (Gygi, *et al.*, 1990, Frey, *et al.*, 1994). Les sérotypes 1, 5, 9, 10 et 11 expriment ApxI (Frey, *et al.*, 1993, Beck, *et al.*, 1994, Kamp, *et al.*, 1994).

ApxII (103-105 kDa) est produite par tous les sérotypes sauf le 10 (Frey & Nicolet, 1988, Kamp, *et al.*, 1991, Frey, *et al.*, 1992). Elle est peu hémolytique et modérément cytotoxique (Frey, *et al.*, 1993). Elle est codée par l'opéron *apxIICA* : le gène activateur *apxIIC* et le gène structural *apxIIA*. Pour être sécrétée, ApxII semble utiliser les produits des gènes *apxIBD*, présents dans tous les sérotypes sauf le 3. Elle est sécrétée dans le milieu de croissance par les sérotypes hémolytiques 1, 4 à 9, 11 et 12.

ApxIII (120 kDa) est produite et sécrétée par les sérotypes 2 à 4, 6 et 8 (Kamp, *et al.*, 1991, MacDonald & Rycroft, 1992). Elle est codée par l'opéron *apxIIICABD* (Chang, *et al.*, 1993, Jansen, *et al.*, 1993). Elle a une activité cytotoxique et proapoptotique (Seah & Kwang, 2004).

ApxIV est la toxine la moins bien caractérisée. Celle-ci est exprimée seulement *in vivo* (Schaller, *et al.*, 1999, Cho & Chae, 2001). Par contre, des études récentes ont démontré que le gène de cette toxine est surexprimé lorsque la bactérie est en contact avec du fluide bronchoalvéolaire (BALF) *in vitro* (Baltes, *et al.*, 2002, Lone, *et al.*, 2009). Elle est produite par tous les sérotypes et est peu hémolytique. C'est une toxine essentielle pour la virulence de la bactérie (Liu, *et al.*, 2009). Il a été démontré qu'ApxIV pourrait avoir un rôle dans le développement d'une réponse immunitaire contre *A. pleuropneumoniae*. Par contre, cela n'est pas suffisant pour obtenir une réponse immunitaire protectrice (Huang, *et*

*al.*, 2006). Une expérience fait avec de la toxine tronquée ApxIV recombinante indique que cette toxine pourrait jouer le rôle d'adjuvant pour un vaccin contre *A. pleuropneumoniae* (Wang, *et al.*, 2009).

Tableau II : Génotype et expression des toxines Apx chez les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* (Frey, 1995, Blackall, *et al.*, 2002).

Séro- types	<i>apxI</i>		<i>apxII</i>		<i>apxIII</i>		<i>apxIV</i>	Toxines exprimées <i>in vitro</i>	Toxines exprimées <i>in vivo</i>
	CA	BD	CA	BD	CA	BD	A		
<b>1, 5, 9 et 11</b>	+	+	+	-	-	-	+	ApxI et ApxII	ApxI, ApxII et ApxIVA
<b>2, 4, 6, et 8</b>	-	+	+	-	+	+	+	ApxII et ApxIII	ApxII, ApxIII et ApxIVA
<b>3</b>	-	-	+	-	+	+	+	ApxIII	ApxIII et ApxIVA
<b>7 et 12</b>	-	+	+	-	-	-	+	ApxII	ApxII et ApxIVA
<b>10</b>	+	+	-	-	-	-	+	ApxI	ApxI et ApxIVA
<b>13 et 14</b>	-	+	+	-	-	-	+	ApxII	nd
<b>15</b>	-	+	+	-	+	+	+	ApxII et ApxIII	nd

La sécrétion de toxines Apx cause la lyse des cellules épithéliales alvéolaires, des cellules endothéliales, des globules rouges, des neutrophiles et des macrophages (Serebrin, *et al.*, 1991, Dom, *et al.*, 1992, Dom, *et al.*, 1992, Frey, *et al.*, 1993, Frey, *et al.*, 1994, Van de Kerkhof, *et al.*, 1996). L'adhésion d'*A. pleuropneumoniae* à la surface des cellules de l'hôte permet aux toxines de la bactérie d'être libérée directement à la surface de la cellule. Cela détruit les cellules cibles et ce, même en présence d'anticorps neutralisant les toxines (Haesebrouck, *et al.*, 1997). Les sérotypes qui produisent la toxine ApxI sont particulièrement virulents. Les sérotypes qui produisent deux différentes toxines Apx *in vitro* sont généralement plus virulents que ceux qui n'en produisent seulement qu'une (Frey & Nicolet, 1988, Frey & Nicolet, 1990, Kamp, *et al.*, 1991, Frey, *et al.*, 1992). La toxine doit être sécrétée pour causer la maladie. La présence d'ApxII avec ApxI augmente fortement la virulence et la mortalité des porcs infectés (Reimer, *et al.*, 1995). Un rôle important d'ApxI et ApxII est de paralyser les défenses de l'hôte afin que le pathogène soit capable de s'implanter. Ils affectent la production de médiateurs anti-inflammatoires dans

les tissus de l'hôte, ce qui mène aux dommages sévères qui sont observés dans les poumons des animaux infectés. Les toxines sont fortement immunogéniques (Devenish, *et al.*, 1990, Frey & Nicolet, 1991). Les souches qui ne sécrètent pas ApxI ou ApxII ne donnent pas de protection contre les souches homologues sauvages (Inzana, *et al.*, 1991).

#### 2.2.4 Systèmes d'acquisition de fer

*A. pleuropneumoniae* peut utiliser la transferrine (Gerlach, *et al.*, 1992, Gonzalez, *et al.*, 1995, Wilke, *et al.*, 1997) et l'hémoglobine (Deneer & Potter, 1989, Bélanger, *et al.*, 1995, Archambault, *et al.*, 1999) de l'hôte autant que les sidérophores microbiens exogènes comme source de fer pour croître (Figure 4). La protéine liant la transferrine se lie spécifiquement à celle du porc. La protéine TbpA (100 kDa) forme un canal transmembranaire pour le transport du fer à travers la membrane externe (Gonzalez, *et al.*, 1995, Daban, *et al.*, 1996, Wilke, *et al.*, 1997). La protéine TbpB (60 kDa) est une lipoprotéine ancrée dans la membrane externe (Gerlach, *et al.*, 1992, Gonzalez, *et al.*, 1995, Fuller, *et al.*, 1998). Il existe beaucoup de divergences au niveau de TbpA-TbpB entre les sérotypes et ceux-ci induisent des réponses immunitaires spécifiques à chacun d'eux (Wilke, *et al.*, 1997). TbpB est également capable de lier l'hème (Gerlach, *et al.*, 1992). Les gènes *tbpA* et *tbpB* sont liés et co-transcrits avec les gènes *exbBD* (Gonzalez, *et al.*, 1995, Tonpitak, *et al.*, 2000). ExbB et ExbD forment un complexe protéique dans la membrane interne en association avec TonB et fournit l'énergie à un récepteur à haute affinité capable de transporter le fer à travers la membrane externe (exemple : TbpA). Un cadre ouvert de lecture est trouvé en amont du gène *exbB* et est peut-être sous le contrôle du même promoteur régulé par le fer. L'expression d'ExbB et d'ExbD est essentielle pour acquérir le fer à partir de la transferrine. Les mutants *exbB* et *tonB* sont avirulents (Fuller, *et al.*, 2000, Baltes, *et al.*, 2001).

L'hème libre, l'hémine, l'hématine et l'hémoglobine peuvent également être utilisés comme source de fer (Frey, *et al.*, 1993). Il est possible d'obtenir ces produits grâce à l'activité d'hémolysines. La bactérie sécrète aussi une protéase de haute masse moléculaire qui a une faible activité contre l'hémoglobine porcine *in vitro* (Negrete-Abascal, *et al.*, 1994, Garcia-Cuellar, *et al.*, 2000). Les LPS et les protéines de la membrane externe sont impliqués dans l'attachement de l'hémoglobine à la surface de la bactérie. Le lipide A

purifié lie l'hémoglobine purifiée du porc *in vitro* (Bélangier, *et al.*, 1995, Archambault, *et al.*, 1999). Le fer est transféré dans le cytoplasme par un transporteur ABC qui est codé par l'opéron *afuABC* (Chin, *et al.*, 1996). Une lipoprotéine de 75 kDa et une autre de 105 kDa sont capables de lier l'hémoglobine (Wilke, *et al.*, 1997). La protéine de 75 kDa peut aussi lier l'hème. La protéine de 105 kDa montre une forte homologie avec la protéine HgbA qui lie l'hémoglobine chez d'autres *Pasteurellaceae* (Srikumar, *et al.*, 2004). De plus, le gène *hgbA* est présent dans toutes les souches de référence et la délétion de celui-ci empêche l'interaction avec l'hémoglobine (Shakarji, *et al.*, 2006). Le transport du ferrichrome (un sidérophore de type hydroxamate) est codé par quatre gènes. Le gène *fhuA* code pour une protéine de la membrane externe (OMP) FhuA de 77 kDa qui est le récepteur pour le ferrichrome. FhuD (35,6 kDa) est une protéine périsplasmique qui est responsable de la translocation de l'hydroxamate ferrique de la membrane externe à la membrane interne. FhuC (28,5 kDa) et FhuB (69,4 kDa) sont des protéines associées à la membrane cytoplasmique et forment un transporteur ABC qui internalise l'hydroxamate ferrique. Toutes les souches de référence (1 à 15) possèdent ces gènes (Mikael, *et al.*, 2002).

Des études de biopuces ont été faites récemment et celles-ci ont démontré qu'il y avait 210 gènes exprimés de manière différente entre des conditions limitantes et non-limitantes de fer (Deslandes, *et al.*, 2007). Lorsque le fer est présent en quantité limitée, il y a 92 gènes surexprimés. Entre autres, on retrouve les gènes *tonB1*, *tonB2*, *tbpA* et *hgbA* qui ont déjà été décrits (Deslandes, *et al.*, 2007).

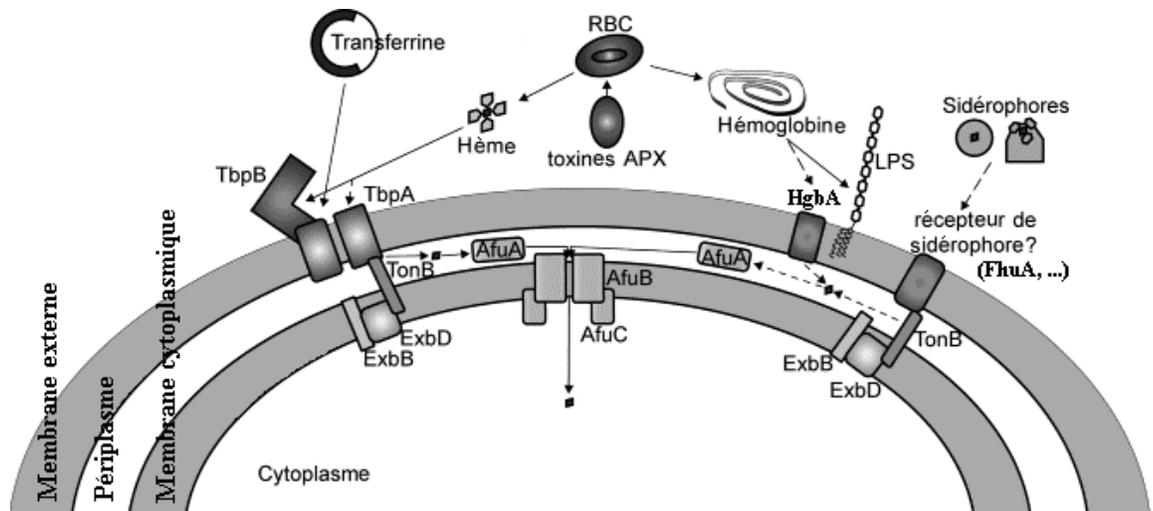


Figure 4 : Représentation schématique des différents mécanismes d'acquisition du fer retrouvés chez *A. pleuropneumoniae*. Adaptée de Bossé *et al.* (Bossé, *et al.*, 2002). Les protéines TbpA et TbpB lient et transportent la transferrine et l'hème dans le périplasm. Le LPS a la capacité de lier l'hémoglobine. Le transport du ferrichrome (sidérophore de type hydroxamate) est fait par les protéines FhuA, B, C et D. Les protéines ExbB, ExbD et TonB fournissent l'énergie nécessaire pour le transport des molécules de fer dans le périplasm. Le complexe protéique AfuABC transporte les molécules de fer dans le cytoplasme de la bactérie.

### 2.2.5 Autres facteurs

Il existe plusieurs autres facteurs de virulence qui ont été moins étudiés jusqu'à maintenant. Zhang *et al* ont purifié des fimbriae et des sous-unités fibrillaires chez les sérotypes 1, 2, 7 et 12 (Zhang, *et al.*, 2000). La production de fimbriae n'est cependant pas constante *in vitro* (Zhang, *et al.*, 2000) et l'expression de ceux-ci semble être régulée par les conditions de croissance *in vivo*. Des isolats d'*A. pleuropneumoniae* récupérés dans les poumons, les cavités nasales et les amygdales démontrent la présence de fimbriae. Cela serait donc important pour la colonisation des trois sites (Utrera & Pijoan, 1991).

Un des facteurs de virulence qui est présentement à l'étude est la formation de biofilms par la bactérie. Des études ont mis en évidence que la majorité des souches de champ d'*A. pleuropneumoniae* de même que certaines souches de référence en produisaient (Kaplan & Mulks, 2005, Labrie, *et al.*, 2010). Il a également été démontré que les biofilms jouent un

rôle chez *Actinobacillus actinomycetemcomitans* au niveau de la transmission, de la colonisation et de la pathogénéicité (Kaplan, *et al.*, 2004). Le locus *pgaABCD* code pour un polysaccharide extracellulaire de haut poids moléculaire qui est le substrat de la dispersine B (Kaplan, *et al.*, 2004). Ce polysaccharide se nomme PGA (poly-N-acétyl-glucosamine). Chez *A. pleuropneumoniae*, Kaplan *et al.* (2004) ont trouvé des gènes orthologues à ceux retrouvés chez *A. actinomycetemcomitans*. Ils suggèrent donc que la formation de biofilm par *A. pleuropneumoniae* fonctionne de la même manière et qu'elle ait la même fonction que chez *A. actinomycetemcomitans*. En fait, la formation de biofilms peut augmenter la résistance de la bactérie contre le système immunitaire de l'hôte en interférant avec l'activité phagocytaire des macrophages, en empêchant les anticorps d'atteindre la surface bactérienne et en diminuant la sensibilité des bactéries face aux PMNs (Donlan & Costerton, 2002, Boyen, *et al.*, 2009).

Pour traiter la maladie de manière optimale, il est important de connaître les conditions de croissance bactérienne exprimant les gènes de virulence. Pour ce faire, différentes comparaisons d'expression de gènes dans différentes conditions de croissance d'*A. pleuropneumoniae* ont été réalisées. Entre autres, des expériences ont été faites dans des conditions de restriction de fer versus un milieu ayant du fer en excès (Deslandes, *et al.*, 2007), des bactéries liées à des cellules SJPL versus des bactéries dans le surnageant de culture cellulaire (Auger, *et al.*, 2009), des bactéries cultivées dans du fluide BALF versus du milieu de culture riche (Lone, *et al.*, 2009) et lors d'une infection naturelle aiguë chez le porc versus la croissance *in vitro* dans un milieu riche (Deslandes, *et al.*, 2010). Ces différentes expériences ont démontré que différents gènes sont exprimés à des niveaux variés selon l'environnement dans lequel se trouve la bactérie.

## 2.3 Réponse immunitaire

### 2.3.1 Macrophages

Les macrophages alvéolaires (AMs) sont les cellules phagocytaires prédominantes retrouvées dans le tractus respiratoire inférieur (Sibille & Reynolds, 1990). *A. pleuropneumoniae* peut survivre plus de 90 minutes dans les macrophages permettant à la bactérie de libérer les toxines Apx et de lyser les phagocytes. Cela est possible grâce à la

présence de carbohydrates présents dans la capsule et les LPS (Bilinski, 1991), la sécrétion de toxines Apx (Cruijssen, *et al.*, 1992), de protéines de choc thermique (Fuller, *et al.*, 2000), d'ammonium (Bossé & MacInnes, 2000) et d'une dismutase superoxyde cuivre-zinc (Langford, *et al.*, 1996, Sheehan, *et al.*, 2000). D'autres études ont démontré que les polysaccharides de la capsule d'*A. pleuropneumoniae* possèdent des propriétés anti-phagocytaires (Inzana, *et al.*, 1988, Rycroft & Cullen, 1990, Udeze & Kadis, 1992, Ward & Inzana, 1994, Ward, *et al.*, 1998, Rioux, *et al.*, 1999, Rioux, *et al.*, 2000).

### 2.3.2 Leucocytes polymorphonucléaire (PMNs)

Le nombre de PMNs dans le poumon est généralement faible, mais augmente rapidement lorsqu'il y a une infection et ces derniers peuvent tuer *A. pleuropneumoniae* (Cruijssen, *et al.*, 1992). Le recrutement et l'activation rapide des PMNs amènent le relâchement de radicaux libres d'oxygène qui sont toxiques. Ils relâchent aussi la myéloperoxydase.

### 2.3.3 Cytokines

Il a été démontré que suite à une infection expérimentale avec *A. pleuropneumoniae* de sérotype 1 une production de cytokines proinflammatoires telles qu'IL-1 $\alpha$  et  $\beta$ , IL-6, IL-8 et TNF- $\alpha$  se produit (Baarsch, *et al.*, 2000). Ces cytokines apparaissent deux heures après l'inoculation dans les poumons et sont localisées près des lésions (Huang, *et al.*, 1999). Lors d'une infection expérimentale avec *A. pleuropneumoniae* de sérotype 2, IL-6 est détectable dans le sérum lors de la phase aiguë de l'infection, donc quelques heures après l'infection (Fossum, *et al.*, 1998).

La présence de TNF- $\alpha$  est associée à une perte de poids, une dépression et des problèmes respiratoires (Harding, *et al.*, 1997). Lors d'une infection avec *A. pleuropneumoniae*, TNF- $\alpha$  n'est pas détecté dans le plasma porcin et le BALF avant ou après l'infection expérimentale avec *A. pleuropneumoniae* de sérotype 1 ou 2 (Baarsch, *et al.*, 1995, Fossum, *et al.*, 1998, Balaji, *et al.*, 2002). L'hybridation *in situ* des poumons démontre un signal positif pour TNF- $\alpha$  (Baarsch, *et al.*, 1995, Cho & Chae, 2002) lorsque ceux-ci sont infectés de manière expérimentale ou naturelle, mais cela ne semble pas corrélé avec une mesure systémique de TNF- $\alpha$ .

Il est possible de détecter différents niveaux d'IFN- $\gamma$  dans le plasma et le BALF. Des études ont démontré la présence d'IFN- $\gamma$  dans le sérum porcin, mais elles n'ont pas démontré de corrélation avec les signes cliniques (Baarsch, *et al.*, 1995). D'autres études ont démontré que la présence d'IFN- $\gamma$  n'était pas détectable dans le sérum (Fossum, *et al.*, 1998). Une étude a suggérée une corrélation positive entre le niveau d'IFN- $\gamma$  dans le plasma au jour 4 post-infection et des signes cliniques chez les porcs. Le niveau d'IFN- $\gamma$  augmente significativement dans le BALF jusqu'à 21 jours post-infection suggérant une réponse immunitaire présente sur une longue période de temps après l'infection. Cela correspond à une augmentation du nombre de lymphocytes dans le BALF, une population de cellules immunitaires importantes dans le tractus respiratoire chez les porcs (Pabst & Binns, 1994). Une étude récente a démontré que l'activation de certains marqueurs immunitaires *in vitro* et *in vivo* est différente dépendamment des lignées porcines (Benga, *et al.*, 2009). Le taux d'IFN- $\gamma$  augmente après une infection avec *A. pleuropneumoniae* chez les porcs de la race German Landrace qui sont plus susceptibles à l'infection. Chez les porcs de lignée Hampshire, le niveau d'IFN- $\gamma$  n'augmente pas et ceux-ci sont plus résistants aux infections. De plus, il y aurait corrélation partielle avec la pathogenèse de la maladie. Il semble que la susceptibilité des différentes lignées de porcs face à *A. pleuropneumoniae* serait reliée à différents phénotypes immunitaires, probablement dû à différentes origines génétiques (Benga, *et al.*, 2009). Comme IFN- $\gamma$ , le cathélicidine PR-39 produit par les neutrophiles augmente dans le BALF, mais n'augmente pas dans le sérum après 21 jours d'infection avec *A. pleuropneumoniae* (Hennig-Pauka, *et al.*, 2006). Cette réponse doit être probablement en corrélation avec l'augmentation du nombre de neutrophiles dans le BALF.

Des études ont démontré qu'il y avait un très faible taux d'IL-10 pouvant être mesuré dans le plasma des animaux infectés expérimentalement avec *A. pleuropneumoniae* de sérotype 7 après 4 et 21 jours d'infection, mais cela ne peut pas être détecté dans le BALF (Benga, *et al.*, 2009).

#### 2.3.4 Système du complément

Les souches avec une capsule ne préviennent pas l'activation du complément ou la liaison du C3 (Bertram, 1988). La liaison de l'anticorps anti-capsule se fait à distance de la membrane cellulaire. Donc, le C9 qui est une composante du complexe d'attaque

membranaire a un accès limité à la membrane cellulaire (Ward & Inzana, 1994). La cascade alternative pour l'activation du complément est induite par les LPS de la bactérie et il y a largage de C3a et C5a. Ceux-ci attirent et activent les PMNs et les macrophages qui stimulent le relâchement des médiateurs inflammatoires cycloxygénase-dépendants. Le résultat est l'activation des plaquettes, la vasodilatation et la constriction des voies pulmonaires.

### 3. Syndrome reproducteur et respiratoire porcin

#### 3.1 Généralités

##### 3.1.1 Historique

Le syndrome reproducteur et respiratoire porcin a été reporté pour la première fois aux États-Unis en 1987 (Keffaber, 1989) et en Europe en 1990 (Wensvoort, *et al.*, 1991, Schwartz, 2004). L'agent étiologique de la maladie, soit le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP), fut découvert en Europe en 1991 et en Amérique du Nord en 1992 (Thiry, 2004). Il a été démontré que la souche Américaine et Européenne étaient distinctes. Par contre, la souche nord-américaine a été disséminée en Europe par un vaccin atténué fait à partir de la souche nord-américaine (Botner, *et al.*, 1997). En Asie, les deux souches sont présentes. Au début des années 90, la maladie était épidémique. Le VSRRP est présent partout dans le monde et est l'une des maladies qui causent le plus de pertes économiques au niveau des maladies infectieuses dans la production porcine (Neumann, *et al.*, 2005). Au Canada, la première infection fut rapportée en 1992 (Schwartz, 2004).

##### 3.1.2 Signes cliniques

Les signes cliniques majeurs sont des échecs de reproduction sévères chez les truies (Keffaber, 1989, Bilodeau, *et al.*, 1991, Loula, 1991, Pol, *et al.*, 1991, Christianson, 1992, Albina, 1997) et des problèmes respiratoires qui peuvent être associés à des porcs de tout âge avec une pneumonie interstitielle lymphomononucléaire non-spécifique (Keffaber, 1989, Bilodeau, *et al.*, 1991, Loula, 1991, Collins, *et al.*, 1992, Rossow, *et al.*, 1994, Halbur, *et al.*, 1996). La période d'incubation dure 3 à 37 jours (Thiry, 2004). Les signes cliniques varient beaucoup car ils dépendent de plusieurs de facteurs dont la virulence du virus, l'âge des porcs infectés, la présence de co-infection, la grosseur du troupeau et des conditions sanitaires et de régie (Schwartz, 2004).

Les signes cliniques généraux sont, chez la truie, l'anorexie, la toux et la dyspnée, un appétit capricieux, la fièvre, de l'agalaxie, de la léthargie et de la décoloration cutanée. Il peut y avoir aussi une cyanose des extrémités et des parties déclives 5 à 7 jours après le début des signes cliniques qui ne durent que quelques minutes à quelques heures. Les

principaux signes cliniques des troubles de reproduction chez la truie sont des avortements tardifs, des mises-bas prématurées ou un allongement anormal de la durée de la gestation et une baisse de fertilité. Dans les portées des truies infectées, il y a des porcelets morts-né, faibles et normaux (Thiry, 2004).

Les signes cliniques qui apparaissent chez les verrats sont une baisse de libido, une réduction du volume de la semence, des malformations des spermatozoïdes et une réduction de leur mobilité pouvant persister jusqu'à 13 semaines (Thiry, 2004).

L'insémination avec de la semence contaminée conduit à l'infection de la truie. Les porcelets infectés *in utero* ou à la naissance développent une dyspnée grave, une conjonctivite, un œdème des paupières, une coloration cyanosées des oreilles, de l'inappétence, de la fièvre, de l'érythème cutané, de la diarrhée, des tremblements, des poils rugueux, de l'anorexie et des signes nerveux centraux. Le taux de mortalité est près de 100% (Thiry, 2004).

La maladie respiratoire apparaît chez les porcs de tous âges, mais principalement chez les porcs en engraissement. Les signes cliniques sont de la fièvre, des pneumonies, de l'abattement et l'augmentation de la mortalité. Lorsque les porcs sont sevrés, il y a une chute de l'immunité maternelle, ils deviennent donc susceptibles à l'infection. Des infections secondaires peuvent aggraver le tableau clinique. Elles sont plus sévères chez les porcelets et diminuent d'intensité avec l'âge du porc (Thiry, 2004).

### 3.2 Agent étiologique

#### 3.2.1 Taxonomie

Le VSRRP est classé dans l'ordre *Nidovirales*, dans la famille *Arteriviridae* et dans le genre *Arterivirus* comme le virus de l'artérite virale équine (EAV), le virus de la fièvre hémorragique du singe (SHFV) et le virus du déséquilibre de la lactate déshydrogénase (LDHV). Le virus possède un génome à ARN monocaténaire de polarité positive. Il est enveloppé (Benfield, *et al.*, 1992, Cavanagh, 1997) et il a une morphologie pléomorphe avec une forme ovale creuse d'une dimension de 50 à 65 nm. Il a un cœur de 40 nm et une surface externe lisse parsemée de complexes protéiques. Le cœur du VSRRP consiste en

une nucléocapside hélicoïdale (Spilman, *et al.*, 2009). La survie en dehors de son hôte est affectée par la température, le pH et l'exposition à des détergents. Le virus peut survivre à des températures entre  $-20^{\circ}\text{C}$  et  $-70^{\circ}\text{C}$ . Le virus est infectieux lorsque le pH se maintient entre 6,0 et 7,65 (Bloemraad, *et al.*, 1994). Le chloroforme et l'éther sont particulièrement efficace pour détruire l'enveloppe virale et élimine les virions infectieux (Benfield, *et al.*, 1992). Le virus est relativement fragile dans l'environnement, mais de bonnes conditions permettent au virus de se transmettre via aérosol à plus de 4,7 km (Dee, *et al.*, 2009).

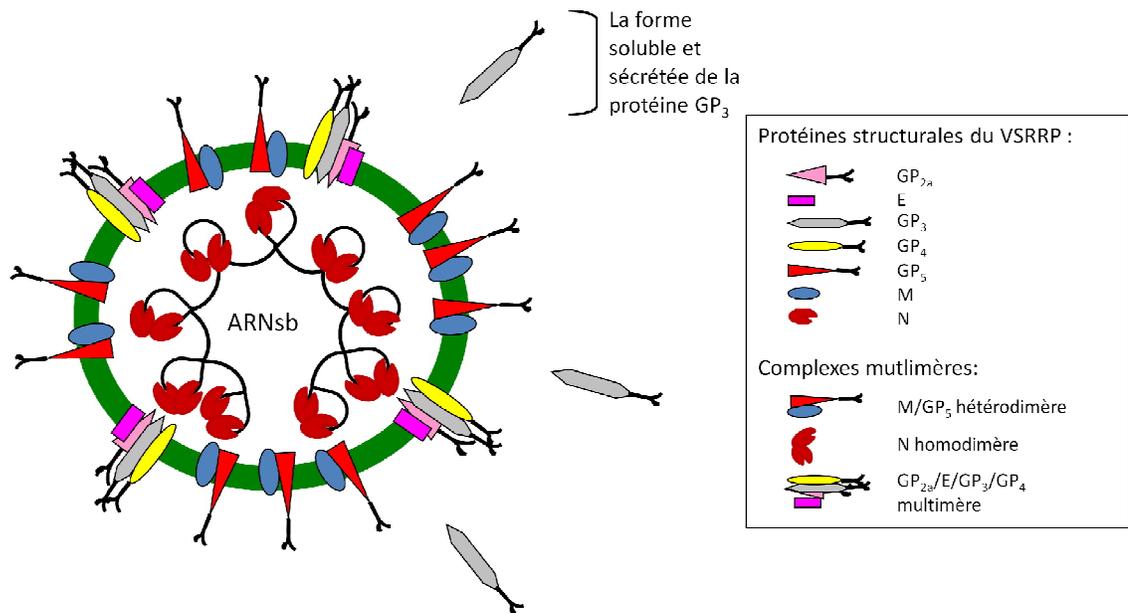


Figure 5 : Représentation schématique du VSRRP. Adaptée de Music et Gagnon (Music & Gagnon, 2010). Le virion a comme génome un simple brin d'ARN contenu à l'intérieur de la protéine de la nucléocapside (N). La protéine N est la seule composante de la capsid et elle interagit avec elle-même pour former un homodimère. La protéine majeure de l'enveloppe (GP<sub>5</sub>) forme un hétérodimère avec la protéine de la membrane (M). Les protéines de structures mineures (GP<sub>2a</sub>, E, GP<sub>3</sub> et GP<sub>4</sub>) sont incorporées dans le virion en complexe multimérique. La protéine GP<sub>3</sub> a aussi été reportée comme une protéine sécrétée chez le génotype américain.

### 3.2.2 Caractéristiques génotypiques

Le génome est d'environ 15 kilobases et contient 9 cadres de lecture (ORF). L'extrémité 5' du génome contient une coiffe et l'extrémité 3' est polyadénylée (Allende, *et al.*, 1999, Gorbalenya, *et al.*, 2006). L'ORF1a et l'ORF1ab est transcrit par un glissement ribosomal entre ORF1a et l'ORF1b ce qui produit les polyprotéines pp1a et pp1ab (Brierley, 1995, Snijder & Meulenberg, 1998). La pp1a est clivée à huit sites différents pour former neuf nsps : nsp1 $\alpha$ , nsp1 $\beta$  et nsp2 à nsp8 (den Boon, *et al.*, 1995, Snijder & Meulenberg, 1998). Tandis que le clivage protéolytique de la portion pp1ab produit les nsp9 à nsp12 (van Dinten, *et al.*, 1996). Ceux-ci sont impliqués dans la transcription et la réplication du virus (van Dinten, *et al.*, 1996, Snijder & Meulenberg, 1998). Sept ORFs codent pour des protéines structurales. Les ORFs 3 à 5 codent pour des glycoprotéines (GP<sub>3</sub> à GP<sub>5</sub>). L'ORF 2 est formé de deux cadres de lecture (ORF2a et ORF2b) et ceux-ci codent pour deux protéines différentes (GP<sub>2</sub> et E). La nucléocapside (N) et la protéine de la matrice (M) sont codées respectivement par l'ORF7 et l'ORF6 (Meulenberg, *et al.*, 1995).

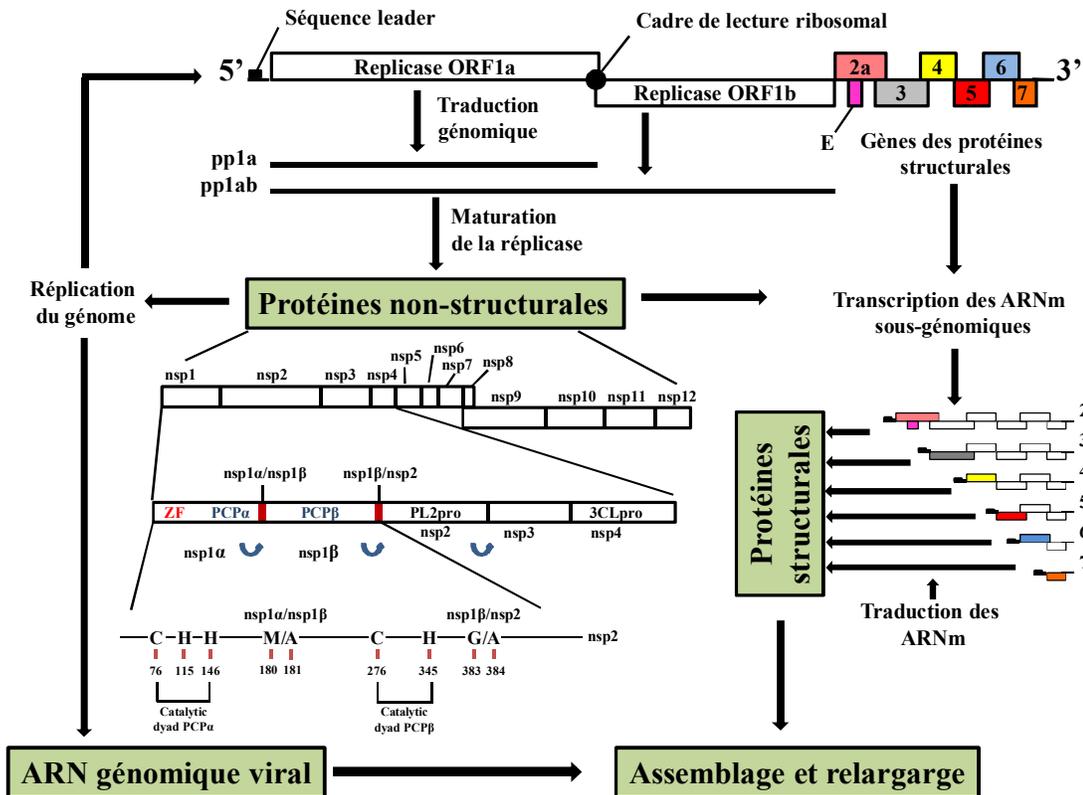


Figure 6 : L'organisation génomique du VSRGP. Adaptée de Music et Gagnon. (Music & Gagnon, 2010). Les polyprotéines 1a et 1ab (pp1a et pp1ab) sont exprimés à partir de l'ARN du génome viral. Les protéines structurales sont exprimées à partir d'ARNm sous génomiques. Pp1a est clivée dans 8 sites différents et forme neuf protéines non-structurales (nsp1 $\alpha$ , nsp1 $\beta$  et nsp2 à nsp8). Le clivage protéolytique de pp1ab produit nsp9 à nsp12. L'arrangement de pp1a et pp1ab est médié par des protéinases accessoires localisées dans nsp1 (PCP $\alpha$  et PCP $\beta$ ).

Les protéines structurales majeures sont GP<sub>5</sub>, M et N. La protéine GP<sub>5</sub> est la plus importante protéine de structure exposée à la surface du virion et contient les épitopes nécessaires pour la neutralisation et la protection (Pirzadeh & Dea, 1997, Pirzadeh & Dea, 1998, Gonin, *et al.*, 1999, Wissink, *et al.*, 2003, Ansari, *et al.*, 2006). Les anticorps monoclonaux contre GP<sub>5</sub> sont capables de neutraliser le virus dans des cultures cellulaires (Pirzadeh & Dea, 1997, Zhang, *et al.*, 1998, Gonin, *et al.*, 1999, Weiland, *et al.*, 1999). *In vivo*, la majorité des anticorps neutralisants dans les animaux infectés sont dirigés contre

GP<sub>5</sub> (Gonin, *et al.*, 1999). Les porcs vaccinés avec des vaccins génétiques qui expriment la protéine GP<sub>5</sub> produit des anticorps neutralisants contre VSRRP (Pirzadeh & Dea, 1998, Kheyar, *et al.*, 2005, Jiang, *et al.*, 2006) et les porcs peuvent être partiellement protégés contre une virémie généralisée et les lésions pulmonaires lors d'une infection au VSRRP (Pirzadeh & Dea, 1998, Xue, *et al.*, 2004, Qui, *et al.*, 2005). Il y a deux épitopes : un épitope neutralisant et un autre non-neutralisant (Ostrowski, *et al.*, 2002). Le porc développe des anticorps contre l'épitope non-neutralisant en premier et les anticorps contre l'épitope neutralisant apparaissent plus tard. L'épitope non-neutralisant permettrait ainsi un délai pour la production d'anticorps neutralisants ce qui pourrait être un mécanisme d'évasion immunitaire par le VSRRP (Plagemann, 2004). Des études ont également mis en évidence que la glycolysation de GP<sub>5</sub> joue un rôle pour échapper ou minimiser la neutralisation du VSRRP par des anticorps par le mécanisme de bouclier par le glycan (Wissink, *et al.*, 2003). Ce phénomène facilite l'attachement et l'internalisation du virus à l'intérieur des macrophages et des monocytes (Cancel-Tirado & Yoon, 2003).

La protéine M a un rôle dans l'assemblage du virion. Cette protéine est codée par l'ORF6. Celle-ci forme des liens disulfides avec la glycoprotéine GP<sub>5</sub>. Cette liaison est nécessaire pour l'infectivité du virus (Mardassi, *et al.*, 1996, Verheije, *et al.*, 2002).

La protéine N est petite (15 kDa) et très basique facilitant ainsi son interaction avec l'ARN génomique pour l'assemblage de la nucléocapside (Meulenberg, *et al.*, 1993). Cette protéine est hautement immunogénique chez les porcs (Nelson, *et al.*, 1993, Meulenberg, *et al.*, 1995, Meulenberg, *et al.*, 1995, Loemba, *et al.*, 1996) et les souris (Nelson, *et al.*, 1993, van Nieuwstadt, *et al.*, 1996, Rodriguez, *et al.*, 1997, Meulenberg, *et al.*, 1998). La protéine N possède des propriétés lui permettant de se dimériser avec elle-même et cela est la base pour l'assemblage de la nucléocapside du VSRRP. De plus, une fraction de la protéine N se retrouve dans le noyau et le nucléole durant l'infection des macrophages alvéolaires de porcs et des cellules MARC-145 (Rowland, *et al.*, 1999). Cette protéine a un rôle au niveau de la structure du virion. Elle a aussi un rôle dans la pathogenèse et dans la régulation de gènes cellulaires.

Les protéines structurales mineures de l'enveloppe glycosylées sont GP<sub>2a</sub> (29-30 kDa), GP<sub>3</sub> (45-50 kDa) et GP<sub>4</sub> (31-35 kDa). Elles forment des hétérodimères liés par des liens

disulfide (Wissink, *et al.*, 2005). Il y a aussi une protéine qui n'est pas glycosylée, nommée protéine E (Wu, *et al.*, 2001).

La glycosylation de la protéine GP<sub>2a</sub> n'est pas essentielle à la formation de particules virales (Wissink, *et al.*, 2004). Cette protéine a des épitopes immunogéniques (de Lima, *et al.*, 2006) et antigéniques (Oleksiewicz, *et al.*, 2002).

La protéine E est une petite protéine (10 kDa) hydrophobe qui est associée à la membrane (Snijder, *et al.*, 1999, Wu, *et al.*, 2001). La protéine est incorporée dans la structure de l'enveloppe du virion (Wu, *et al.*, 2005). Elle est associée de manière covalente avec l'hétérotrimère GP<sub>2a</sub>-GP<sub>3</sub>-GP<sub>4</sub> ce qui suggère qu'elle aurait un rôle critique dans ce complexe protéique (Wissink, *et al.*, 2005). De plus, il a été démontré que les protéines N et E forment une association non covalente cystéine indépendante. Un mutant knock-out de la protéine E a démontré que cette protéine était essentielle pour que le VSRRP soit infectieux, mais elle n'est pas nécessaire pour la formation de particules virales (Lee & Yoo, 2006). Il est possible que le virus ait un canal permettant le transport d'ions afin de promouvoir la décapsidation du virus. La myristoylation de la protéine E a été étudiée. Selon les résultats obtenus, ceci ne serait pas nécessaire pour que le VSRRP soit infectieux, mais elle permet la croissance du virus (Du, *et al.*, 2010).

La protéine GP<sub>3</sub> est une protéine hautement glycosylée (Meulenberg, *et al.*, 1995). Chez le génotype européen, la protéine est incorporée dans le virion (Meulenberg, *et al.*, 1995, van Nieuwstadt, *et al.*, 1996) et est associée à la membrane comme un hétérotrimère avec les protéines GP<sub>2</sub> et GP<sub>4</sub> (Wissink, *et al.*, 2005). Chez le génotype américain, c'est plutôt une protéine non structurale qui est sécrétée par les cellules infectées par le VSRRP (Gonin, *et al.*, 1998, Mardassi, *et al.*, 1998). La protéine GP<sub>3</sub> est hautement antigénique (Katz, *et al.*, 1995, Faaberg & Plagemann, 1997, Gonin, *et al.*, 1998, Hedges, *et al.*, 1999). Elle est peut-être impliquée dans la neutralisation du virus avec l'aide des protéines GP<sub>5</sub> et M (Cancel-Tirado, *et al.*, 2004).

La protéine GP<sub>4</sub> est une protéine membranaire (Meulenberg, *et al.*, 1995) et elle est hautement glycosylée durant le transport à travers le complexe du réticulum endoplasmique et le système de Golgi (van Nieuwstadt, *et al.*, 1996). GP<sub>4</sub> est capable d'induire des

anticorps neutralisants (Meulenberg, *et al.*, 1997, Weiland, *et al.*, 1999). GP<sub>4</sub> est capable d'altérer la synthèse de l'ARNm cellulaire (Lee, *et al.*, 2004). Cela impliquerait que GP<sub>4</sub> serait capable d'utiliser ou de changer les composantes de la cellule hôte pour l'utiliser pour le transport du virus ou changer les composantes de la surface cellulaire.

Nsp1 est une protéine multifonctionnelle (den Boon, *et al.*, 1995, Tijms, *et al.*, 2001, Tijms & Snijder, 2003, Oleksiewicz, *et al.*, 2004, Kroese, *et al.*, 2008). La concentration intracellulaire de nsp1 est plus élevée que les autres nsp, car il y a traduction hétéroclite des ARN (Yuan, *et al.*, 2000). Le cycle de réplication du VSRRP dépend du bon arrangement des jonctions nsp1 $\alpha$ /nsp1 $\beta$  et nsp1 $\beta$ /nsp2 (Kroese, *et al.*, 2008). Les sites de clivage de ces protéines sont bien conservés entre les isolats du VSRRP américains (Chen, *et al.*, 2010). Nsp2 est une protéine réplivative (Ziebuhr, *et al.*, 2000, Allison, *et al.*, 2006). La partie C-terminale de nsp2 forme une interaction non covalente avec nsp3 et forme un échafaudage qui supporte la formation de vésicules à double membranes et le complexe de réplication du virus (Snijder, *et al.*, 1994, Snijder & Meulenberg, 1998, Ziebuhr, *et al.*, 2000, Snijder, *et al.*, 2001). Ces nsps du VSRRP jouent un rôle clé dans l'arrangement et la maturation du répertoire des protéines de structure et les protéines nsp du virion (Johnson, *et al.*, 2007).

L'ORF1b contient nsp9 qui est une ARN polymérase ARN-dépendant, nsp10 qui contient un domaine de liaison de métal et un nucléoside liaison de triphosphate ou un motif hélicase et deux protéines dont la fonction sont inconnues (nsp11 et nsp12) (Gorbalenya, *et al.*, 1989, den Boon, *et al.*, 1991, Godeny, *et al.*, 1993, Meulenberg, *et al.*, 1993, Herold, *et al.*, 1996, van Dinten, *et al.*, 1996, Snijder & Meulenberg, 1998, Allende, *et al.*, 1999, Nelsen, *et al.*, 1999, van Dinten, *et al.*, 1999, Allende, *et al.*, 2000, Shen, *et al.*, 2000, Wootton, *et al.*, 2000, Bautista, *et al.*, 2002). Nsp10 possède une NTPase thermolabile et sensible au pH qui est modulée par des polynucléotides (Bautista, *et al.*, 2002). Ces nsps jouent un rôle dans la pathogenèse du virus et diminue la réponse immunitaire de l'hôte contre le virus.

Le VSRRP a un taux de variabilité antigénique et génomique élevé. Les souches nord-américaines diffèrent de celles européennes. L'homologie est faible entre les génotypes nord-américain et européen (59% à 63% d'homologie) (Mardassi, *et al.*, 1994, Baarsch, *et al.*, 1995, Mardassi, *et al.*, 1995, Meng, *et al.*, 1995). Cela indique une séparation ancienne

entre ces deux lignées virales (Thiry, 2004). Il y a des différences majeures au niveau de l'ORF1 entre les deux génotypes (Allende, *et al.*, 1999, Nelsen, *et al.*, 1999). La protéine GP<sub>5</sub> est la protéine structurale la moins conservée entre les deux génotypes (51% à 55% d'homologie) (Meulenbergh, 2000). Les séquences nucléotidiques de cette protéine ont une homologie entre 88% et 99% pour les souches d'un même continent. Cela explique la variation du nombre de sites de glycolysation entre les souches (de zéro à trois) (Meng, *et al.*, 1995, Pirzadeh, *et al.*, 1998). La protéine structurale la mieux conservée est la protéine M (78% à 81% d'homologie entre le génotype américain et européen) (Meulenbergh, 2000). Une région hautement conservée entre le génotype nord-américain et européen est présente chez la protéine N (Paton, *et al.*, 1991, Meulenbergh, *et al.*, 1998, Wootton, *et al.*, 1998). La séquence alignée des nucléotides montrent 59% d'homologie entre les deux génotypes.

### 3.2.3 Tropisme cellulaire

Le virus a la capacité de se répliquer *in vitro* dans des cultures primaires de macrophages alvéolaires pulmonaires de porc et des cellules de reins provenant de singe vert africain (MA-104) et des dérivés de celles-ci (CL2621 ou MARC-145) (Benfield, *et al.*, 1992, Kim, *et al.*, 1993). Récemment, le laboratoire du Dr Gagnon, en collaboration avec celui du Dr Jacques, a découvert une nouvelle lignée cellulaire permissive au VSRRP. Il s'agit des cellules SJPL (St-Jude porcine lung) (Lévesque, *et al.*, 2009). Il est également possible de faire la transfection d'ARN génomique pour que le virus se réplique dans des lignées cellulaires qui ne peuvent pas être infectées par des particules virales (Meulenbergh, *et al.*, 1998).

Des récepteurs pour le VSRRP ont été identifiés sur les macrophages alvéolaires de porcs. Il s'agit de l'héparine sulfate pour l'attachement, la sialoadhésine pour l'attachement et l'internalisation et la vimentine (Delputte, *et al.*, 2002, Delputte & Nauwynck, 2004, Kim, *et al.*, 2006, Delputte, *et al.*, 2007, Delputte, *et al.*, 2007). Quand l'héparine sulfate et la sialoadhésine sont présentes sur des cellules non-permissives au virus, le virus peut être internalisé, mais ne peut pas être libéré et infectieux. Il a été démontré que le CD163 est un récepteur cellulaire nécessaire pour la libération du VSRRP (Calvert, *et al.*, 2007, Van Gorp, *et al.*, 2008, Patton, *et al.*, 2009). Des cellules non-permissives exprimant la sialoadhésine et le CD163 sont clairement plus susceptibles au VSRRP (Van Gorp, *et al.*,

2008). La molécule CD151 serait une protéine liant l'extrémité 3'-UTR de l'ARN (Shanmukhappa, *et al.*, 2007). Cette molécule fait partie de la superfamille tétraspanine qui a plusieurs fonctions cellulaires telles que la signalisation cellulaire, l'activation cellulaire et l'agrégation de plaquettes (Hasegawa, *et al.*, 1998, Fitter, *et al.*, 1999, Sincock, *et al.*, 1999). Les expériences ont démontré que le récepteur CD151 joue un rôle critique dans l'infection du virus *in vitro* (Shanmukhappa, *et al.*, 2007).

*In vivo*, le virus se multiplie dans les macrophages alvéolaires du poumon, les macrophages ou cellules dendritiques des amygdales, des nœuds lymphatiques, du thymus, de la rate, des plaques de Peyer, du foie, des reins, des glandes surrénales et du cœur. Le virus infecte les porcs et les sangliers. (Halbur, *et al.*, 1995, Halbur, *et al.*, 1996, Duan, *et al.*, 1997, Beyer, *et al.*, 2000). Les organes cibles du VSRRP sont les poumons, les tissus lymphoïdes, les plaques de Peyer et les reins (Sur, *et al.*, 1996, Haynes, *et al.*, 1997).

#### 3.2.4 Pathogenèse

*In vivo*, la multiplication du virus débute 12 heures après l'inoculation et le virus atteint la circulation sanguine et les organes viscéraux via le système lymphatique. Une multiplication massive se produit dans la rate et les nœuds lymphatiques. Il y a l'apparition des anticorps au 7<sup>ième</sup> jour post-inoculation. Le virus et les cellules infectées sont éliminés sauf dans les poumons, les nœuds médiastinaux et les amygdales où le virus persiste de 5 à 10 semaines. Il peut y avoir une infection persistante qui dure plus de 2 mois, car le virus est capable de se multiplier dans les monocytes et les macrophages (Thiry, 2004).

Le VSRRP induit l'apoptose *in vivo* et *in vitro* (Suarez, *et al.*, 1996, Sur, *et al.*, 1997, Sirinarumitr, *et al.*, 1998, Choi & Chae, 2002, Kim, *et al.*, 2002, Labarque, *et al.*, 2003, Miller & Fox, 2004). L'apoptose est observable chez les macrophages alvéolaires de porcs et se caractérise par des changements morphologiques des cellules, la fragmentation d'ADN et l'activation spécifique de caspases. Les cellules exprimant la protéine GP<sub>5</sub> du virus vont subir l'apoptose (Suarez, *et al.*, 1996). Dans la majorité des cas, le VSRRP va induire l'apoptose des cellules non-infectées entourant les cellules infectées autant *in vitro* qu'*in vivo*. (Suarez, *et al.*, 1996, Sur, *et al.*, 1997, Sirinarumitr, *et al.*, 1998, Choi & Chae, 2002, Kim, *et al.*, 2002, Labarque, *et al.*, 2003, Miller & Fox, 2004). Il se pourrait que le

relâchement par les cellules infectées de TNF- $\alpha$  ou de GP<sub>5</sub> induise l'apoptose des cellules non infectées. Il a été démontré qu'une augmentation de l'expression de FasL dans des macrophages infectés par le VSRRP dans une co-culture avec des lymphocytes spléniques cause l'apoptose de ceux-ci (Chang, *et al.*, 2007). En général, les cellules apoptotiques ont les marqueurs d'apoptose et l'induction se fait via la voie des mitochondries (Lee & Kleiboeker, 2007). Des travaux ont démontré que les marqueurs anti- et pro-apoptotiques sont présents chez les macrophages infectés par le VSRRP (Costers, *et al.*, 2008). À 48 heures post-infection, 40% des macrophages infectés par le virus sont tués (Oleksiewicz & Nielsen, 1999). Différents travaux ont démontré qu'il y avait de l'apoptose lorsque la lignée cellulaire MARC-145 était infectée avec le VSRRP (Suarez, *et al.*, 1996, Costers, *et al.*, 2008).

Au niveau de la lignée cellulaire MARC-145, la nécrose cause plus de mort cellulaire que l'apoptose (Miller & Fox, 2004). À un temps post-infection de 72 heures, sur cette même lignée, les cellules infectées se détachent de la surface de la plaque de culture cellulaire et sont déformées par l'apoptose (Kim, *et al.*, 2002).

### 3.2.5 Morphogenèse

Le virus infecte les cellules de l'hôte via endocytose. Les particules du VSRRP sont contenues dans des puits de clathrine (Kreutz & Ackermann, 1996). Entre 3 à 6 heures post-infection, une vésicule à double membrane est formée (Pol & Wagenaar, 1992). Le virus est assemblé et il entre à l'intérieur de la lumière du réticulum endoplasmique ou de la région du Golgi ou les deux. Les virions s'accumulent dans les vésicules qui se déplacent à la membrane plasmique où ils sont relâchés. La quantité maximale de virus relâché entre 10 et 20 heures post-infection et les titres maximaux en culture cellulaire sont entre  $10^{6,5}$  à  $10^{7,5}$  DICT<sub>50</sub>/ml (dose infectieuse en culture de tissus) (Pedersen, *et al.*, 1999). Par contre, en général, les titres viraux obtenus en culture cellulaire sont de  $10^4$  DICT<sub>50</sub>/ml.

Le contact initial du virus avec le macrophage se fait via l'héparine sulfate GAG (glycosaminoglycan) (Vanderheijden, *et al.*, 2001, Delputte, *et al.*, 2002). Par la suite, le virus s'attache à la sialoadhésine pour une interaction plus stable (Vanderheijden, *et al.*, 2003, Delputte, *et al.*, 2005). Il y a liaison du complexe protéique viral M/GP<sub>5</sub> avec la

partie N-terminale de la sialoadhésine (Van Breedam, *et al.*, 2010). Une fois le virus attaché à la sialoadhésine, il y a endocytose du complexe virus/récepteur par la voie des clathrines (Nauwynck, *et al.*, 1999, Vanderheijden, *et al.*, 2003). Une fois internalisée, le virus libère son génome dans le cytoplasme. Cette dernière étape a lieu quand le virus est à l'intérieur des endosomes et elle est dépendante de l'acidification de ces derniers et de la présence des récepteurs CD163 (Nauwynck, *et al.*, 1999, Calvert, *et al.*, 2007, Van Gorp, *et al.*, 2008, Van Gorp, *et al.*, 2009). Lors du relâchement du génome, il y a peut-être interaction entre le CD163 et les glycoprotéines GP<sub>2</sub> et GP<sub>4</sub> (Das, *et al.*, 2010). De plus, il y a la protéase cathepsine E et une protéase à sérine « trypsine-like » non identifiée qui sont impliquées dans le processus (Misinzo, *et al.*, 2008). C'est la voie principale d'entrée du virus chez les macrophages. Des données suggèrent l'existence d'autres voies indépendantes ou complétant la voie principale de l'endocytose du virus (Van Breedam, *et al.*, 2010).

### 3.3 Réponse immunitaire

#### 3.3.1 Réponse immunitaire innée

Des études ont démontré qu'à sept jours post-infection, il y a une augmentation importante de cytokines inflammatoires et une diminution de l'activité bactéricide non spécifique au niveau du poumon (Zhou, *et al.*, 1992). Par contre, des études plus récentes démontrent que malgré l'induction d'ARNm, le VSRRP n'induit presque pas d'IFN *in vivo* et *in vitro*, en particulier les IFN de type I. Il y aurait aussi peu d'IL-1 et de TNF- $\alpha$  d'induit (Van Reeth, *et al.*, 1999, Thanawongnuwech, *et al.*, 2001, Loving, *et al.*, 2007, Genini, *et al.*, 2008). Cependant, le VSRRP n'induit pas une suppression générale de la transcription des gènes de l'hôte (Lee, *et al.*, 2004). La suppression d'IFN de type I est probablement une étape cruciale de la pathogenèse, car il a été démontré qu'IFN- $\alpha$  inhibe la réplication du VSRRP (Albina, *et al.*, 1998). IFN- $\beta$  protège les macrophages contre la réplication du VSRRP, mais cela ne serait probablement pas suffisant pour induire une réponse immunitaire adaptative (Loving, *et al.*, 2007). L'activation du promoteur d'IFN- $\beta$  est inhibée par nsp1, 2, 4 et 11 (Beura, *et al.*, 2010, Chen, *et al.*, 2010). Plus particulièrement, nsp1 $\alpha$ , nsp1 $\beta$  et nsp11 inhibent fortement la voie de signalisation de l'ARNdb (double brin). La synthèse et la voie de signalisation d'IFN sont inhibées par nsp1 $\beta$ . Il inhibe la translocation du facteur 3 de régulation d'IFN dans le noyau. De plus, cette protéine va

inhiber les gènes d'induction dépendant de NF- $\kappa$ B par l'ARNdb (Beura, *et al.*, 2010). Np1 $\alpha$  inhibe seulement la synthèse d'IFN.

Sept à 11 jours après infection, la population de macrophages alvéolaires dans les lavages pulmonaires décroît de 95 à 50-60%. Vingt-huit jours après infection, la population de macrophages s'est reconstituée (80%) (Molitor, *et al.*, 1992, Zhou, *et al.*, 1992). La capacité des macrophages à produire des anions superoxygénés diminue à 7 jours post-infection mais devient supérieure à la normale à 28 jours post-infection (Molitor, *et al.*, 1992). Chez les jeunes porcelets, il y a une augmentation du taux sérique d'acide glycoprotéique- $\alpha$ -1 (protéine réactive de la phase inflammatoire aiguë). Cette augmentation serait consécutive à la multiplication du VSRRP dans le poumon qui entraînerait une réponse inflammatoire locale (Bane, *et al.*, 1992). Les effets cumulés du VSRRP au niveau des défenses locales non spécifiques du poumon sont de nature à diminuer la résistance infectieuse et à favoriser le développement de surinfections. Toutefois, les résultats obtenus montrent que ces effets sont transitoires (inférieurs à 28 jours post-infection) alors que le virus persiste généralement au-delà.

### 3.3.2 Réponse immunitaire générale

Au niveau systémique, l'infection au VSRRP peut entraîner une diminution transitoire du nombre de globules blancs circulants (Christianson, *et al.*, 1993, Rossow, *et al.*, 1994). Cette diminution modérée est observée entre 3 et 7 jours post-infection. Elle correspond principalement à une baisse du nombre des lymphocytes circulants, CD2<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD2<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> et accessoirement des monocytes (Christianson, *et al.*, 1993, Shimizu, *et al.*, 1994, Thacker & Halbur, 1996). Le ratio des lymphocytes CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> peut soit diminuer (Christianson, *et al.*, 1993, Shimizu, *et al.*, 1996), soit augmenter (Zhou, *et al.*, 1992) selon la sous-population lymphocytaire qui est principalement affectée. Sept à 14 jours après infection, les distributions cellulaires sont redevenues normales. Au-delà, la population CD2<sup>+</sup> augmente, cela correspond à une recrudescence des cellules CD8<sup>+</sup> dont la population atteint un maximum 28 à 35 jours post-infection. Le ratio CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> est alors inférieur au contrôle jusqu'au vingt-huitième jour post-infection. Sur le plan fonctionnel, des tests *in vitro* n'ont pas permis de mettre en évidence un effet du VSRRP sur les lymphocytes (Shimizu, *et al.*, 1996). Autrement dit, l'effet du VSRRP sur les sous-populations

lymphocytaires ferait appel à un mécanisme indirect, indépendant d'une stimulation ou d'une cytotoxicité directe appliquée sur certaines de ces sous-populations. Aucune modification n'a été observée sur les populations cellulaires du thymus, ce qui suggère que le virus ne module pas la différenciation des lymphocytes T (Shimizu, *et al.*, 1996). La prolifération de cellules T dans les porcs infectés avec le VSRRP est dirigée majoritairement contre les protéines M, GP<sub>2</sub> et GP<sub>5</sub> (Bautista, *et al.*, 1999).

La première réponse immunologique est dirigée contre la protéine N (Meulenberg, *et al.*, 1995, Loemba, *et al.*, 1996) et différents épitopes sont reconnus par les anticorps (Rodriguez, *et al.*, 1997, Wootton, *et al.*, 1998). Par contre, la réponse diminue rapidement (Yoon, *et al.*, 1995) et elle ne semble pas avoir de rôle dans la protection du porc. En effet, cette réponse rapide des IgM et IgG ne correspond pas avec celle des anticorps neutralisants (Yoon, *et al.*, 1994). Le développement tôt d'anticorps non neutralisants peut avoir un effet significatif sur le développement du VSRRP. Il a été démontré que les anticorps non-neutralisants potentialisent la réplication du virus à l'intérieur des macrophages (Yoon, *et al.*, 1997). Les anticorps dirigés contre la protéine GP<sub>5</sub> neutralisent le virus *in vitro* (Weiland, *et al.*, 1996). *In vivo*, la majorité des anticorps qui neutralisent le VSRRP chez les porcs infectés sont dirigés contre la protéine GP<sub>5</sub> du virus (Gonin, *et al.*, 1999). La protéine nsp2 contient aussi un domaine de l'épitope d'anticorps neutralisant et qu'elle est probablement une protéine immuno-dominante du VSRRP (Oleksiewicz, *et al.*, 2001, de Lima, *et al.*, 2006). Les anticorps neutralisants sont détectés au jour 21 post-infection ou plus tard pour les deux géotypes (Loemba, *et al.*, 1996). Par contre, après 42 jours post-infection le titre des anticorps neutralisant est bas. Les protéines GP<sub>3</sub>, GP<sub>4</sub> et M contiennent aussi des épitopes neutralisants (Cancel-Tirado, *et al.*, 2004). Ces protéines ont un rôle biologique mineur à comparer à GP<sub>5</sub>. Tout cela montre que la réponse immunitaire humorale agit comme un cheval de Troie pour le VSRRP. La virémie peut se résoudre sans qu'il y ait un niveau détectable d'anticorps neutralisants (Diaz, *et al.*, 2006). La dynamique des macrophages susceptibles au VSRRP gouverne le niveau de virémie. Si le virus échappe à la cytolyse et l'apoptose des macrophages, celui-ci sera confiné dans les organes riches en macrophages (Diaz, *et al.*, 2006). Les anticorps neutralisants bloquent l'infectivité des macrophages *in vitro* (Delputte, *et al.*, 2004). Le transfert d'anticorps neutralisants à des truies en gestation protège ces dernières contre les échecs de reproduction et bloque les

infections transplacentaires. De plus, ils peuvent protéger les porcelets contre le développement de la virémie (Lopez, *et al.*, 2007). Des études ont démontré que des porcs ayant été infectés expérimentalement avec le virus et ayant guéris ont une forte prolifération de lymphocytes après 4 semaines post-infection et cette réponse est parallèle à l'apparition des anticorps neutralisants (Bautista & Molitor, 1997).

Le VSRRP semble influencer la réponse immunitaire innée et spécifique en altérant la production de cytokines chez les macrophages et les cellules dendritiques, en modifiant l'expression de molécules de présentation de l'antigène. Cela a pour conséquence de ralentir l'activation de cellules NK (natural killer) et la mobilisation des cellules responsables de l'immunité acquise. Donc, la production d'anticorps neutralisants le virus, la prolifération des lymphocytes et la production d'IFN- $\gamma$  sont retardées (Butler, *et al.*, 2008, Chang, *et al.*, 2008, Flores-Mendoza, *et al.*, 2008). La réponse initiale de l'immunité innée est faible et cela contribuerait à la survie prolongée du virus chez les porcs infectés. Les particules du VSRRP sont assemblées dans les cellules de l'hôte par bourgeonnement des nucléocapsides dans le lumen du réticulum endoplasmique et/ou le système de Golgi. Les protéines antigéniques du virus sont accumulées et retenues au site de bourgeonnement. Les cellules infectées sont inaccessibles aux anticorps spécifiques du VSRRP, donc réfractaire aux anticorps et au système du complément. Cela empêche la lyse des cellules infectées (Costers, *et al.*, 2006).

### 3.4 Traitements et prévention

Il est possible de stabiliser l'infection dans un troupeau par la vaccination, en exposant volontairement tout le troupeau au VSRRP de manière contrôlée, faire une acclimatation agressive des reproducteurs ou la combinaison de ces stratégies. Il n'existe pas de traitement spécifique. Les antibiotiques à large spectre peuvent être utiles pour contrôler les infections secondaires. Les produits anti-inflammatoires peuvent être administrés durant une infection aiguë (Schwartz, 2004). L'infection des porcs par la souche nord-américaine induit une réponse immunitaire en partie hétérologue; il y a donc une protection partielle envers les souches européennes.

Les premiers vaccins introduits en Europe contenaient une souche nord-américaine atténuée. Le vaccin établissait une virémie chez le porc vacciné et le virus était sécrété dans le sperme ce qui permettait la transmission du virus chez les autres porcs. Le vaccin confère une protection contre les troubles respiratoires. Une nouvelle génération de vaccin atténué a vu le jour et limite la diffusion du virus vaccinal. Il existe présentement plusieurs vaccins atténués ou inactivés des souches américaines ou européennes (Thiry, 2004), mais ils ne sont pas efficaces.

Aux États-Unis, il y a deux vaccins vivants atténués sur le marché (Key, *et al.*, 2003). Le premier est l'Ingelvac PRRS MLV (MLV) qui est un dérivé du virus ATCC VR2332 qui est le virus prototype nord-américain. Ce vaccin réduit la présence du VSRRP, le taux d'échec de reproduction de la truie et diminue les symptômes chez les porcelets (Mengeling, *et al.*, 2003, Dewey, *et al.*, 2004). Le deuxième vaccin est Ingelvac PRRS ATP (ATP). C'est un dérivé atténué de la souche virale JA142 (Key, *et al.*, 2003). Considérant que tous les vaccins commerciaux sont des virus vivants modifiés sans marqueur, il est raisonnable de s'attendre à avoir des isolats qui ont pu dériver de la souche du vaccin, car il est connu que le virus peut se propager chez les porcs non vaccinés et que celui-ci peut muter continuellement durant sa réplication *in vivo* (Thanawongnuwech, *et al.*, 1998). De plus, la possibilité que les souches parentales des vaccins soient en circulation dans la population porcine existe. À présent, il n'y a pas de test qui permet la discrimination du vaccin viral et de la souche sauvage parentale. Les vaccins atténués sont les plus utilisés, car ils ont démontré une meilleure protection que les vaccins inactivés (Murtaugh, *et al.*, 2002, Labarque, *et al.*, 2003). Par contre, ceux-ci ont une efficacité limitée. Ils réduisent l'occurrence de la maladie, la durée de la virémie et l'élimination du virus (Murtaugh, *et al.*, 2002). Il y a quelques vaccins inactivés qui sont utilisés pour réduire les problèmes de reproduction causés par le VSRRP chez les truies (Kimman, *et al.*, 2009).

Il reste beaucoup d'inconnus afin d'obtenir un vaccin efficace et sécuritaire contre toutes les souches du VSRRP. Premièrement, les déterminants antigéniques critiques communs chez les souches nord-américaines et européennes doivent être clairement identifiés pour supporter le développement d'un vaccin universel (Bautista, *et al.*, 1999). Deuxièmement, il faut déterminer les composantes des virions qui sont résistantes ou qui

modulent le système immunitaire de l'hôte. Troisièmement, le vaccin doit être sécuritaire. Les possibilités de réversion de la virulence et la transmission des souches vaccinales entre les porcs doivent être éliminées ou minimales (Zuckermann, *et al.*, 2007). Quatrièmement, l'occurrence de variants naturels avec des petites délétions de *nsp2* (protéine non structurale) indiquent que les protéines non-structurales peuvent être une cible pour élaborer des vaccins différentiels (Fang, *et al.*, 2004).

Il y a plusieurs vaccins en cours de développement qui essaient de répondre aux critères énumérés plus haut. Entre autres, pour améliorer l'efficacité du vaccin commercial Ingelvac PRRS MLV, différents adjuvants ont été expérimentés. Aucun adjuvant testé n'a démontré assez d'efficacité pour diminuer les effets cliniques du virus. (Charerntantanakul, *et al.*, 2006). Des études avec une souche virale n'ayant plus l'ORF2 et l'ORF4 ont également été effectuées. Par contre aucune diminution des signes cliniques et de la pathologie n'ont pu être observée (Calvert, *et al.*, 2003, Welch, *et al.*, 2004). Plusieurs stratégies de virus recombinants ont aussi été expérimentées avec différentes protéines du VSRRP. Des chercheurs ont produit un virus recombinant avec le virus de la pseudo-rage porcine et la protéine GP<sub>5</sub> du VSRRP (Qui, *et al.*, 2005). Une autre équipe a travaillé sur l'immunogénicité des protéines GP<sub>3</sub>, GP<sub>4</sub> et GP<sub>5</sub> en construisant, avec ces protéines des virus recombinants avec un adénovirus non-répliquatif (Kheyar, *et al.*, 2005, Jiang, *et al.*, 2008). Un vaccin a aussi été développé avec un vecteur contenant les formes tronquées des protéines GP<sub>5</sub> et M et a été introduit dans la souche BCG de *Mycobacterium tuberculosis* (Bastos, *et al.*, 2004). Finalement, plusieurs plasmides ont été étudiés pour faire de la vaccination contre le VSRRP. Des expériences ont été faites avec l'introduction de l'ORF1 ou de l'ORF4 ou de l'ORF5 ou de l'ORF7 dans un plasmide (Pirzadeh & Dea, 1998, Barfoed, *et al.*, 2004, Rompato, *et al.*, 2006). Tous ces nouveaux vaccins ne se sont pas montrés plus efficaces contre le VSRRP que ceux commercialisés jusqu'ici.

Des expériences permettant la création de vaccins marqués ont aussi été faites. Ces vaccins permettraient de différencier les porcs ayant développés une réponse immunitaire contre un vaccin du VSRRP versus une infection naturelle du VSRRP. Les auteurs ont utilisé une délétion d'une partie du gène *nsp2* (de Lima, *et al.*, 2008). Cela ne permet pas la détection des porcs qui ont été infectés par la souche sauvage versus le mutant.

#### 4. Infections mixtes impliquant le VSRRP ou *A. pleuropneumoniae*

Van Gucht *et al.* (2004) ont fait des études sur les interactions entre le VSRRP et les LPS *in vivo*. Ils ont utilisé la souche Lelystad du VSRRP et les LPS d'*Escherichia coli* O111:B4. Le virus a été inoculé chez les porcs par la voie intratrachéale. Par la suite, ils ont inoculé les LPS purifiés. Comme contrôle, des porcs furent inoculés uniquement avec le virus ou des LPS. Les porcs exposés seulement au virus ou aux LPS ont eu de la fièvre, mais peu ou pas de symptômes respiratoires. Les porcs ayant reçu une co-inoculation ont eu de graves problèmes respiratoires (tachypnée, respiration abdominale, dyspnée) dans 87% des cas. De plus, ils ont eu une forte fièvre et une dépression. Il y a une augmentation significative de production de cytokines lorsqu'il y a la présence d'une co-stimulation LPS-VSRRP par rapport à une infection avec seulement le VSRRP. Les taux de TNF- $\alpha$ , IL-1 et IL-6 sont 10 à 100 fois supérieurs chez les porcs co-inoculés par rapport à ceux qui ont seulement eu une inoculation au VSRRP ou aux LPS. Donc, la synergie entre les VSRRP et les LPS dans l'induction de cytokines pro-inflammatoires et la surproduction de celles-ci sont associées à la maladie (Van Gucht, *et al.*, 2004).

Thanawongnuwech *et al.* (2001) ont développé un modèle de culture cellulaire pour étudier *in vitro* la production de cytokines pro-inflammatoires lors de co-infection avec le VSRRP et la bactérie *Mycoplasma hyopneumoniae* (Thanawongnuwech, *et al.*, 2001). Ils ont utilisé des anneaux de la trachée et des macrophages alvéolaires pulmonaires (PAM) provenant de 5 porcs. Ils ont quantifié l'expression de l'ARNm par RT-PCR pour les cytokines IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10, IL-12, TNF et la cyclophiline (gène contrôle). Les résultats obtenus montrent que dans les groupes où il y a eu une co-infection, il y a une augmentation de l'expression de l'ARNm pour IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 et TNF. Le ratio de l'expression cytokine/cyclophiline est trois fois plus élevé pour ces cytokines que chez le groupe contrôle. Ces observations ont été faites à un temps post-infection de 24 heures. De plus, ils ont fait des tests ELISA pour les cytokines IL-1 $\beta$ , IL-8 et TNF. Ils ont observé une augmentation importante de production de cytokines IL-8 et IL-10. Finalement, ils ont remarqué que le titre viral était significativement plus petit quand le virus avait été en présence de la bactérie que le virus seul après 24 heures. Par contre, après 48 heures, il n'y

avait plus de différence significative entre les deux groupes (Thanawongnuwech, *et al.*, 2001).

Marois *et al.* (2008) ont observé l'effet d'une co-infection avec les bactéries *A. pleuropneumoniae* de sérotype 9 et *M. hyopneumoniae* chez les porcs au niveau des signes cliniques. Ils ont utilisé une souche peu virulente (*A. pleuropneumoniae* 21) et une autre plus virulente (*A. pleuropneumoniae* 4915). La quantification d'anticorps produits était déterminée hebdomadairement à l'aide de la technique d'ELISA. À la fin de l'expérience, les titres des anticorps contre *A. pleuropneumoniae* ou *M. hyopneumoniae* entre les différents groupes infectés étaient tous similaires. Des écouvillons ont été récupérés et ont été mis en culture pour détecter la présence des bactéries inoculées. Ils ont détecté la présence des bactéries dans chacun des groupes qui ont été infectés. Ils ont fait des observations cliniques sur les porcs tous les jours. Leurs observations ont permis de démontrer que lors d'une infection simultanée avec *M. hyopneumoniae* et *A. pleuropneumoniae* chez des porcs âgés de six semaines, les signes cliniques et les lésions pulmonaires sont sévères et correspondent à la pathogenèse des deux souches bactériennes combinées. La maladie est plus sévère lorsqu'il y a une infection mixte versus une infection simple. De plus, les porcs les plus affectés par la maladie semblent être ceux qui ont été infectés par la bactérie *M. hyopneumoniae* à l'âge de six semaines, suivi d'une infection à *A. pleuropneumoniae* quatre semaines plus tard. En fait, ces porcs ont des signes cliniques très sévères et les lésions pulmonaires correspondent à une double infection (Marois, *et al.*, 2008).

Thacker *et al.* (1999) ont étudié une pré-infection du VSRRP ou de la bactérie *M. hyopneumoniae* lors de co-infections. Ils ont infecté les porcs avec la souche virale ATCC VR-2385 qui est une souche très virulente du VSRRP. Pour quantifier le virus et la bactérie, ils ont utilisé la titration. Il n'y a pas de différence entre le nombre de cellules infectées par le virus et celles infectées par le virus et la bactérie. Aussi, la différence observée entre la moyenne des titres de *M. hyopneumoniae* dans les tissus pulmonaires entre les groupes ayant été co-infectés et les groupes infectés seulement avec la bactérie n'est pas significative. De plus, ils ont suivi les porcs quotidiennement pour évaluer les signes cliniques. Les porcs infectés avec *M. hyopneumoniae* et VSRRP ont des signes

cliniques plus sévères que les groupes infectés seulement avec un des deux pathogènes. Le groupe qui a été infecté avec *M. hyopneumoniae* 21 jours avant d'être infecté avec le VSRRP a développée des maladies respiratoires plus graves à l'intérieur de trois jours post-infection avec le VSRRP que tous les autres groupes infectés par le virus. Les porcs ont été nécropsiés pour évaluer l'état de leurs poumons. Au jour 28, des lésions pulmonaires causées par le VSRRP ont été observées chez tous les porcs infectés par les deux pathogènes. Cette étude a démontré que la bactérie *M. hyopneumoniae* pourrait jouer un rôle dans l'induction d'une pneumonie par le VSRRP. La présence du VSRRP tôt dans une infection avec *M. hyopneumoniae* peut accroître les dommages induits dans les cellules, mais n'augmentent pas le pourcentage de tissus exposés aux pneumonies. L'attraction de cellules inflammatoires par la bactérie *M. hyopneumoniae* pourrait produire un environnement idéal pour que le VSRRP induise une inflammation persistante (Thacker, *et al.*, 1999).

Brockmeier *et al.* (2001) ont voulu déterminer les effets de l'inoculation intranasale avec le VSRRP ou *Bordetella bronchiseptica* avec une infection non-toxique de *Pasteurella multocida* chez les porcs. Pour l'expérience 1, ils ont infecté les porcs avec le VSRRP et la bactérie *P. multocida*. Pour l'expérience 2, ils ont inoculé les porcs avec la bactérie *B. bronchiseptica*, la bactérie *P. multocida* et le VSRRP. Les résultats de l'expérience 1 ont montré que la sévérité des signes cliniques ainsi que les lésions étaient similaires entre les porcs inoculés seulement avec le VSRRP et ceux ayant été préalablement inoculés avec *P. multocida*. Ils ont isolé la bactérie et/ou le virus chez tous les porcs qui ont été inoculés avec ceux-ci. Pour ce qui est de l'expérience 2, les porcs inoculés seulement avec *P. multocida* n'ont eu aucun signe clinique de maladie et la bactérie n'a pas été isolée. Pour ce qui est des porcs ayant été inoculés premièrement avec *B. bronchiseptica*, puis avec la bactérie *P. multocida*, il y a eu plusieurs signes cliniques. De plus, ils ont isolé *B. bronchiseptica* et *P. multocida*. Pour ce qui est des porcs qui ont été inoculés premièrement par le VSRRP et la bactérie *B. bronchiseptica*, puis avec *P. multocida*, ceux-ci ont développé de graves signes cliniques. Les bactéries *B. bronchiseptica*, *P. multocida* et le VSRRP furent isolés chez les porcs infectés avec ceux-ci. En conclusion, une infection primaire avec le VSRRP ne prédispose pas les porcs à une infection avec *P. multocida* et la maladie n'est pas plus sévère quand il y a co-infection par rapport à une infection simple avec le VSRRP. Une inoculation primaire avec *B.*

*bronchiseptica* permet une colonisation nasale et des amygdales avec *P. multocida*. Une inoculation primaire avec *B. bronchiseptica* et le VSRRP permet aussi la colonisation des poumons par *P. multocida* et augmente la gravité de la maladie (Brockmeier, *et al.*, 2001).

## 5. Conclusion

Il existe quelques études portant sur des infections mixtes avec soit *A. pleuropneumoniae* ou le VSRRP en présence d'autres pathogènes. Les expériences ont montré que lorsqu'il y avait co-infection, les signes cliniques ainsi que la réponse immunitaire étaient plus importants que lorsque l'infection était due à un pathogène seulement (Thacker, *et al.*, 1999, Marois, *et al.*, 2008). Par contre, aucune étude n'a été faite en infection mixte entre ces deux pathogènes, malgré qu'ils soient tous les deux impliqués au niveau de la maladie du complexe respiratoire porcin (PRDC). L'objectif du projet est d'évaluer l'effet d'une infection mixte dans la pathogénèse des infections causées par *A. pleuropneumoniae* et le VSRRP *in vitro*. Les cellules utilisées seront les SJPL et les MARC-145 qui sont deux lignées permissives au VSRRP. Au cours de cette étude, la mort cellulaire, la production de cytokines, l'adhérence des bactéries aux cellules, le titre viral du VSRRP, ainsi que la co-localisation du VSRRP par rapport à la bactérie *A. pleuropneumoniae* seront évalués.

# **MÉTHODOLOGIE**

### **Lignées cellulaires**

Le milieu de culture cellulaire pour la lignée MARC -145 (sous-clone de cellules de rein de singe Africain vert MA104) (Kim, *et al.*, 1993) est du MEM (Minimum Essential Medium) (Gibco, NY, États-Unis) contenant 10% sérum foetal de veau (Gibco), 1% HEPES 1M (Gibco), 1% L-glutamine (200 mM) (Gibco), 0,1% pénicilline/streptomycine 100X (Gibco) et 1% fungizone (250µG/ml) (Gibco). Pour la lignée cellulaire SJPL (St-Jude porcine lung, St. Jude Children's Hospital, Memphis, TN) (Seo, *et al.*, 2001, Silversides, *et al.*, 2010) le milieu de culture cellulaire est le DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco) contenant 10% sérum foetal de veau (Gibco), 1% L-glutamine (200 mM) (Gibco), 1% pyruvate de sodium (100X) (Gibco), 1,5% d'acides aminés non-essentiels 100x (Gibco), 1% pénicilline/streptomycine 100X (Gibco), 1% fungizone (Gibco), 0,1% gentamicine 100X (Gibco).

### **Souches bactériennes et virale**

Les souches bactériennes utilisées lors des infections sont *A. pleuropneumoniae* S4074 (K.R. Mittal, Faculté de médecine vétérinaire) et *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC (R.P. Segers, Intervet, The Netherlands). *A. pleuropneumoniae* S4074 est la souche de référence du sérotype 1. *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC est un mutant d'*A. pleuropneumoniae* S4074 produisant les toxines ApxI et ApxII inactives, car les gènes activateurs de ces toxines sont délétés. Les bactéries ont été incubées 16 heures sur gélose BHI (Brain Heart Infusion) (Difco) contenant 15µg/ml de NAD (nicotinamide adénine dinucléotide) à 37°C. Une colonie a été ensemencée dans 5 ml de bouillon BHI contenant 5µg/ml de NAD, incubée sous agitation (120 rpm) à 37°C pendant 16 heures. La culture a été diluée 1:10 dans du bouillon BHI NAD et incubée jusqu'à l'obtention d'une DO de 0,600 à une longueur d'onde de 600 nm qui correspond à une concentration bactérienne de  $1,4 \times 10^9$  bactéries/ml. La souche virale du VSRRP utilisée est IAF-Klop. Celle-ci est une souche de référence Nord-Américaine isolée au Québec à partir de porcelets présentant des signes cliniques (Gagnon, *et al.*, 2003).

### **Titre viral**

Les cellules MARC-145 ont étéensemencées dans une plaque 96 puits (Costar 3595, Corning, NY, États-Unis). Les échantillons ont été infectés avec le VSRRP et ont subi trois cycles de gel à -80°C et de dégel à température pièce. Les échantillons sont récupérés et centrifugés à 4°C à 1200g pendant 10 minutes. Le surnageant a été récupéré. Si les échantillons contenaient des bactéries vivantes, ils devaient être filtrés avec un filtre 0,22 µm. Les échantillons ont été dilués pour avoir des dilutions 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-8</sup> dans du MEM complet sans sérum. Le milieu de la plaque 96 puits contenant les cellules MARC-145 a été enlevé et un volume de 100µl d'échantillon/puits a été ajouté. Pour chaque échantillon un réplica de quatre puits a été fait. La plaque a été incubée 4 heures à 37°C avec 5% CO<sub>2</sub>. Pour chaque puits, le milieu MEM complet sans sérum a été enlevé et 150 µl/puits de milieu MEM complet avec sérum a été ajouté. Puis, la plaque a été incubée pendant 96 heures à 37°C avec 5% CO<sub>2</sub>. Après l'incubation, la plaque a été observée au microscope pour que l'effet cytopathique du virus soit noté afin de pouvoir calculer le titre viral avec la méthode de Kärber (Payment & Trudel, 1989). La formule est  $DICT_{50} = \Delta + \delta (S-0,5)$  où  $\Delta$  est le log<sub>10</sub> de la dilution montrant 100% de dégénérescence,  $\delta$  est le log<sub>10</sub> du facteur de dilution et S est la somme des puits dégénérés, incluant ceux de la dilution où il y a 100% de dégénérescence. La dilution ayant 100% de dégénérescence a pour valeur l'unité, et chaque autre dilution une fraction de l'unité.

### **Bactéries inactivées**

Pour produire des bactéries inactivées par ultraviolet (UV), les bactéries ont étéensemencées tel que décrit plus haut. La culture bactérienne a été transférée dans des tubes de centrifugation stériles de 15 ml et a été centrifugée à 1200g pendant 15 minutes. Le surnageant a été retiré et le culot bactérien a été resuspendu dans 5 ml de PBS stérile. Les cellules bactériennes ont été placées dans un pétri de 60 mm stérile et incubées 60 minutes sous lumière UV (315 nm). Elles ont été par la suite récupérées et 100 µl a étéensemencé sur gélose BHI contenant du NAD. Les géloses ont été incubées à 37°C pendant une nuit pour s'assurer qu'il n'y avait pas de croissance bactérienne. Les échantillons ont été conservés à -20°C.

### **Surnageant bactérien**

Pour produire le surnageant bactérien, la souche *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ *apxIC* $\Delta$ *apxIIC*, a étéensemencée tel que décrit plus haut (voir paragraphe souches bactériennes et virales). Le milieu DMEM ou MEM complet avec sérum contenant une concentration de 5 $\mu$ g/ml de NAD a étéensemencé avec 1 x 10<sup>6</sup> bactéries/ml. Les milieux ont été incubés dans des plaques 6 puits à 37°C avec 5% CO<sub>2</sub> durant 16 heures. Les échantillons ont été récupérés, centrifugés 15 minutes à 1200g, puis filtrés avec un filtre de 0,22 $\mu$ m.

### **Surnageant bactérien fractionné**

Le surnageant a été centrifugé dans des tubes contenant un filtre de 5 kDa (Amicon Ultra-15, Millipore, MA, États-Unis) et centrifugé 25 minutes à 1200g. La fraction contenant les molécules de plus de 5 kDa a été récupérée et le volume a été ajusté avec le milieu de culture cellulaire complet pour avoir le même volume de surnageant qu'au départ, c'est-à-dire avant la centrifugation. Le volume du filtrat a aussi été ajusté au volume du départ.

### **Surnageant bactérien inactivé**

L'inactivation du surnageant a été fait en l'incubant à 56°C pendant 30 minutes ou en le mettant dans un autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

### **Pré-infection virale suivie d'une infection bactérienne**

Les lignées cellulaires ont étéensemencées dans une plaque (voir Tableau III) et incubées à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durant 24 heures.

Tableau III : Type de plaques utilisées lors des infections avec le VSRRP et la bactérie *A. pleuropneumoniae*.

Type de plaque	Modèle de plaque	Nombre de cellules ensemencées par puits	Volume de milieu lors de l'infection virale	Volume de milieu lors de l'infection bactérienne
6 puits	Costar 3516, Corning	$5 \times 10^5$	2 ml	5 ml
24 puits	Fond plat, Sarstedt	$1 \times 10^5$	300 $\mu$ l	1 ml
96 puits	Costar 3595, Corning	$1 \times 10^4$	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l

Pour l'infection avec le VSRRP, le milieu complet avec sérum est enlevé et il y a eu infection avec le virus dans du milieu complet sans sérum. L'infection a été faite à une MOI (multiplicity of infection) de 0,5 VSRRP pour une cellule. La plaque a été incubée pendant 4 heures à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Une fois l'adsorption du virus faite, le milieu complet sans sérum a été enlevé et remplacé par du milieu complet avec sérum. Selon l'expérience réalisée, la plaque a été incubée de 24 à 96 heures à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> (voir Figure 7). Une fois le temps d'incubation terminée, le milieu a été retiré des puits et il a été remplacé par du milieu complet avec sérum contenant *A. pleuropneumoniae*. L'infection a été faite avec une MOI bactérienne de 10:1. Selon l'expérience et la souche bactérienne utilisée, la plaque a été incubée d'une à six heures ou 24 heures à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

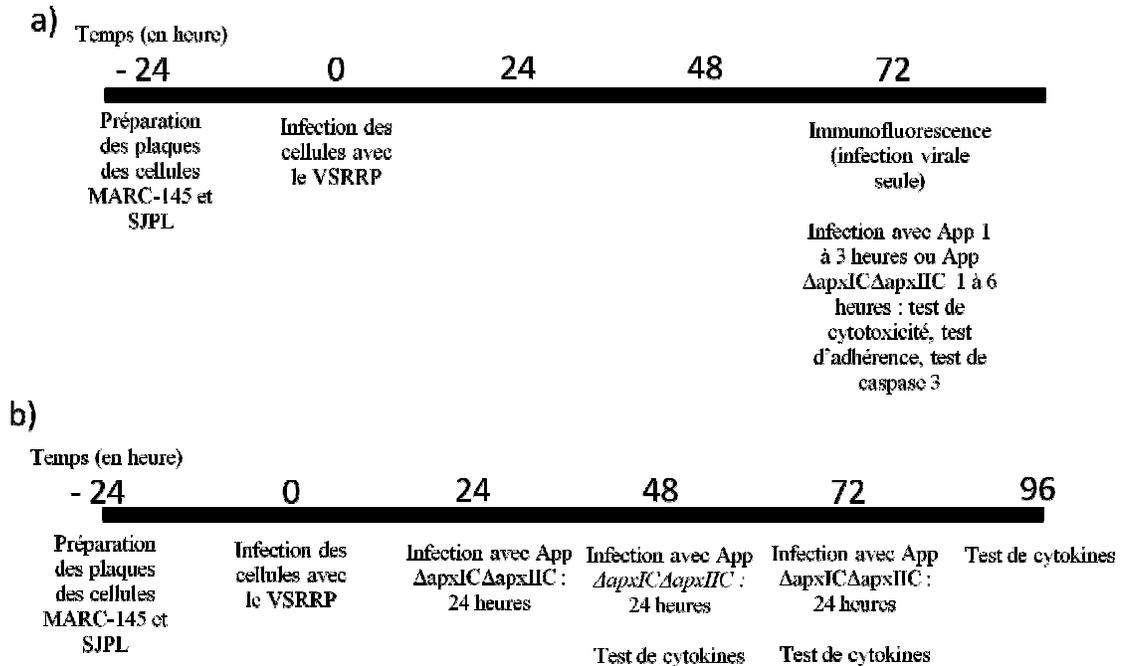


Figure 7 : Protocole pour les pré-infections avec VSRRP, suivit d'une infection avec *A. pleuropneumoniae*. a) test de cytotoxicité, test d'adhérence et test de caspase 3; b) test de cytokines

### Pré-infection bactérienne (bactéries vivantes, surnageant bactérien ou bactéries inactivées) suivie d'une infection virale

Les cellules ont étéensemencées dans une plaque et incubée à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durant 24 heures. Pour l'infection avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC, le milieu complet avec sérum a été enlevé et remplacé par la bactérie ou un surnageant bactérien dans du milieu complet avec sérum. La plaque a été incubée pendant 3 heures à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Lors d'une stimulation avec les bactéries inactivées les cellules ont été incubées avec une MOI 100:1 pendant 24 heures à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Une fois le temps d'incubation écoulé, le milieu a été enlevé et il y a une infection faite avec le VSRRP dans du milieu complet sans sérum à une MOI de 0,5. La plaque a été incubée pendant 4 heures à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Une fois l'adsorption du virus faite, le milieu complet sans sérum a été enlevé et remplacé par du milieu complet avec sérum. Selon l'expérience réalisée, la plaque a été incubée de 24 heures à 96 heures à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> (voir Figure 8).

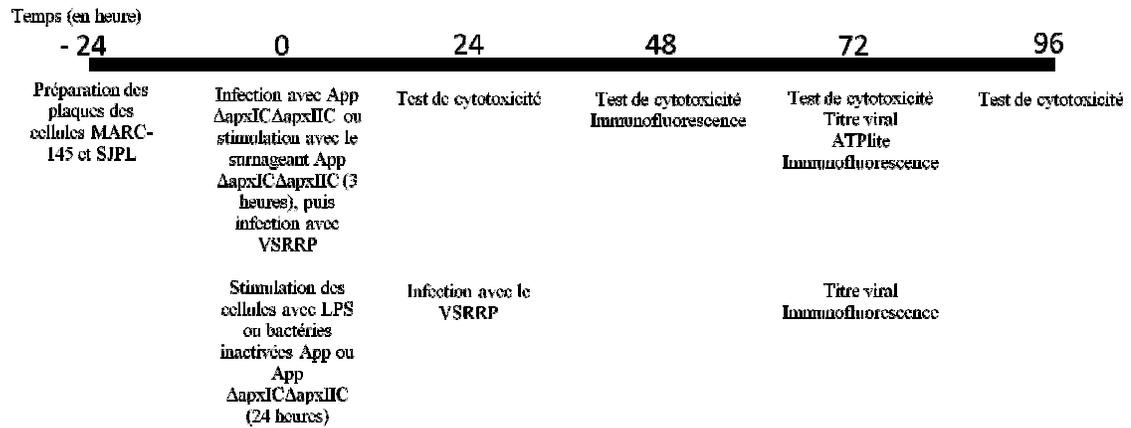


Figure 8 : Protocole pour la pré-infection bactérienne (bactéries vivantes, le surnageant bactérien ou des bactéries inactivées), suivie d'une infection avec le VSRRP.

### Immunofluorescence

Une fois le temps d'infection du VSRRP atteint (24h à 96h), le milieu de culture a été enlevé des puits de la plaque. Les puits ont été lavés avec du PBS 1X trois fois. La fixation des cellules a été faite en mettant 400  $\mu$ l de paraformaldéhyde 4% par puits (plaque 24 puits) et la plaque a été incubée pendant 20 minutes à température pièce. Puis, les puits ont été lavés avec du PBS 1X trois fois. Les cellules ont été perméabilisées avec une solution de PBS contenant 0,1% de Triton X-100 (Sigma) pendant 10 minutes. Les cellules ont été lavées avec la solution de blocage (PBS avec 1% sérum foetal de veau (Gibco) et 0,02% de Tween 20 (Sigma)). Les sites non spécifiques ont été bloqués avec cette même solution pendant 20 minutes. L'anticorps anti-VSRRP ( $\alpha$ 7 : sérum de lapin contre la protéine N du virus) (Gagnon, *et al.*, 2003) a été dilué 1:100 dans la solution de blocage et mis en contact avec les cellules pendant 90 minutes sur une plaque agitatrice à 37°C ou température pièce. Puis, les cellules ont été lavées trois fois avec la solution de blocage. Les cellules ont été incubées 60 minutes, à 37°C ou température pièce avec un anticorps anti-IgG lapin conjugué au FITC (Sigma, dilution 1:160). Puis, elles ont été lavées trois fois avec la solution de blocage. Les cellules ont été observées à l'aide d'un microscope inversé à fluorescence LEICA DMI4000B. Les photos ont été prises via la caméra LEICA BFC490 et traitées avec le logiciel Leica Application suite 2.4.0 R1 (Leica microsystems, Richmond Hill, Ontario, Canada).

## Cytotoxicité

Pour ce test, la trousse CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, Madison, WI, États-Unis) a été utilisée. Celle-ci mesure le taux du lactate déshydrogénase (LDH) libéré par les cellules lors de la mort cellulaire. Pour faire ce test, 50 µl du surnageant des échantillons a été mis dans une plaque 96 puits Maxisorp (Nalge Nunc International, New York, USA), puis, 50 µl du réactif de la trousse a été mis dans chaque puits. La plaque a été incubée pendant 30 minutes à la noirceur, à température pièce. Cinquante µl de la solution stop de la trousse a été ajoutée à chaque puits. La plaque a été lue au spectrophotomètre à une absorbance de 490 nm. Les cellules d'un puits n'ayant pas été infectées ont été lysées à l'aide de la solution de lyse fournie par le fabricant et ont été considérées comme 100% de mort cellulaire. Les témoins sont les milieux de culture cellulaire (Auger, *et al.*, 2009).

## Détection de la caspase 3

Les cellules contenues dans une plaque six puits ont été infectées avec VSRRP et *A. pleuropneumoniae* ou *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ *apxIC* $\Delta$ *apxIIC*. Le contrôle positif consistait à l'induction de l'apoptose des cellules à l'aide d'agents apoptotiques (500 ng/ml d'actinomycine D, 50 µg/ml de vinblastine sulfate, 100 µg/ml de cycloheximide et 40 µg/ml de puromycine 2 HCl). Les cellules du contrôle positif ont été incubées pendant 24 heures à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Une fois l'incubation terminée, les échantillons ont été récupérés en grattant le fond des puits. Ils ont été centrifugés pendant 15 minutes à 1200g. Les cellules ont été lavées avec 1 ml de PBS et centrifugées pendant 15 minutes à 1200g. Le culot a été resuspendu dans 200 µl de tampon de lyse froid (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0,1% CHAPS, 1 mM DTT, 100 mM EDTA, à un pH de 7,4) et incubé sur glace pendant 5 minutes. Puis, la sonication des cellules a été faite pendant 10 secondes avec pulsation à la puissance minimale (Sonifier 450, Branson). Les échantillons sont centrifugés pendant 15 minutes à 1200g. Le surnageant a été conservé. Pour calculer la concentration de protéines dans les échantillons, le test de Bradford a été utilisé (Quick Strat Bradford Protein assay, Biorad). Les concentrations d'albumine de sérum bovin (BSA) pour la courbe standard variaient de 0 à 1500 µg/ml. Pour quantifier la caspase 3 dans des puits d'une plaque 96 puits, il fallait avoir 50 µg de protéines pour chaque échantillon. Pour ajuster la quantité de

protéine, il fallait les diluer dans un tampon de réaction (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0,1% CHAPS, 1 mM DTT, 100 mM EDTA et 10% glycérol à un pH de 7,4). Dix  $\mu\text{l}$  du substrat de la caspase 3 (Ac-DEVD-AFC, Biomol international) d'une concentration de 2 mM a été ajouté à tous les puits. Pour le témoin, 90  $\mu\text{l}$  de tampon avec 10  $\mu\text{l}$  de substrat a été utilisé. La plaque a dû être agitée et la fluorescence a été mesurée dans un lecteur de plaque détectant la fluorescence (excitation 400 nm, émission, 500 nm, Synergy HT, Biotek, Vermont, USA) après 40 minutes d'incubation.

### **Test d'adhérence**

Une fois les cellules infectées avec le VSRRP et *A. pleuropneumoniae* et incubées le temps voulu, les cellules ont été lavées avec du PBS 1X trois fois. Puis, elles ont été décollées avec 100  $\mu\text{l}$  solution de 0,05% trypsine-EDTA. Il n'était pas nécessaire de lyser les cellules, car c'était un test d'adhérence et non un test d'invasion. Des dilutions de  $10^{-1}$  à  $10^{-3}$  ont été faites dans du PBS 1X. Cent  $\mu\text{l}$  de chacune des dilutions a été ensemencés sur des géloses BHI contenant 15 $\mu\text{g/ml}$  NAD. Pour déterminer le nombre d'UFC (unité formatrice de colonie), les géloses contenant entre 30 et 300 colonies ont été considérées (Auger, *et al.*, 2009).

### **Production de cytokines**

Dans la plaque 96 puits MaxiSorp (Nalge Nunc International, New York, USA), 100  $\mu\text{l}$  par puits d'anticorps a été utilisé. Les types d'anticorps et les concentrations à utiliser selon les cytokines testées sont décrits dans le Tableau IV. Les anticorps ont été dilués dans du PBS 0,02M. La plaque a été incubée pendant 16 heures à 4°C. Puis, elle a été lavée avec du PBS-Tween (21,5% PBS 0,02M, 0,05% Tween 20 et 0,15M NaCl) trois fois et asséchée. Pour bloquer les sites non spécifiques, 300  $\mu\text{l}$  par puits de solution PBS contenant 1% d'albumine de sérum bovin (BSA) et 5% de sucrose ont été ajoutés pendant une heure à température pièce. La plaque a été rincée avec du PBS-Tween trois fois et asséchée. Cent  $\mu\text{l}$  du surnageant des échantillons ont été mis dans chaque puits de la plaque en duplicata. La courbe standard a été faite à l'aide de la protéine standard. Les protéines de la courbe standard ont été diluées dans du TBS (Tris : 12 %, NaCl : 0,15M) contenant 0,1% BSA et 0,05% Tween-20. Chaque cytokine avait sa protéine standard et ses concentrations (voir

Tableau IV). La plaque a été incubée pendant deux heures à température pièce, puis lavée avec la solution de PBS-Tween. Dans chaque puits 100 µl d'anticorps conjugué à la biotine dilué dans une solution de TBS a été ajouté (voir tableau IV). La plaque a été incubée pendant deux heures à température pièce. Les puits ont été rincés avec du PBS-Tween trois fois et asséchés. Dans les puits, 100 µl de peroxydase conjuguée à la streptavidine (Jackson ImmunoResearch Laboratories) (voir tableau IV) a été ajouté. La plaque a été incubée pendant 1 heure à température pièce. Puis, les puits ont été lavés trois fois avec du PBS-Tween et bien asséchés. Il était important de bien assécher la plaque entre chaque étape, car si cette étape n'est pas faite il peut y avoir des variations non voulues des résultats. La révélation a été faite en ajoutant 100 µl par puits de TMB (Tetramethyl benzidine) Single Solution (Invitrogen). Finalement, lors de l'apparition d'une coloration bleue, la réaction a été arrêtée ajoutant 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> par puits. Pour quantifier la concentration de cytokines des échantillons, la plaque a été lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450 nm. Pour le témoin, l'anticorps a été incubé toute la nuit, puis, du PBS ou TBS a été ajouté pour les autres incubations. Pour s'assurer que le TBS n'interfèrerait pas avec la peroxydase conjuguée à la streptavidine, un puits où, il n'y a pas d'échantillon, ni de standard, ni l'anticorps conjugué à la biotine, mais contenant de la peroxydase conjuguée à la streptavidine mise lors de la dernière étape d'incubation a été ajouté.

Tableau IV : Informations sur les anticorps utilisés pour la détection des différentes cytokines quantifiées lors d'infection mixte avec le VSRRP et *A. pleuropneumoniae*.

<b>Cytokines</b>	<b>Ac (en µg/ml)</b>	<b>Ac conjugué à la biotine (en ng/ml)</b>	<b>Standards (en pg/ml)</b>	<b>Concentration peroxydase conjugué à la streptavidine</b>	<b>Spécification</b>
<b>TNF-α</b>	Anti-porcine monoclonal TNF-α (2)	Anti-porcine TNF-α (100)	TNF-α porcine (5000 à 78)	2 µg/ml	Incuber l'ac conjugué à la biotine dans du PBS contenant 2% de sérum de chèvre
<b>IL-6</b>	Anti-porcine polyclonal IL-6 (0,8)	Anti-porcine IL-6 (50)	IL-6 porcine (5000 à 78)	2 µg/ml	Aucune spécification
<b>IL-8</b>	Anti- humain monoclonal IL-8 (2)	Anti-porcine IL-8 (50)	IL-8 porcine (600 à 18,75)	2 µg/ml	Incuber l'ac conjugué à la biotine dans du PBS contenant 2% de sérum de chèvre
<b>IL-10</b>	Anti-porcine IL-10 (2)	Anti-porcine IL-10 (50)	IL-10 porcine (4000 à 31,25)	1 µg/ml	Incuber l'ac conjugué à la biotine dans du PBS contenant 2% de sérum de chèvre
<b>IFN-γ</b>	Anti-porcine IFN-γ (1,25)	Anti-porcine IFN-γ (5)	IFN-γ porcine (1000 à 31,25)	0,2 µg/ml	Incuber l'ac conjugué à la biotine dans du PBS contenant 2% de sérum de veau

Les anticorps proviennent de R&D Systems, Minneapolis, USA.

### **Quantification de l'ATP lors de stimulation des cellules avec le surnageant bactérien et le VSRRP pour évaluer le métabolisme cellulaire**

Les cellules ont été infectées dans un plaque 96 puits noirs Costar (Corning Inc., NY, États-Unis). Cette expérience a été faite avec la trousse ATPlite (PerkinElmer<sup>TM</sup>, Boston, MA, États-Unis). Cette trousse permet d'obtenir la concentration d'ATP présent dans les cellules vivantes, donc, de mesurer l'activité métabolique des cellules. Le protocole consistait à mettre 50 µl de la solution de lyse par puits, puis à agiter la plaque pendant cinq

minutes. Par la suite, 50  $\mu$ l par puits de substrat a été ajouté, la plaque a été agitée pendant cinq minutes puis, incubée à la noirceur pendant 10 minutes. La plaque a été lue à l'aide d'un spectrophotomètre ayant un filtre permettant de détecter la luminescence (Synergy HT, Biotek, Vermont, États-Unis). Une courbe standard a été faite à l'aide d'un standard d'ATP. Celui-ci a été dilué dans de l'eau stérile et les concentrations utilisées ont été de  $10^{-3}$  à  $10^{-10}$  M. Dix  $\mu$ l/puits des dilutions d'ATP a été mis dans des puits contenant 100  $\mu$ l de milieu complet DMEM ou MEM avec sérum. Le tout est incubé 5 minutes sous agitation. Le contrôle négatif consistait à des puits contenant du milieu DMEM ou MEM complet avec sérum ayant subi le même traitement que les échantillons.

### **Analyses statistiques**

Les tests statistiques ont été faits avec le logiciel GraphPad Prism version 4.02 (San Diego, CA, États-Unis). Les différences étaient statistiquement valables lorsque la valeur P était inférieure à 0,05. Les tests utilisés dépendent des expériences faites. Le test statistique two-way ANOVA fut utilisé pour l'analyse des données de cytotoxicité, de production de cytokines et d'adhérence de la bactérie. Le test statistique one-way ANOVA fut utilisé pour l'analyse des données de caspase 3. Le test de t-student utilisé pour l'analyse des données de titres viraux et d'ATP était non-paramétrique.

## **RÉSULTATS**

### Permissivité des lignées cellulaires au VSRRP

Nous avons confirmé la permissivité de la lignée MARC-145 pour le VSRRP et mis en évidence pour la première fois la permissivité de la lignée SJPL pour le VSRRP. Grâce à l'immunofluorescence, il est possible de détecter la protéine N du VSRRP qui se retrouve dans le cytoplasme des cellules de la lignée MARC-145 (Figure 9, d) et de la lignée SJPL (Figure 9, b). Les cellules qui ne sont pas infectées ne montrent aucune protéine du virus dans leur cytoplasme (Figure 9, a et c). Le temps d'infection avec le VSRRP montré à la figure 9 est de 72 heures. Cela est aussi observable avec des infections avec le VSRRP allant de 24 heures à 96 heures. (Annexe I)

Des expériences de co-localisation avec *A. pleuropneumoniae* et le VSRRP ont été effectuées. Des expériences avec des anticorps anti-*A. pleuropneumoniae* et anti-VSRRP ont été réalisées. Nous avons observé des problèmes de réactions croisées avec les anticorps secondaires couplés à des molécules fluorescentes. Nous avons aussi essayé d'incuber *A. pleuropneumoniae* avec du FITC (isothiocyanate de fluorescéine). Le signal n'était pas suffisant pour pouvoir observer les bactéries au microscope. La dernière option qui a été évaluée a été d'insérer la GFP (green fluorescent protein) ou la mCherry dans la bactérie. Dans le premier cas, la GFP n'était pas assez exprimée pour émettre assez de fluorescence pour que la bactérie soit aisément détectable. Pour ce qui est de mCherry, la bactérie perdait le plasmide facilement, donc, il y avait rarement production de fluorescence. En conclusion, au cours de ce projet, il n'a pas été possible de prendre des images montrant clairement la localisation d'*A. pleuropneumoniae* lorsqu'il y avait une co-infection avec le VSRRP.

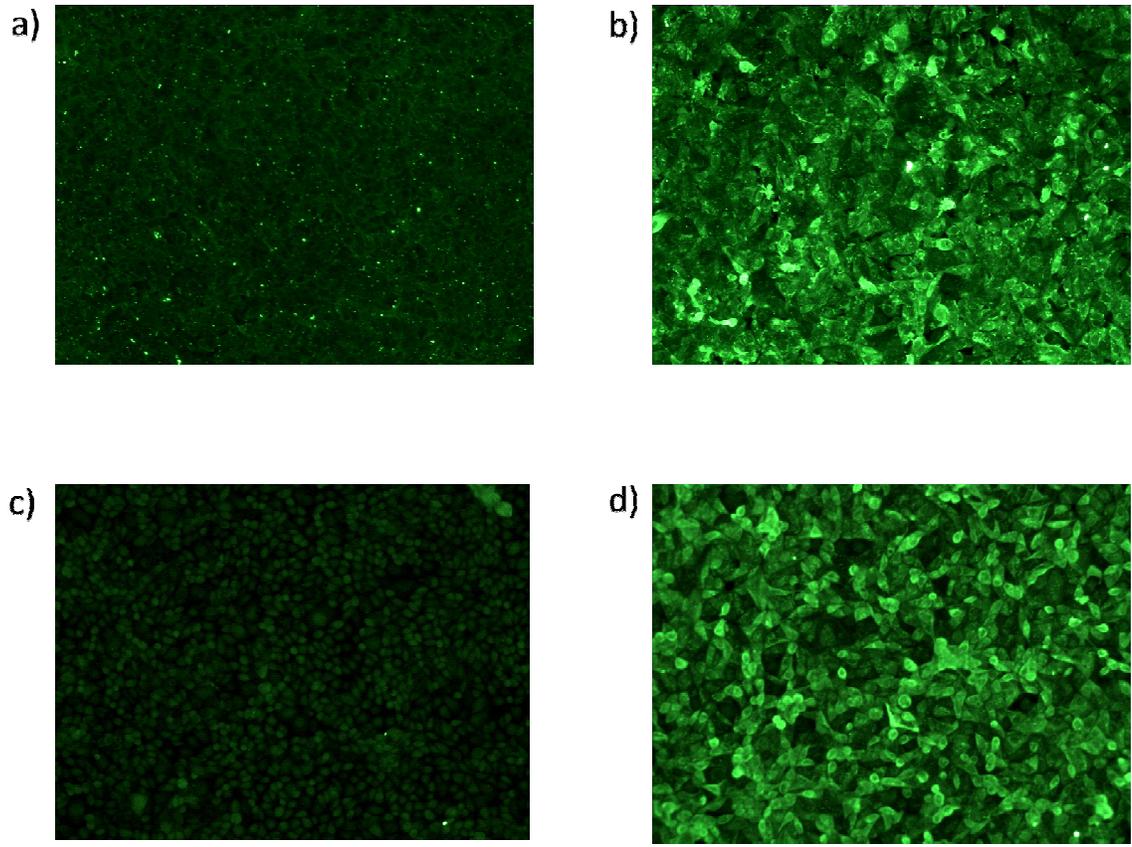


Figure 9 : Images des cellules infectées avec le VSRRP pendant 72 heures (MOI de 0,5). a) lignée cellulaire SJPL non-infectée; b) lignée cellulaire SJPL infectée avec le VSRRP; c) lignée cellulaire MARC-145 non-infectée; d) lignée cellulaire MARC-145 infectée avec le VSRRP. Grossissement : 100 X

### Test de cytotoxicité réalisé sur les cellules pré-infectées avec le VSRRP, puis infectées avec *A. pleuropneumoniae*

Lorsque les cellules de la lignée SJPL sont incubées pendant 72 heures, le taux de cytotoxicité est inférieur à 15% (entre 3 et 14%) (Figure 10.1). Lorsque les cellules sont infectées avec le VSRRP, le taux de LDH libéré après 72 heures d'infection est d'environ 35% (30 et 40%) (Figure 10.1). Le taux de mortalité augmente de manière significative lorsque les cellules sont infectées avec le VSRRP ( $P < 0,05$ ). Quand il y a infection avec *A. pleuropneumoniae* seul, le taux est d'environ 15% après une heure d'infection et augmente à 36% après deux heures d'infection (Figure 10.1, a). Le taux de mortalité avec *A. pleuropneumoniae* est significativement plus élevé que le contrôle, lorsque la bactérie est incubée pendant deux heures avec les cellules ( $P < 0,05$ ). Avec le mutant (*A. pleuropneumoniae*  $\Delta apxIC\Delta apxIIC$ ) ne produisant pas de toxines ApxI et ApxII actives, le taux de cytotoxicité reste inférieur à 15% (entre 3 et 13%) et cela, même après un temps d'infection de 6 heures (Figure 10.1, b). Lorsqu'il y a co-infection avec le VSRRP et *A. pleuropneumoniae* (bactérie sauvage), le taux de cytotoxicité est de 41% après une heure d'infection et ce taux augmente à 64% après deux heures d'infection (Figure 10.1, a). Donc, lorsqu'il y a co-infection avec le VSRRP et *A. pleuropneumoniae* le taux de cytotoxicité augmente de manière significative à un temps d'incubation de 72 heures avec le VSRRP et de deux heures avec la bactérie sauvage versus une infection simple avec les deux mêmes pathogènes ( $P < 0,05$ ). Cela n'est pas observé lors d'un temps d'infection d'une heure avec la bactérie, car le taux de cytotoxicité d'une co-infection est semblable au taux de cytotoxicité lorsque les cellules sont infectées seulement avec le VSRRP. Lorsqu'il y a co-infection avec le VSRRP et le mutant bactérien ne produisant pas les toxines actives, le taux de cytotoxicité varie de 46% à 65% pour les différents temps d'incubation d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta apxIC\Delta apxIIC$  (Figure 10.1, b). Il n'y a pas d'augmentation significative du taux de cytotoxicité lors de co-infection si elle est comparée au taux de cytotoxicité des cellules infectées seulement avec le VSRRP ( $P > 0,05$ ), mais il y a une différence significative lorsque les résultats de la co-infection sont comparés avec ceux d'une infection avec seulement *A. pleuropneumoniae*  $\Delta apxIC\Delta apxIIC$  ( $P < 0,05$ ) (temps post-infection de 5 heures et 6 heures).

Lorsque les cellules de la lignée MARC-145 sont incubées pendant 72 heures, le taux de cytotoxicité est inférieur à 10% (entre 0,4 et 6%) (Figure 10.2). Lorsque les cellules sont infectées avec le VSRRP, le taux de LDH libéré après 72 heures d'infection est inférieur à 20% (entre 7 et 20%) (Figure 10.2). Le taux de mortalité augmente de manière significative lorsque les cellules sont infectées avec le VSRRP ( $P < 0,05$ ). Les cellules infectées avec seulement *A. pleuropneumoniae* (4%) ou *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC (entre 5 et 7%) ont un taux de mort cellulaire inférieur à 10% (Figure 10.2 a et b). Lorsqu'il y a co-infection avec le VSRRP et *A. pleuropneumoniae*, le taux de cytotoxicité est de 9% lorsqu'il y a incubation d'une heure avec la bactérie et cela augmente à 53% lorsque la bactérie est présente pendant deux heures (Figure 10.2, a). Donc, lors d'une co-infection avec le VSRRP et *A. pleuropneumoniae* le taux de cytotoxicité augmente de manière significative lorsqu'il y a un temps d'incubation de 72 heures avec le VSRRP et de deux heures avec la bactérie sauvage versus une infection simple avec les deux mêmes pathogènes ( $P < 0,05$ ). Cela n'est pas observé lors d'un temps d'infection d'une heure avec la bactérie, car le taux de cytotoxicité d'une co-infection est semblable aux taux de cytotoxicité lorsque les cellules sont infectées seulement avec le VSRRP ou la bactérie. Lorsqu'il y a co-infection avec le VSRRP et le mutant bactérien ne produisant pas les toxines actives, le taux de cytotoxicité varie de 16% à 36% pour les différents temps d'incubation d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC (Figure 10.2, b). L'augmentation du taux de cytotoxicité lors de co-infection n'est pas différente si elle est comparée aux taux de cytotoxicité des cellules infectées seulement avec le VSRRP, mais il y a une différence significative lorsque les résultats de la co-infection sont comparés avec ceux d'une infection avec seulement *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC ( $P < 0,05$ ).

Nous avons aussi fait des tests de cytotoxicité avec *A. pleuropneumoniae* et le VSRRP à des temps d'infection avec le virus de 24 heures, 48 heures et 96 heures (voir Annexe II). Les résultats obtenus équivalent à ce qui a été observé à 72 heures post-infection VSRRP. Il est donc possible d'observer une augmentation de la cytotoxicité lors d'une co-infection *A. pleuropneumoniae*-VSRRP.

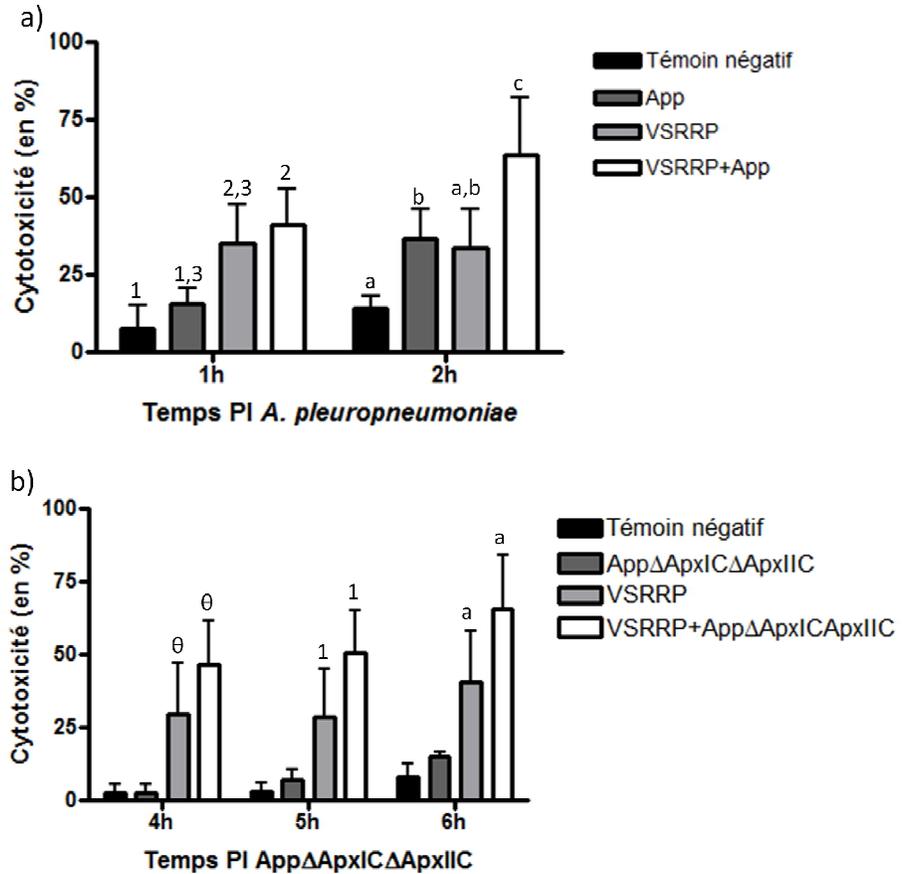


Figure 10.1 : Test de cytotoxicité avec le surnageant de la lignée cellulaire SJPL infectées avec le VSRRP pendant 72 heures et la bactérie *A. pleuropneumoniae* ou *A. pleuropneumoniae ΔapxICΔapxIIC*. a) cellules infectées avec *A. pleuropneumoniae* pendant 1 heure et 2 heures; b) cellules infectées avec *A. pleuropneumoniae ΔapxICΔapxIIC* pendant 4 à 6 heures. Test statistique : Two-way ANOVA,  $P < 0,05$ . Un sigle, une lettre ou un chiffre identique entre deux groupes indique qu'il n'y a pas de différence significative entre ceux-ci. Par exemple, à la figure a) le chiffre « 1 » sur la colonne contrôle et la colonne App indique qu'il n'y a pas de différence significative entre ces deux groupes. Le témoin négatif correspond à l'incubation de la lignée cellulaire SJPL seule. Trois expériences indépendantes ont été réalisées en duplicata.

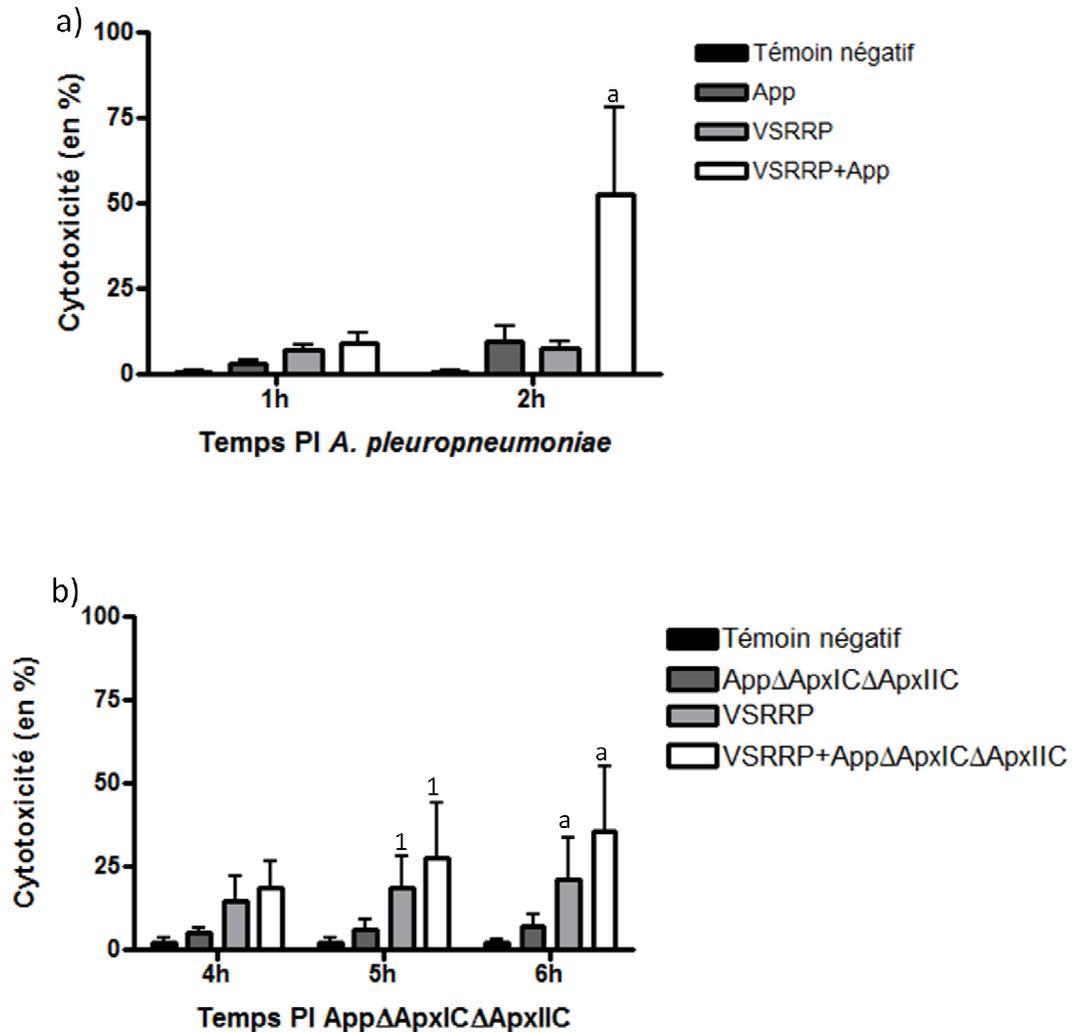


Figure 10.2 : Test de cytotoxicité avec le surnageant de la lignée cellulaire MARC-145 infectées avec le VSRRP pendant 72 heures et la bactérie *A. pleuropneumoniae* ou *A. pleuropneumoniae ΔapxICΔapxIIC*. a) cellules infectées avec *A. pleuropneumoniae* pendant 1 heure et 2 heures; b) cellules infectées avec *A. pleuropneumoniae ΔapxICΔapxIIC* pendant 4 à 6 heures. Une lettre ou un chiffre identique entre deux groupes indique qu'il n'y a pas de différence significative entre ceux-ci. Par exemple, à la figure b) le chiffre « 1 » sur la colonne VSRRP et la colonne VSRRP + AppΔapxICΔapxIIC indique qu'il n'y a pas de différence significative entre ces deux groupes. Le témoin négatif correspond à l'incubation de la lignée cellulaire MARC-145 seule. Test statistique : Two-way ANOVA,  $P < 0,05$ . Trois expériences indépendantes ont été réalisées en duplicata.

**Test de caspase 3 lorsque la lignée cellulaire SJPL est infectée avec VSRRP et *A. pleuropneumoniae* ou *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC**

Les cellules SJPL incubées pendant 72 heures libèrent un taux d'environ 3 UF/sec\* $\mu$ g (unité de fluorescence) de caspase 3 (Figure 11, a et b). L'induction de l'apoptose des cellules résulte en un taux moyen de 23 UF/sec\* $\mu$ g (Figure 11, a et b). Les cellules infectées avec *A. pleuropneumoniae* produisent peu de caspase 3 (environ 1 UF/sec\* $\mu$ g) (Figure 11, a). Cela est aussi vrai pour les cellules infectées avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC (entre 2 et 4 UF/sec\* $\mu$ g) (Figure 11, b). Le taux d'apoptose augmente lorsque les cellules sont infectées avec le VSRRP (environ 17 UF/sec\* $\mu$ g) (Figure 11, a et b). Lorsqu'il y a co-infection avec *A. pleuropneumoniae*, il n'y a pas de variation du taux de caspase 3 par rapport aux cellules infectées seulement avec le VSRRP (Figure 11, a). Lorsque les cellules sont infectées avec VSRRP et *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC le taux de caspase 3 varie par rapport à celui produit par les cellules infectées seulement avec VSRRP, mais cette variation n'est pas statistiquement significative selon le test statistique fait (Figure 11, b). Il semble que seul le VSRRP puisse induire l'apoptose.

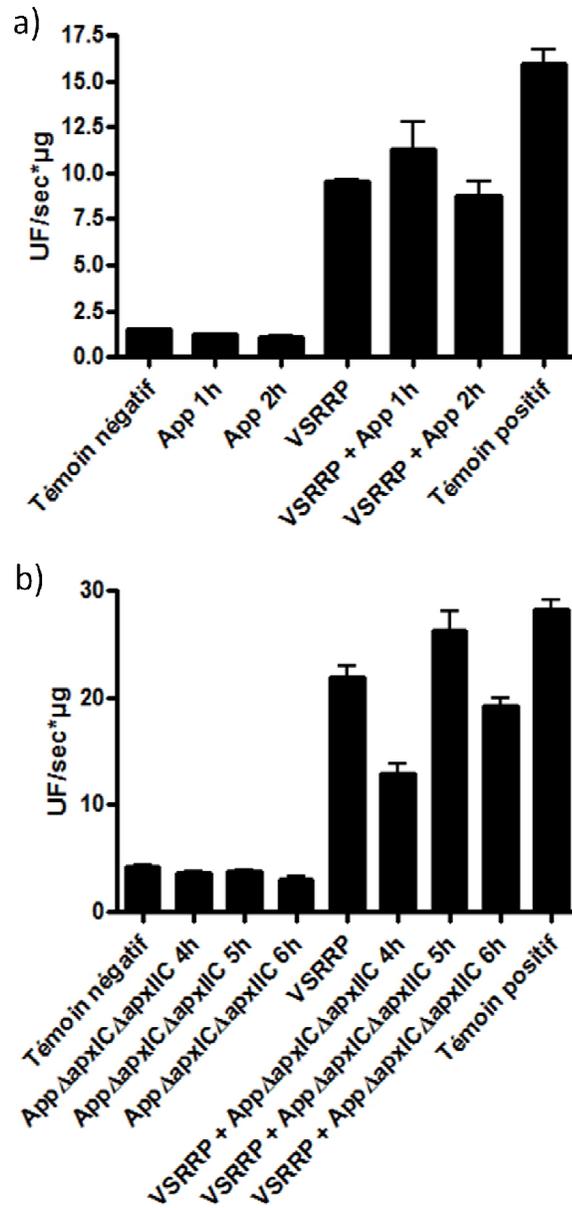


Figure 11 : Taux de caspase 3 exprimé en unité de fluorescence (UF) par rapport au temps (sec) et à la quantité de protéines ( $\mu\text{g}$ ) de caspase 3 libérée par les cellules SJPL pré-infectées pendant 72 heures avec le VSRRP et infectées avec *A. pleuropneumoniae*. a) la lignée cellulaire SJPL infectée avec *A. pleuropneumoniae*; b) la lignée cellulaire SJPL infectée avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta apxIC\Delta apxIIC$ . Le témoin négatif correspond à la lignée cellulaire SJPL incubée seule. Le témoin positif correspond à l'incubation de la lignée cellulaire SJPL avec des inducteurs d'apoptose. Le test a été fait une fois en triplicata.

**Production de cytokines par les cellules pré-infectées avec le VSRRP et la bactérie *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC**

Pour cette expérience, *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC a été utilisé, car ce mutant ne cause pas de cytotoxicité cellulaire quand il est incubé 24 heures avec les cellules et ceci est vrai pour la lignée cellulaire SJPL et MARC-145 (voir Figure 15).

Lorsque la lignée cellulaire SJPL est incubée pendant 48 à 96 heures, il n'y a pas d'IL-8 de libérée (Figure 12.1, a). Cela est aussi le cas quand les cellules sont infectées avec le VSRRP. Par contre, lorsque les cellules sont infectées pendant 24 heures avec la bactérie *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC, il y a production d'IL-8 (87 à 200 pg/ml) (Figure 12.1, a). Il y a la même quantité de cytokine produite lorsqu'il y a co-infection. La différence entre la quantité de cytokine libérée par les cellules quand elles sont infectées avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC ou co-infectées et les cellules non-infectées ou infectées avec le VSRRP est statistiquement significative ( $P < 0,05$ ). De plus, cette production augmente lorsque le temps d'incubation augmente.

Les cellules SJPL incubées pour une période de 48 à 96 heures ne produisent pas d'IFN- $\gamma$  (Figure 12.1, b). Par contre, les cellules qui ont été incubées pendant 48 heures et par la suite infectées pendant 24 heures avec la bactérie *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC vont libérer une faible quantité d'IFN- $\gamma$  (168 pg/ml) (Figure 12.1, b). Cela n'est pas observé lorsque les cellules sont incubées pendant 72 et 96 heures, puis infectées pendant 24 heures avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC. Lors d'infection des cellules avec le VSRRP, il y a production d'IFN- $\gamma$  après de 48 heures (53 pg/ml) et 96 heures (117 pg/ml) (Figure 12.1, b). Par contre, à 72 heures d'infection, il n'y a pas libération d'IFN- $\gamma$ , selon les données obtenues. La quantité d'IFN- $\gamma$  obtenu à 48 heures d'infection est faible et selon la barre d'erreur, il est possible que la quantité réelle soit près de 0 pg/ml. Lorsqu'il y a co-infection avec le VSRRP et la bactérie *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC, il y a production d'IFN- $\gamma$  et cela pour les temps de pré-infection de 48 heures (388 pg/ml), 72 heures (101 pg/ml) et 96 heures (82 pg/ml) (Figure 12.1, b). La quantité de cytokine produite diminue dans le temps. La quantité produite d'IFN- $\gamma$  lors d'une co-infection durant laquelle le VSRRP a été présent pendant 48 heures est significativement plus élevée par rapport aux cellules infectées par le VSRRP pour la même période ( $P < 0,05$ ).

Lorsque la lignée cellulaire MARC-145 est incubée pendant 48 à 96 heures, il y a une faible production d'IL-8 qui diminue dans le temps (35 à 21 pg/ml) (Figure 12.2, a). Lorsque les cellules sont infectées avec le VSRRP, il y a production d'IL-8 et cette production augmente dans le temps (14 à 93 pg/ml) (Figure 12.2, a). Les cellules infectées pendant 24 heures avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ *apxIC* $\Delta$ *apxIIC* produisent plus d'IL-8 que lorsqu'elles sont stimulées par le virus (56 à 134  $\mu$ g/ml) (Figure 12.2, a). De plus, cela est significativement différent pour le temps d'infection du VSRRP de 72 heures ( $P < 0,05$ ). Cela est aussi le cas quand les cellules sont infectées avec le virus et la bactérie. Lorsque les cellules qui ont été incubées pendant 72 et 96 heures sont infectées par *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ *apxIC* $\Delta$ *apxIIC* pendant 24 heures la production d'IL-8 est significativement plus élevée que lorsque les cellules sont incubées seules ( $P < 0,05$ ). De plus, cette production augmente lorsque le temps d'incubation des cellules augmente.

Les cellules MARC-145 incubées de 48 à 96 heures ne produisent pas d'IFN- $\gamma$ . C'est aussi le cas pour les cellules infectées avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ *apxIC* $\Delta$ *apxIIC*. Lorsque les cellules sont infectées avec le VSRRP pendant 96 heures, il y a production d'IFN- $\gamma$  (875 pg/ml) (Figure 12.2, b). Par contre, pour les autres temps d'incubation testés, cette production n'est pas détectable. Lorsqu'il y a co-infection, il y a production d'IFN- $\gamma$ , mais cette production diminue dans le temps. La concentration d'IFN- $\gamma$  à 48 heures post-infection avec le VSRRP et 24 heures avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ *apxIC* $\Delta$ *apxIIC* est de 602 pg/ml (Figure 12.2, b). Après 72 heures post-infection avec le VSRRP et 24 heures avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ *apxIC* $\Delta$ *apxIIC* cette concentration passe à 254 pg/ml et atteint 0 pg/ml à 96 heures post-infection VSRRP et 24 heures post-infection d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ *apxIC* $\Delta$ *apxIIC* (Figure 12.2, b).

La quantification d'IL-6, IL-10 et TNF- $\alpha$  relâchée par les cellules MARC-145 et SJPL dans les mêmes conditions qu'IL-8 et INF- $\gamma$  a aussi été évaluée. Les résultats obtenus démontrent une très faible production ou une production nulle (voir Annexe III).

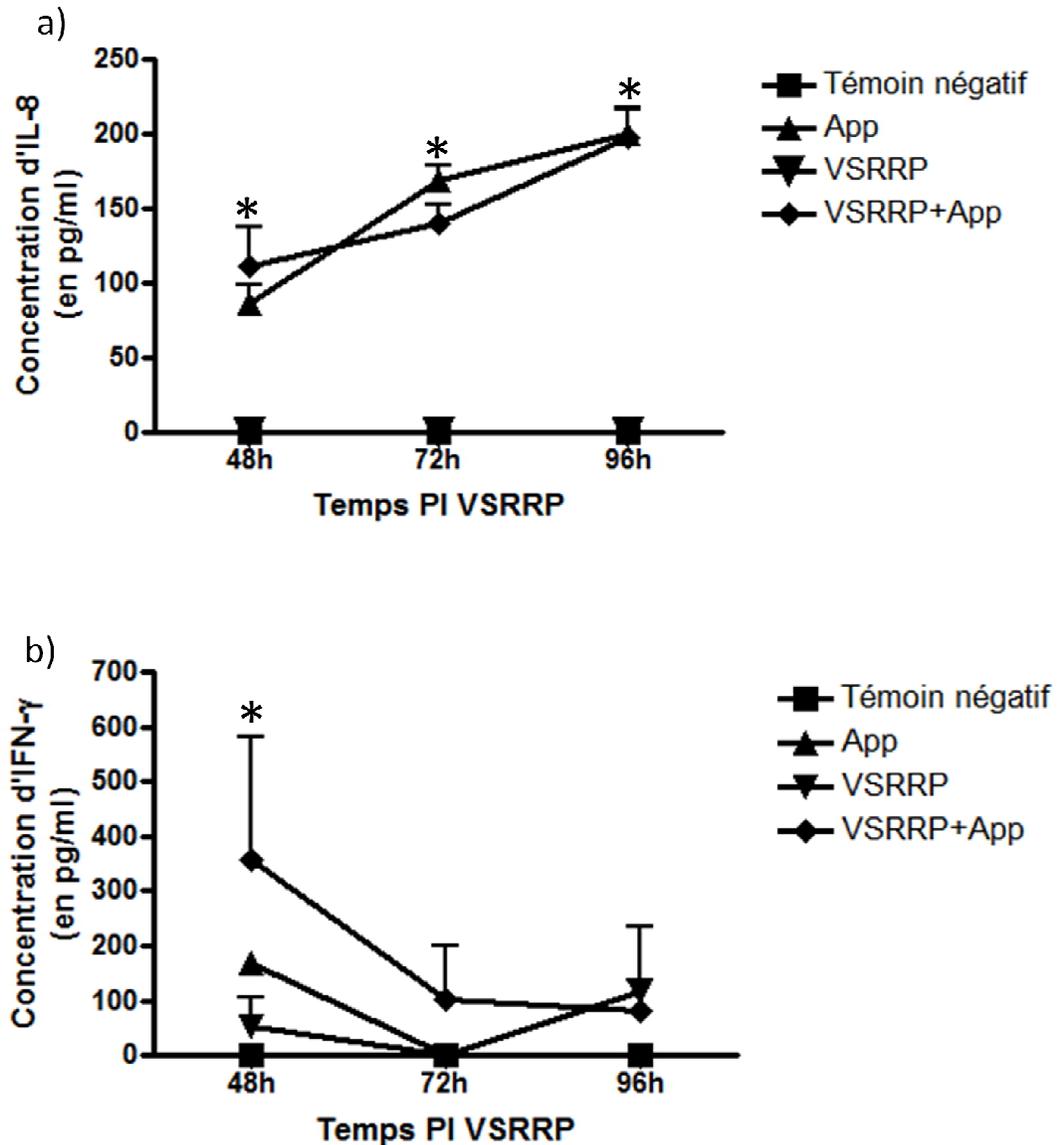


Figure 12.1 : Quantification de la production d'IL-8 et d'IFN- $\gamma$  par la lignée cellulaire SJPL infectée avec le VSRRP pendant 48 heures à 96 heures et une infection de 24 heures avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta apxIC\Delta apxIIC$ . a) production d'IL-8, l'étoile indique qu'il y a une différence significative entre le témoin négatif et App, le témoin négatif et VSRRP + App, le VSRRP et App et le VSRRP et VSRRP + App; b) production d'IFN- $\gamma$ , l'étoile indique qu'il y a une différence significative entre le témoin négatif et App et le VSRRP et VSRRP + App. Le témoin négatif correspond à l'incubation de la lignée cellulaire SJPL seule. Test statistique : two-way ANOVA,  $P < 0,05$ . Trois expériences indépendantes ont été réalisées en duplicata.

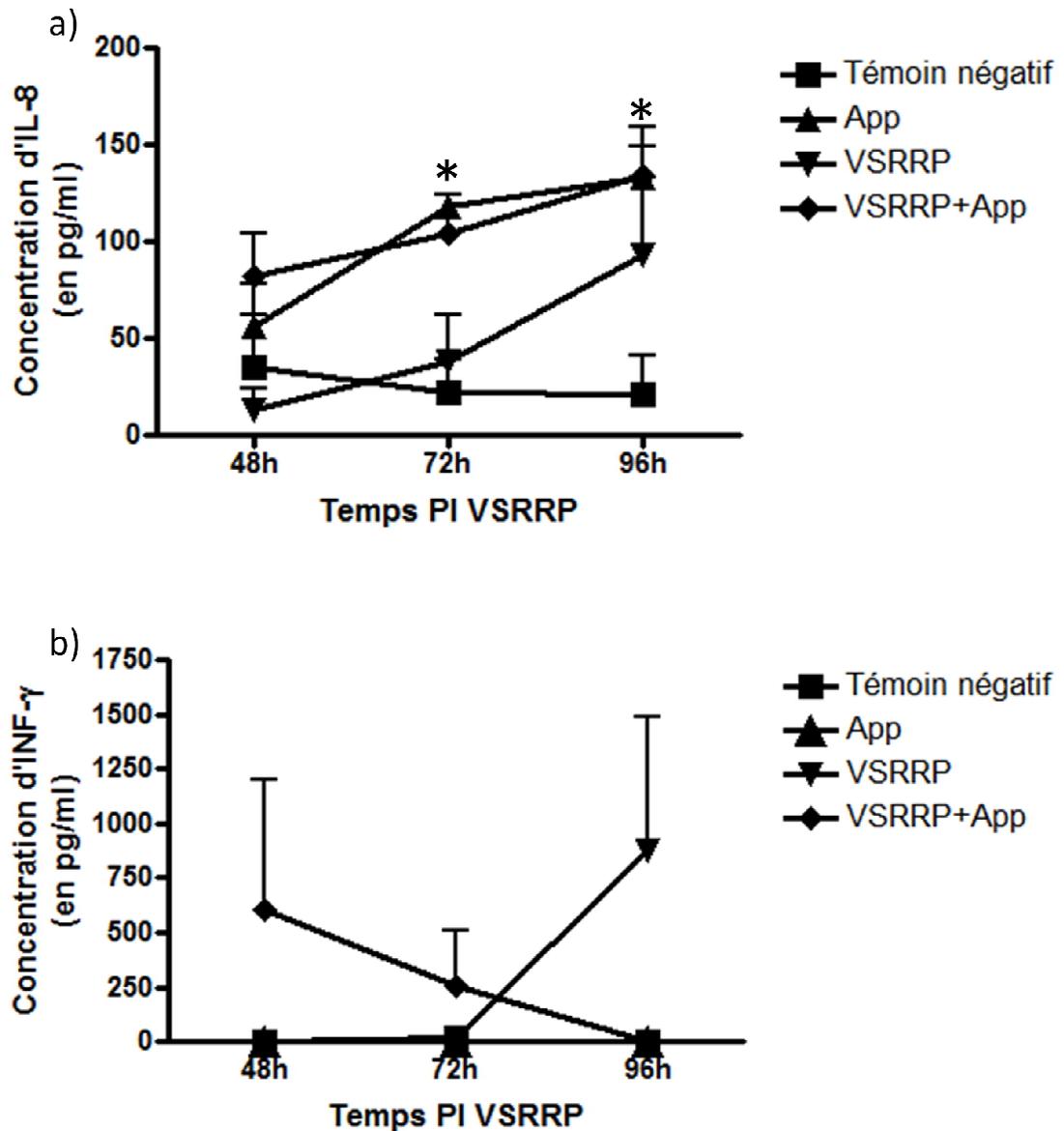


Figure 12.2 : Quantification de la production d'IL-8 et d'IFN- $\gamma$  par la lignée cellulaire MARC-145 infectée avec le VSRRP pendant 48 heures à 96 heures et une infection de 24 heures avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ *apxIC* $\Delta$ *apxIIC*. a) production d'IL-8, l'étoile indique qu'il y a une différence significative entre témoin négatif et App et le témoin négatif et VSRRP + App; b) production IFN- $\gamma$ . Le témoin négatif correspond à l'incubation de la lignée cellulaire MARC-145 seule. Test statistique : two-way ANOVA,  $P < 0,05$ . Trois expériences indépendantes ont été réalisées en duplicata.

### Test d'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* aux cellules lors d'une pré-infection avec VSRRP

L'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* aux cellules SJPL et MARC-145 augmente avec le temps d'incubation. Le nombre d'unité formatrice de colonies (UFC) est de  $6,8 \times 10^4$  après une heure d'incubation et augmente jusqu'à  $4,3 \times 10^5$  après trois heures d'incubation (Figure 13, a). Cette augmentation est aussi observée chez les cellules MARC-145, mais à une plus petite échelle. En fait, après une heure d'incubation avec la bactérie, il y a  $7,4 \times 10^4$  UFC, cela augmente à  $2,9 \times 10^5$  UFC au bout de trois heures d'incubation (Figure 13, b). Lorsque les cellules sont infectées avec le VSRRP pendant 72 heures, puis par la suite infectées avec la bactérie, le nombre de UFC est semblable à une infection simple avec la bactérie et ce dans toutes les conditions testées. Par exemple, le nombre d'UFC lorsqu'il y a une infection de 72 heures avec le VSRRP et de trois heures avec *A. pleuropneumoniae* est de  $4,3 \times 10^5$  et lorsqu'il y a seulement la bactérie présente l'UFC est de  $5,2 \times 10^5$  sur la lignée cellulaire SJPL (Figure 13, a). Cela est aussi vrai pour la lignée cellulaire MARC-145. Dans les mêmes conditions que la lignée cellulaire SJPL, lorsqu'il y a co-infection le UFC est de  $1,8 \times 10^5$ , tandis que lors d'infection simple il est de  $2,9 \times 10^5$  UFC (Figure 13, b).

Lorsque les cellules sont infectées avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta apxIC\Delta apxIIC$ , le nombre d'UFC augmente dans le temps. Pour la lignée SJPL, il y a  $1,5 \times 10^5$  UFC lorsqu'il y a une infection d'une heure avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta apxIC\Delta apxIIC$  et cela augmente à  $2,1 \times 10^5$  UFC au bout de trois heures (Figure 13, a). Cela est aussi observable chez les MARC-145. Après une heure d'infection, il y a  $1,4 \times 10^5$  UFC et cela augmente à  $2,1 \times 10^5$  UFC après trois heures d'infection (Figure 13, b). L'adhérence de la bactérie mutante n'est pas influencée par la présence du VSRRP. Par exemple, le nombre d'UFC lorsqu'il y a une infection de 72 heures avec le VSRRP et de trois heures avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta apxIC\Delta apxIIC$  est de  $2,4 \times 10^5$  et lorsqu'il y a seulement la bactérie présente l'UFC est de  $2,1 \times 10^5$  sur la lignée cellulaire SJPL (Figure 13, a). Cela est aussi vrai pour la lignée cellulaire MARC-145. Dans les mêmes conditions que la lignée cellulaire SJPL, lorsqu'il y a co-infection, le UFC est de  $1,6 \times 10^5$ , tandis que lors d'infection simple il est de  $2,1 \times 10^5$  UFC (Figure 13, b).

Pour les temps de pré-infection avec le VSRRP de 24, 48 et 96 heures, les résultats obtenus lors des tests d'adhérence avec *A. pleuropneumoniae* confirment les résultats obtenus lorsque les cellules sont pré-infectées avec le VSRRP pendant 72 heures (voir Annexe IV).

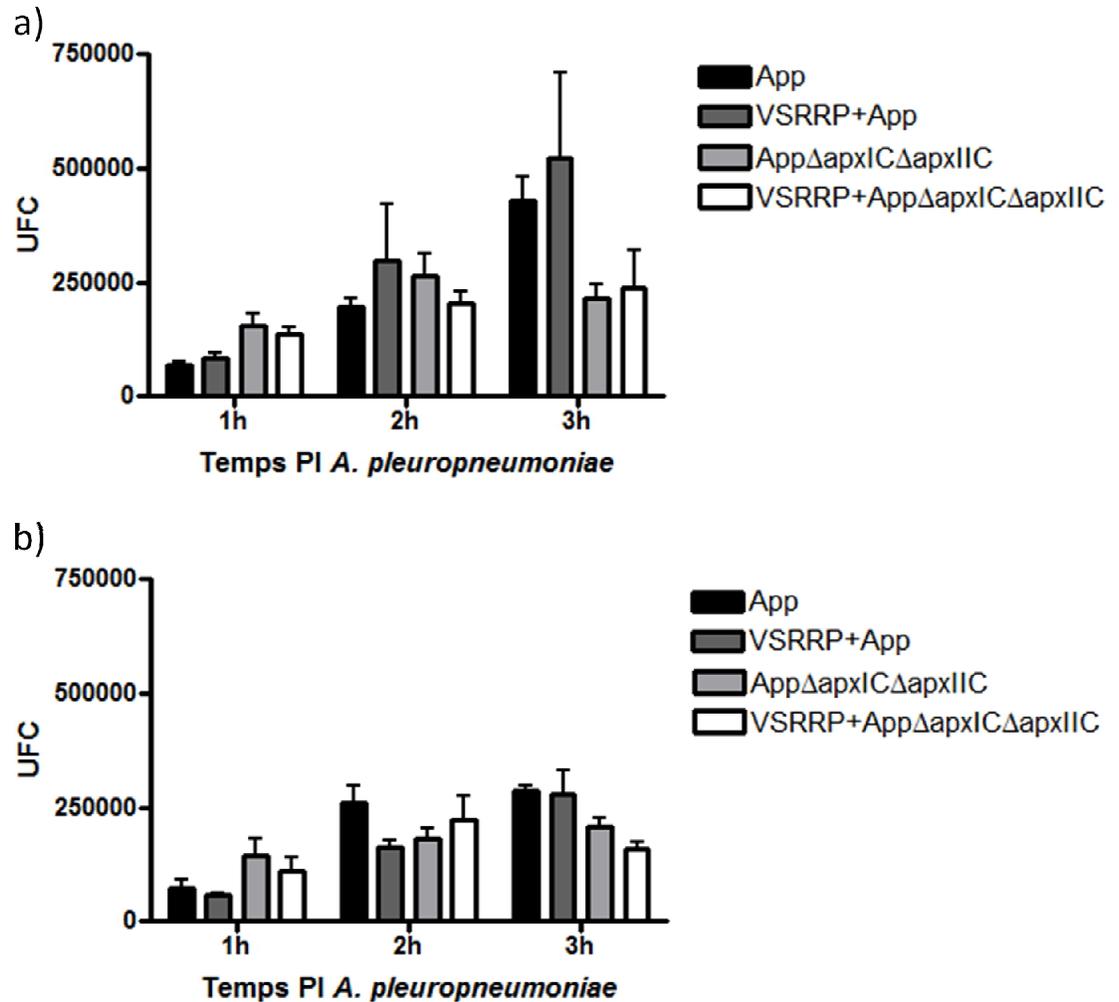


Figure 13 : L'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* ou d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC aux lignées cellulaires pré-infectées pendant 72 heures avec le VSRRP. a) lignée cellulaire SJPL, b) lignée cellulaire MARC-145. Test statistique : two-way ANOVA,  $P < 0,05$ . Les résultats des tests statistiques indiquent qu'il n'y a aucune différence significative entre les différents résultats ( $P < 0,05$ ). Trois expériences indépendantes ont été réalisées en duplicata.

### Détection du VSRRP chez des cellules pré-infectées avec *A. pleuropneumoniae* $\Delta$ *apxIC* $\Delta$ *apxIIC*

Les photos en immunofluorescence montrent qu'il y a infection des cellules SJPL lorsque celles-ci sont infectées 48 heures avec le VSRRP (Figure 14.1, c). Les cellules n'ayant pas subi d'infection virale ou qui sont infectées avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ *apxIC* $\Delta$ *apxIIC* ne démontrent pas de fluorescence, car la protéine N du VSRRP n'est pas présente (Figure 14.1, a et b). Par contre, lorsqu'il y a infection avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ *apxIC* $\Delta$ *apxIIC* et le VSRRP les cellules ne présentent pas de fluorescence (Figure 14.1, d). Il n'est donc pas possible de détecter la protéine N du VSRRP à l'intérieur des cellules SJPL dans cette condition.

La lignée cellulaire MARC-145 est bel et bien infectée avec le VSRRP après 48 heures d'infection, car on observe de la fluorescence (Figure 14.2, c). C'est aussi le cas pour les cellules infectées avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ *apxIC* $\Delta$ *apxIIC* et VSRRP (Figure 14.2, d). Les témoins négatifs démontrent bien que l'anticorps anti-VSRRP se fixe seulement à la protéine N du virus, car les cellules non-infectées (Figure 14.2, a) ou seulement infecté avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ *apxIC* $\Delta$ *apxIIC* (Figure 14.2, b) ne présentent pas de fluorescence.

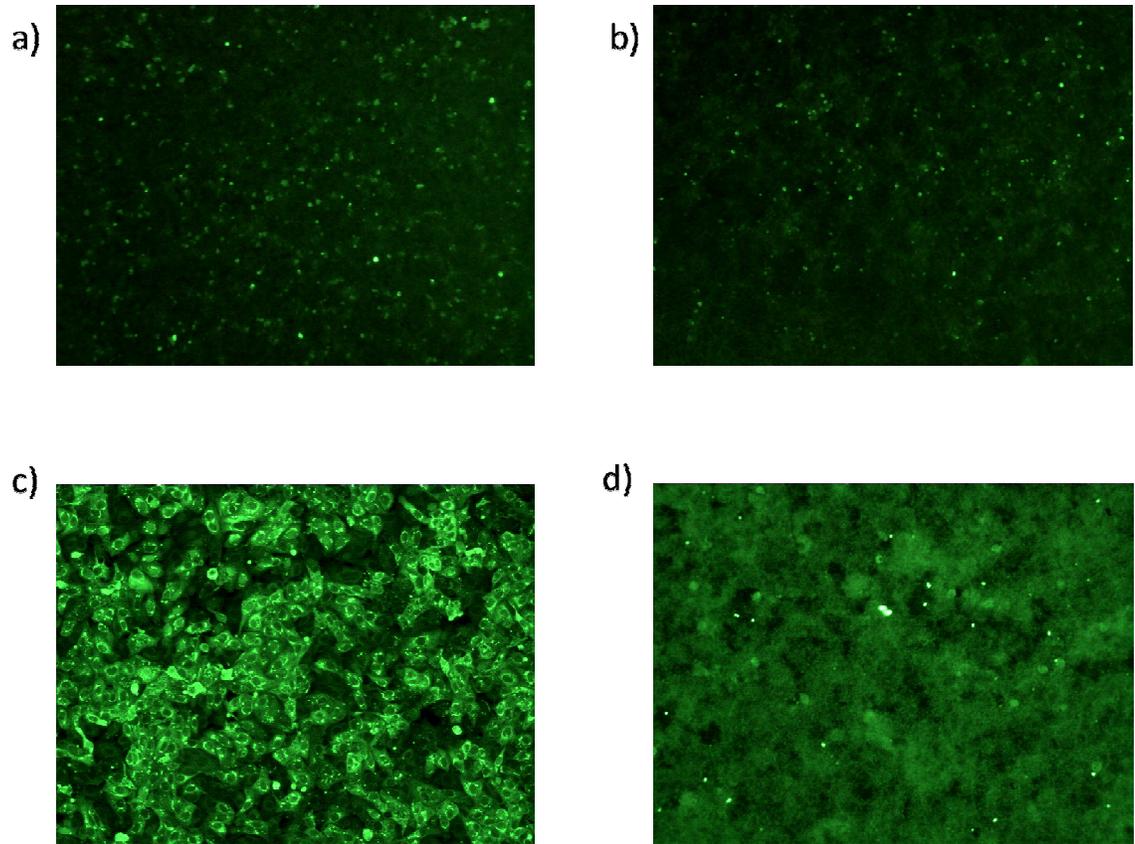


Figure 14.1 : Images de la lignée cellulaire SJPL infectée avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta ApxIC\Delta ApxIIC$  et le VSRRP. Les cellules sont infectées 48 heures avec le VSRRP. a) cellules; b) cellules infectées avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta ApxIC\Delta ApxIIC$ ; c) cellules infectées avec VSRRP; d) cellules infectées avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta ApxIC\Delta ApxIIC$  et VSRRP. Grossissement : 100 X.

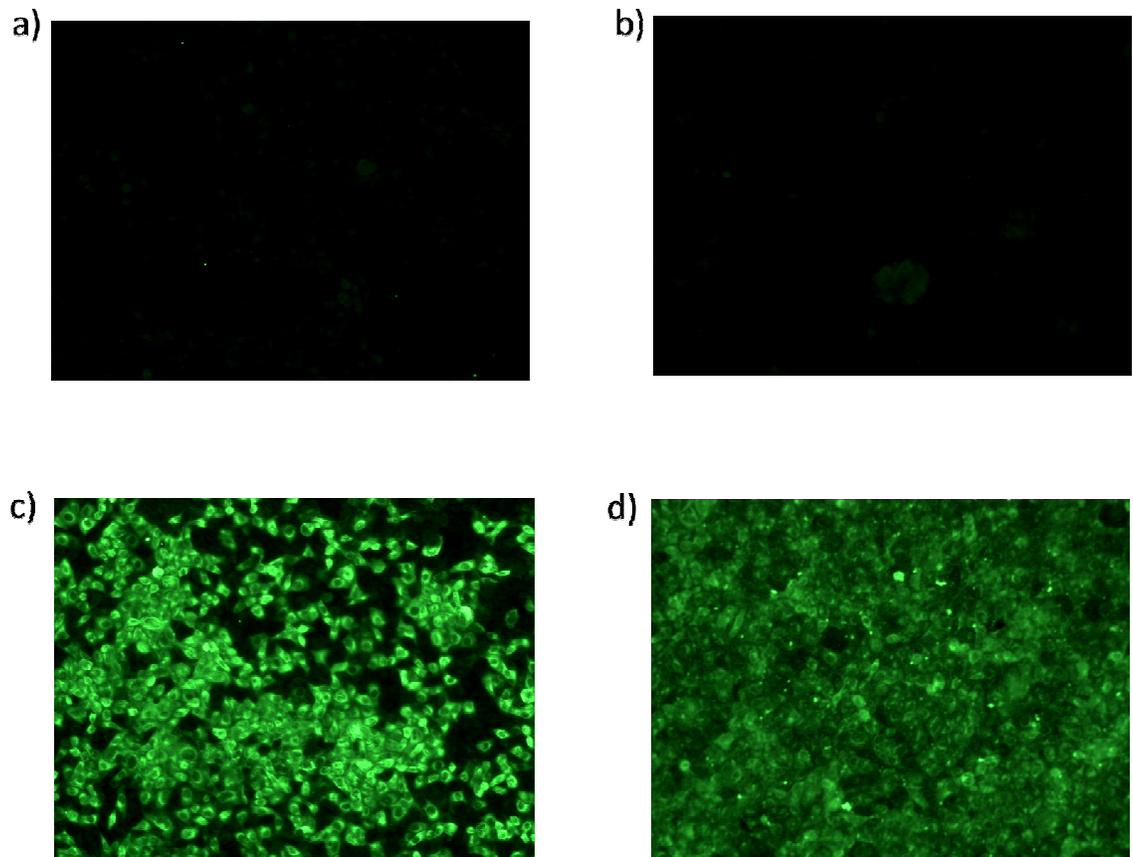


Figure 14.2 : Images de la lignée cellulaire MARC-145 infectée avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta ApxIC\Delta ApxIIC$  et le VSRRP. Les cellules sont infectées 48 heures avec le VSRRP. a) cellules; b) cellules infectées avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta ApxIC\Delta ApxIIC$ ; c) cellules infectées avec VSRRP; d) cellules infectées avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta ApxIC\Delta ApxIIC$  et VSRRP. Grossissement : 100 X.

### **Test de cytotoxicité fait sur les cellules pré-infectées avec *A. pleuropneumoniae* $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC puis infectées avec VSRRP**

Le taux de mortalité cellulaire lorsque les cellules sont infectées pendant 24 à 96 heures avec la bactérie *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC ou le VSRRP ou les deux augmente dans le temps et ce pour les deux lignées cellulaires. Cela est vrai aussi pour les cellules non-infectées. Après 24 heures d'incubation, aucune condition ne cause la libération de LDH (Figure 15, a et b). Pour la lignée cellulaire SJPL, le taux de cytotoxicité est de 5%, 11% et 21% après 48, 72 et 96 heures d'incubation respectivement (Figure 15, a). L'infection avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC cause un taux de mortalité cellulaire de 15% après 48 heures, de 8% après 72 heures et de 23% après 96 heures d'incubation (Figure 15, a). La diminution du taux de cytotoxicité entre 48 heures et 72 heures post-infection est due à la variation entre les différentes répétitions des expériences. Ces taux ne sont statistiquement pas différents des taux de mort cellulaire lorsque les cellules sont non-infectées ( $P > 0,05$ ). Le taux de cytotoxicité de lignée cellulaire SJPL lorsqu'elle est infectée avec le VSRRP est de 46% après 72 heures d'incubation et 79% après 96 heures d'incubation (Figure 15, a). Ces taux sont significativement plus élevés par rapport au taux de mortalité des cellules incubées seules ou infectées avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC dans les mêmes conditions ( $P < 0,05$ ). Durant une co-infection avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC et VSRRP le taux de mortalité cellulaire est de 16% après 48 heures d'infection. Si bien que le taux augmente à 38% après 72 heures d'infection et il n'atteint que 44% après 96 heures (Figure 15, a). La diminution du taux de mort cellulaire lorsqu'il y a co-infection versus une infection avec le VSRRP seul est significativement différent après de 96 heures d'infection ( $P < 0,05$ ).

La lignée cellulaire MARC-145 libère du LDH seulement après 72 (3%) et 96 heures (13%) d'incubation (Figure 15, b). Lorsqu'il y a infection avec la bactérie *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC pendant 48 heures, le taux de cytotoxicité est de 23%, augmente à 42% après 72 heures et atteint 66% après 96 heures (Figure 15, b). Ce taux est significativement plus élevé que les cellules non-infectées pour les temps de 72 et 96 heures ( $P < 0,05$ ). Le taux de cytotoxicité est de 0, 25 et 75% pour les temps d'infection 48, 72 et 96 heures respectivement lorsque les cellules sont infectées avec VSRRP (Figure 15, b). Le

taux est significativement plus élevé que les cellules incubées pendant 96 heures d'incubation ( $P < 0,05$ ). Les taux de cytotoxicité lorsqu'il y a co-infection sont de 10, 61 et 67% pour les temps d'infection de 48, 72 et 96 heures, respectivement (Figure 15, b). Lors de co-infection, il y a une augmentation significative de la mortalité cellulaire par rapport aux cellules non-infectées ou infectées avec le VSRRP pendant 72 heures ( $P < 0,05$ ). Cela est aussi observé à 96 heures d'infection pour les cellules co-infectées versus les cellules seules ( $P < 0,05$ ).

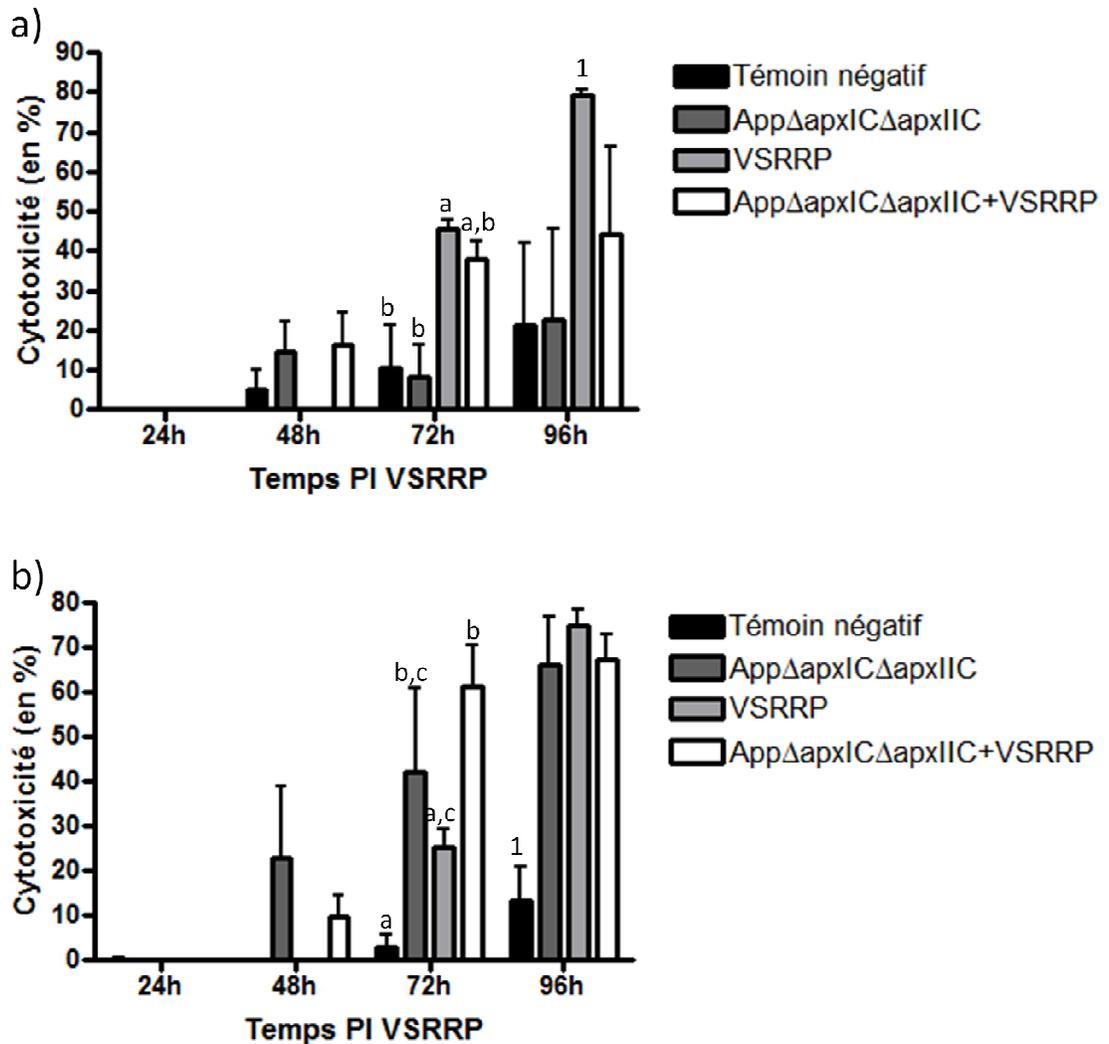


Figure 15 : Test de cytotoxicité réalisée suite à une pré-infection d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta apxIC\Delta apxIIC$ , puis une infection avec le VSRRP de 24 à 96 heures. a) lignée cellulaire SJPL; b) lignée cellulaire MARC-145. Test statistique : two-way ANOVA,  $P < 0,05$ . Une lettre ou un chiffre identique entre deux groupes indique qu'il n'y a pas de différence significative entre ceux-ci. Par exemple, à la figure a) la lettre « b » sur la colonne témoin négatif,  $App\Delta apxIC\Delta apxIIC$  et VSRRP +  $App\Delta apxIC\Delta apxIIC$  indique qu'il n'y a pas de différence significative entre ces deux groupes. Le témoin négatif est la lignée cellulaire SJPL (figure a) et MARC-145 (figure b) incubées seules. Trois expériences indépendantes ont été réalisées en duplicata.

**Titre viral du VSRRP lorsque les cellules sont pré-stimulées avec des bactéries inactivées ou des LPS d'*A. pleuropneumoniae* ou infectées avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ *apxIC* $\Delta$ *apxIIC* puis infectées avec le VSRRP**

Le titre viral lorsque la lignée cellulaire SJPL est infectée avec le VSRRP varie entre  $10^{5,5}$  et  $10^{5,7}$  DICT<sub>50</sub>/ml (dose infectieuse 50%) (Figure 16.1). Cette lignée cellulaire pré-stimulée avec la bactérie inactivée de la souche sauvage ( $10^{5,1}$  DICT<sub>50</sub>/ml) ou de la souche mutée ( $10^{5,8}$  DICT<sub>50</sub>/ml) ne montre pas de diminution ou d'augmentation significative du titre viral (Figure 16.1, a). Cela est aussi vrai quand il y a pré-stimulation avec les LPS de la souche sauvage ( $10^{6,1}$  DICT<sub>50</sub>/ml) (Figure 16.1, a). Par contre, quand l'infection se fait avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ *apxIC* $\Delta$ *apxIIC* ( $10^{1,5}$  DICT<sub>50</sub>/ml) ou le surnageant d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ *apxIC* $\Delta$ *apxIIC* ( $10^{2,2}$  DICT<sub>50</sub>/ml) et le VSRRP les titres viraux diminuent significativement ( $P < 0,05$ ) (Figure 16.1, b).

Pour ce qui est de la lignée cellulaire MARC-145, le titre viral lorsque les cellules sont infectées avec le VSRRP varie entre  $10^{5,8}$  et  $10^{5,9}$  DICT<sub>50</sub>/ml (Figure 16.2, a et b). Quand il y a pré-stimulation avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ *apxIC* $\Delta$ *apxIIC* inactivée, il y a une augmentation significative du titre viral ( $10^{6,3}$  DICT<sub>50</sub>/ml,  $P < 0,05$ ) (Figure 16.2, a). Par contre, cela n'est pas le cas lorsque les cellules sont pré-stimulées avec *A. pleuropneumoniae* inactivé ( $10^{5,6}$  DICT<sub>50</sub>/ml) ou des LPS de *A. pleuropneumoniae* ( $10^{6,3}$  DICT<sub>50</sub>/ml) (Figure 16.2, a). Lorsqu'il y a une pré-stimulation avec le surnageant d' *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ *apxIC* $\Delta$ *apxIIC* ( $10^{4,9}$  DICT<sub>50</sub>/ml) (Figure 16.2, b), le titre viral diminue significativement ( $P < 0,05$ ). La diminution du titre viral lorsque les cellules sont pré-infectées avec la bactérie *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ *apxIC* $\Delta$ *apxIIC* ( $10^{4,9}$  DICT<sub>50</sub>/ml) (Figure 16, b) n'est pas statistiquement significative ( $P < 0,05$ ).

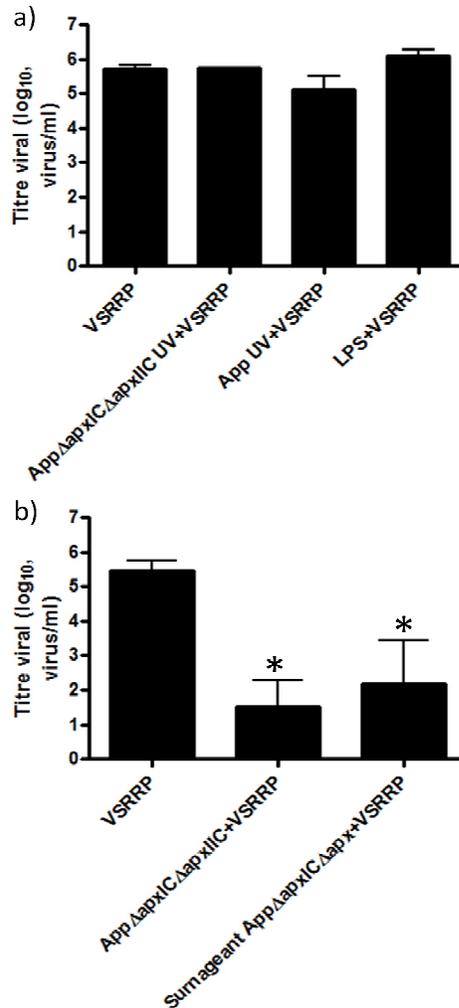


Figure 16.1 : Titre viral du VSRRP lorsque les cellules de la lignée cellulaire SJPL sont co-infectées avec *A. pleuropneumoniae* et VSRRP. a) cellules pré-stimulées avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta apxIC\Delta apxIIC$  inactivé aux UV ou avec *A. pleuropneumoniae* inactivé aux UV ou avec des LPS d'*A. pleuropneumoniae* pendant 24 heures avant d'être infectées avec le VSRRP pendant 48 heures; b) cellules pré-infectées avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta apxIC\Delta apxIIC$  ou pré-stimulées avec le surnageant d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta apxIC\Delta apxIIC$  pendant trois heures avant d'être infectées avec le VSRRP pendant 72 heures. Test statistique : t-Student,  $P < 0,05$ . Les colonnes ayant l'étoile indiquent que le titre viral est significativement différent par rapport aux témoins, c'est-à-dire les cellules infectées avec le VSRRP. a) Deux expériences indépendantes faites à quatre répétitions. b) Trois expériences indépendantes faites à quatre répétitions.

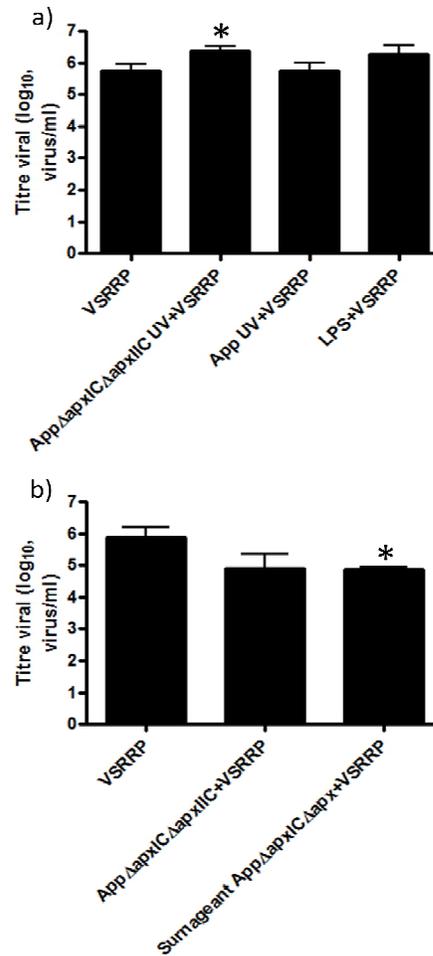


Figure 16.2 : Titre viral de cellules de la lignée cellulaire MARC-145 infectées avec le VSRRP et co-infectées avec *A. pleuropneumoniae* et VSRRP. a) cellules pré-stimulées avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta apxIC\Delta apxIIC$  inactivé aux UV ou avec *A. pleuropneumoniae* inactivé aux UV ou avec des LPS d'*A. pleuropneumoniae* pendant 24 heures avant d'être infectées avec le VSRRP pendant 48 heures; b) cellules pré-infectées avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta apxIC\Delta apxIIC$  ou pré-stimulées avec le surnageant d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta apxIC\Delta apxIIC$  pendant trois heures avant d'être infectées avec le VSRRP pendant 72 heures. Test statistique : t-Student,  $P < 0,05$ . Les colonnes ayant l'étoile indiquent que le titre viral est significativement différent par rapport aux témoins, c'est-à-dire les cellules étant infectées avec le VSRRP. a) Deux expériences indépendantes faites à quatre répétitions. b) Trois expériences indépendantes faites à quatre répétitions.

**Test d'ATPlite fait sur les cellules pré-stimulées avec le surnageant d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta apxIC\Delta apxIIC$  puis infectées avec le VSRRP**

Lorsque les cellules SJPL sont incubées pendant 72 heures, il y a une perte d'ATP qui est dégradé (16 500 unité de luminescence (UL) dégagées par la dégradation de l'ATP) (Figure 17, a). La dégradation de l'ATP est moindre quand les cellules sont incubées avec le surnageant d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta apxIC\Delta apxIIC$  pendant 72 heures (7900 UL) (Figure 17, a). Les cellules infectées avec le VSRRP dégradent un niveau semblable d'ATP que les cellules seules (17 200 UL) (Figure 17, a). Il y a une différence significative entre la quantité d'ATP dégradée des cellules stimulées avec le surnageant et celle des cellules infectées avec le VSRRP ( $P < 0,05$ ). Il y a très peu de dégradation d'ATP lorsque les cellules sont co-infectées avec le surnageant et le VSRRP (4600 UL) (Figure 17, a). Donc, le niveau d'ATP dégradé lors de co-infection est significativement plus bas que toutes les autres conditions testées avec la lignée cellulaire SJPL.

Pour ce qui est de la lignée cellulaire MARC-145 le taux d'ATP dégradé est élevé lorsque les cellules sont incubées pendant 72 heures (22 000 UL) (Figure 17, b). Par contre, ce niveau diminue de manière significative lorsque les cellules sont infectées avec le surnageant d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta apxIC\Delta apxIIC$  (7300 UL) ou le VSRRP (9500 UL) ou co-infectées avec d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta apxIC\Delta apxIIC$  et le VSRRP (5800 UL) ( $P < 0,05$ ) (Figure 17, b).

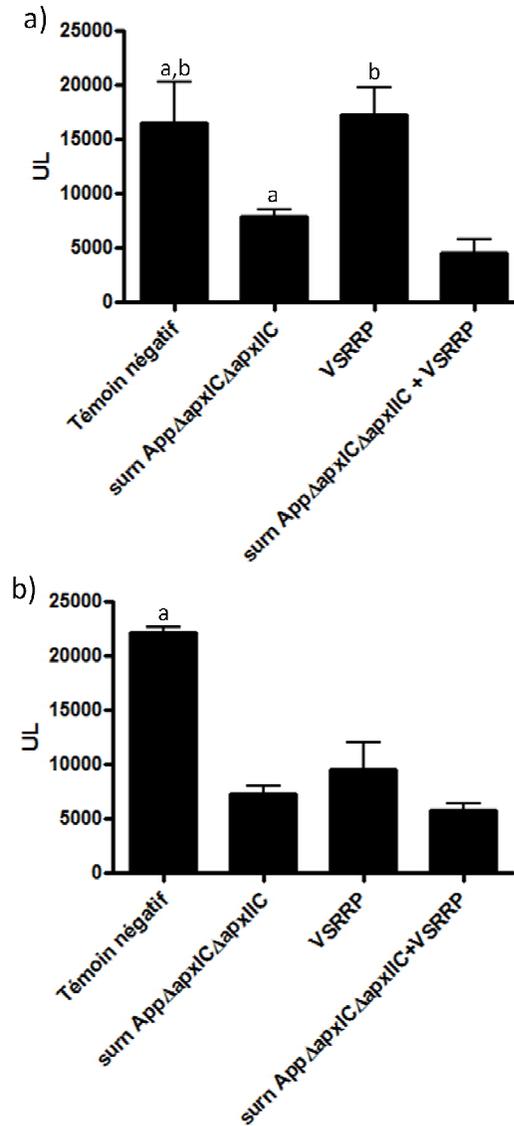


Figure 17 : Test d'ATPlite fait sur des cellules stimulées avec le surnageant (surn) d'*A. pleuropneumoniae* ΔapxICΔapxIIC et infectées avec le VSRRP pendant 72 heures. a) lignée cellulaire SJPL; b) lignée cellulaire MARC-145. Test statistiques : t-Student,  $P < 0,05$ . Une lettre identique entre deux groupes indique qu'il n'y a pas de différence significative entre ceux-ci. Par exemple, à la figure a) la lettre « a » sur la colonne témoin négatif et surn AppΔapxICΔapxIIC indique qu'il n'y a pas de différence significative entre ces deux groupes. Le témoin négatif correspond à l'incubation de la lignée cellulaire SJPL ou MARC-145 seule. Une expérience a été réalisée en triplicata.

**Immunofluorescence des cellules pré-stimulées avec le surnageant d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta ApxIC\Delta ApxIIC$  puis infectées avec VSRRP**

Les photos en immunofluorescence montrent qu'il y a infection des cellules SJPL lorsque celles-ci sont infectées 72 heures avec le VSRRP (Figure 18, b). Les cellules non-infectées ne démontrent pas de fluorescence, car le VSRRP n'est pas présent (Figure 18, a). Par contre, lorsqu'il y a incubation avec le surnageant d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta ApxIC\Delta ApxIIC$  et infection avec le VSRRP les cellules ne démontrent pas de fluorescence (Figure 18, c). Le VSRRP n'infecte donc pas les cellules SJPL dans cette condition.

Les photos en immunofluorescence montrent qu'il y a infection des cellules MARC-145 lorsque celles-ci sont infectées 72 heures avec le VSRRP (Figure 18, d). C'est aussi le cas pour les cellules incubées avec le surnageant d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta ApxIC\Delta ApxIIC$  et infectées avec le VSRRP (Figure 18, f). Les contrôles négatifs démontrent bien que l'anticorps se fixe seulement à la protéine N du virus, car les cellules non-infectées (Figure 18, e) n'émettent pas de fluorescence.

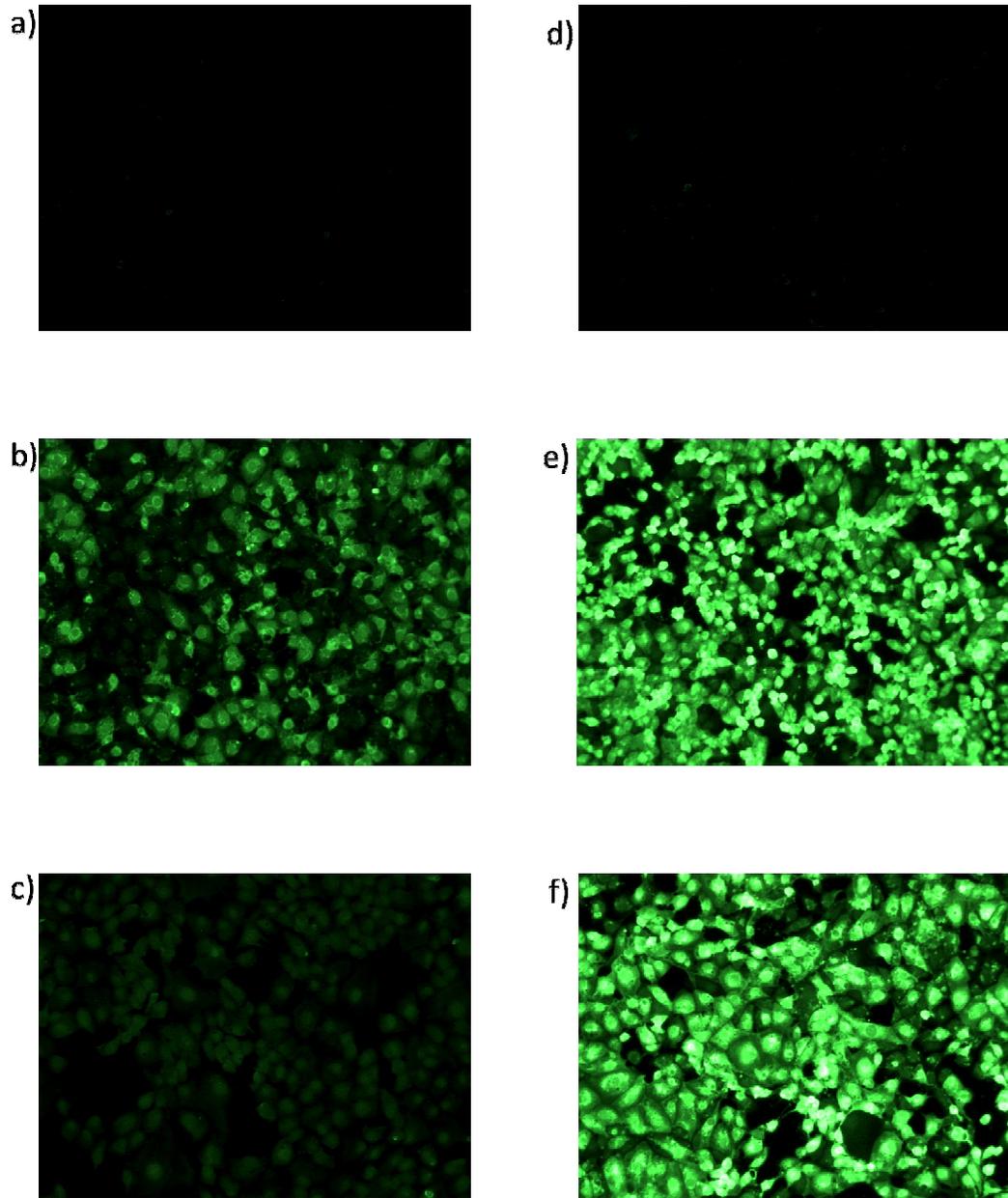


Figure 18 : Images des cellules incubées avec le surnageant d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta ApxIC\Delta ApxIIC$  et infectées avec le VSRRP. Les cellules sont infectées 72 heures. a) lignée cellulaire SJPL; b) lignée cellulaire SJPL infectée avec VSRRP; c) lignée cellulaire SJPL incubée avec le surnageant d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta ApxIC\Delta ApxIIC$  et infectées avec le VSRRP; d) lignée cellulaire MARC-145; e) lignée cellulaire MARC-145 infectées avec VSRRP; f) lignée cellulaire MARC-145 incubée avec le surnageant d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta ApxIC\Delta ApxIIC$  et infectées avec le VSRRP. Grossissement : 100X.

**Immunofluorescence des cellules pré-stimulées avec le surnageant d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta ApxIC\Delta ApxIIC$  inactivé par la chaleur puis infectées avec VSRRP**

Les photos en immunofluorescence montrent qu'il y a infection des cellules SJPL lorsque celles-ci sont infectées 72 heures avec le VSRRP (Figure 19.1, a). Lorsqu'il y a incubation avec le surnageant d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta ApxIC\Delta ApxIIC$  et infection avec le VSRRP les cellules ne démontrent pas ou peu de fluorescence (Figure 19.1, b). Avant d'incuber le surnageant avec les cellules, le surnageant a été inactivé par incubation à 56°C pendant 30 minutes. Les cellules ont été incubées avec le surnageant et infectées par la suite avec le VSRRP. Les images montrent qu'il n'y a pas de fluorescence (Figure 19.1, c), le VSRRP ne peut donc pas infecter les cellules lorsque celles-ci sont incubées avec le surnageant inactivé.

La lignée cellulaire MARC-145 est infectée avec le VSRRP après 72 heures d'infection, car il y a de la fluorescence au niveau des cellules infectées (Figure 19.2, a). C'est aussi le cas pour les cellules incubées avec le surnageant d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta ApxIC\Delta ApxIIC$  et infectées avec le VSRRP (Figure 19.2, b). Lorsque les cellules sont incubées avec du surnageant autoclavé, puis avec le VSRRP, le virus ne peut pas infecter les cellules, car il n'y a pas de fluorescence au niveau de la cellule (Figure 19.2, c). Cela est peut être causé par l'endommagement des cellules dû à un manque de nutriments à l'intérieur du surnageant autoclavé. L'endommagement des cellules peut empêcher le virus de se répliquer dans les cellules.

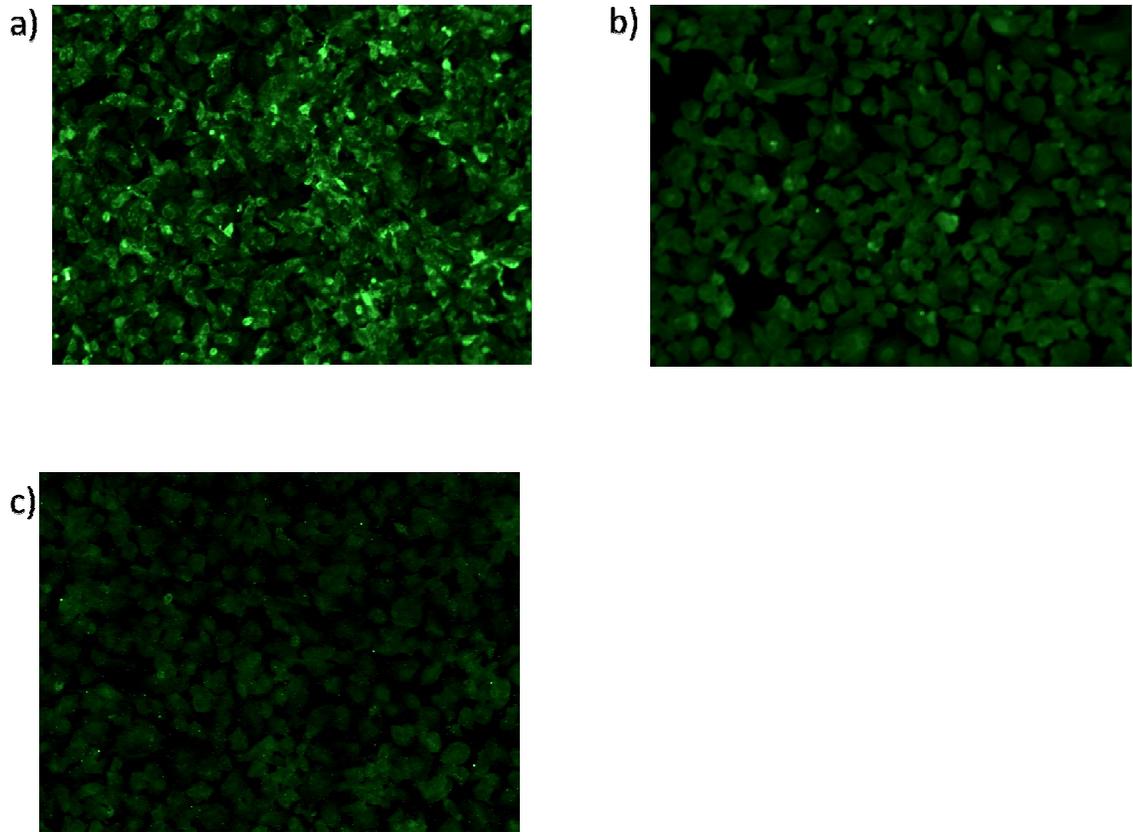


Figure 19.1 : Images de la lignée cellulaire SJPL incubée avec le surnageant inactivé d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta ApxIC\Delta ApxIIC$  et infectées avec le VSRRP. Les cellules sont infectées 72 heures. a) cellules infectées avec le VSRRP; b) cellules incubées avec le surnageant d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta ApxIC\Delta ApxIIC$  et infectées avec le VSRRP; c) cellules incubées avec le surnageant d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta ApxIC\Delta ApxIIC$  inactivé à 56°C pendant 30 minutes et infectées avec le VSRRP. Grossissement : 100 X.

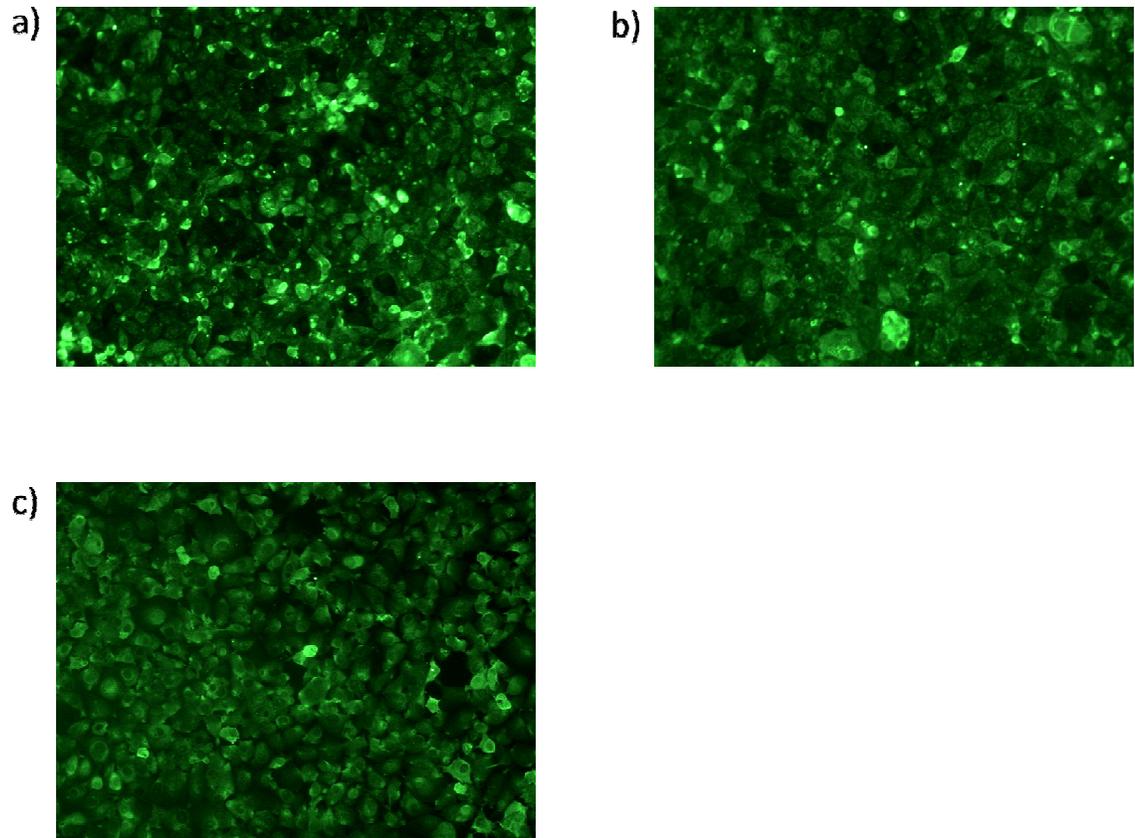


Figure 19.2 : Images de la lignée cellulaire MARC-145 incubée avec le surnageant inactivé d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta ApxIC\Delta ApxIIC$  et infectées avec le VSRRP. Les cellules sont infectées 72 heures. a) cellules infectées avec VSRRP; b) cellules incubées avec le surnageant d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta ApxIC\Delta ApxIIC$  et infectées avec le VSRRP; c) cellules MARC-145 incubées avec le surnageant d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta ApxIC\Delta ApxIIC$  autoclavé et infectées avec le VSRRP. Grossissement : 100 X.

**Immunofluorescence des cellules pré-stimulées avec le surnageant d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta ApxIC\Delta ApxIIC$  fractionné puis infectées avec VSRRP**

Pour cette expérience nous avons utilisé deux fractions : le filtrat qui contient les molécules ayant un poids moléculaire de 5 kDa et moins et le surnageant qui contient toutes les molécules ayant un poids moléculaire supérieur à 5 kDa. Lorsque les cellules sont incubées avec le filtrat du surnageant et le VSRRP, il n'y a pas de fluorescence, donc il n'est pas possible de détecter la protéine virale N (Figure 20.1, d). Par contre, dans les mêmes conditions quand les cellules sont incubées avec le surnageant contenant les molécules ayant un poids moléculaire supérieur à 5 kDa, il y a de la fluorescence, donc il est possible de détecter la protéine virale N à l'intérieur des cellules (Figure 20.1, c).

L'incubation des cellules avec le surnageant fractionné a aussi été fait avec la lignée cellulaire MARC-145. Les résultats obtenus ont démontré que lorsque qu'il y a incubation avec le filtrat du surnageant et le VSRRP, la protéine N de celui-ci n'est pas détectée dans les cellules (Figure 20.2, d). Par contre, lorsque l'incubation se fait avec la fraction du surnageant contenant les molécules ayant un poids moléculaire supérieur à 5 kDa et une infection avec le VSRRP, il y a de la fluorescence, la protéine N du VSRRP est donc détectable dans les cellules (Figure 20.2, c).

L'incapacité du VSRRP d'infecter les cellules SJPL ou MARC-145 lorsque celles-ci sont incubées avec le filtrat du surnageant bactérien peut être causé par l'endommagement des cellules dû à un manque de nutriment pour les cellules. L'endommagement des cellules peut empêcher le virus de se répliquer dans les cellules.

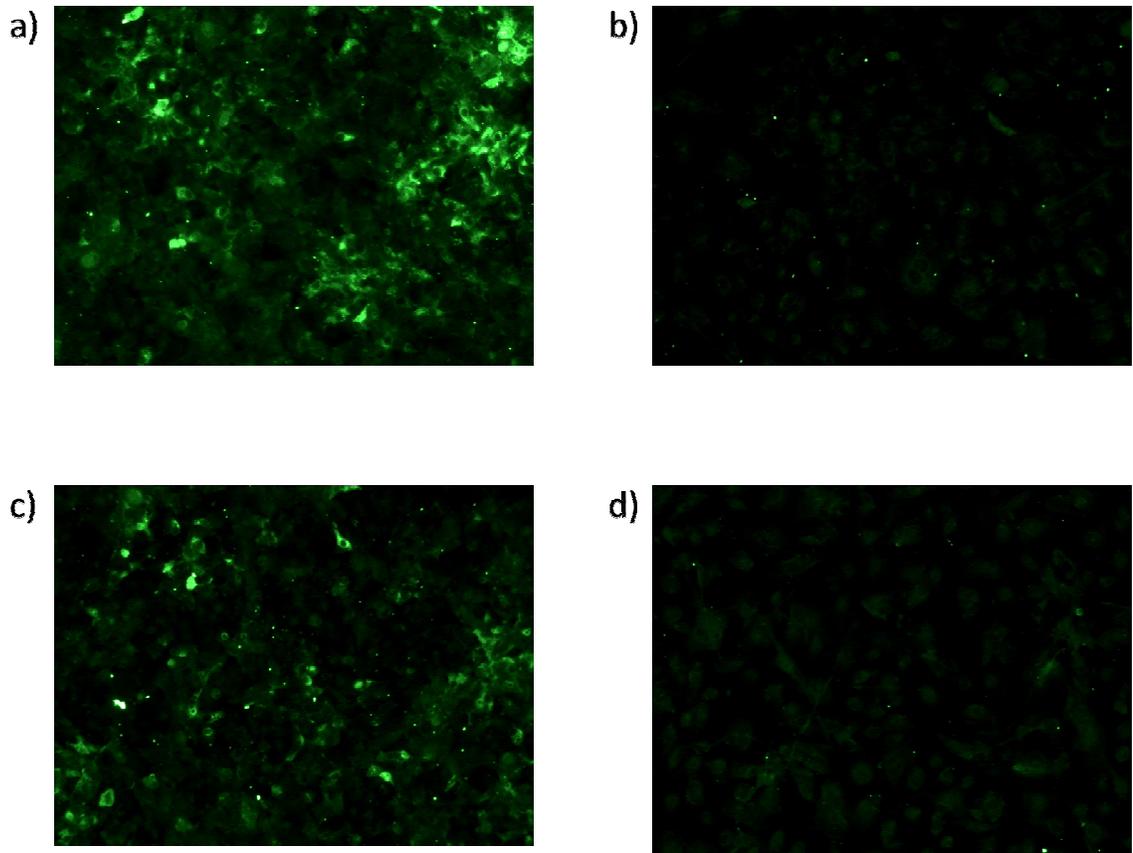


Figure 20.1 : Images de la lignée cellulaire SJPL incubée avec le surnageant fractionné d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta ApxIC\Delta ApxIIC$  et infectée avec le VSRRP. Les cellules sont infectées 72 heures. a) cellules infectées avec le VSRRP; b) cellules incubées avec le surnageant d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta ApxIC\Delta ApxIIC$  et infectées avec le VSRRP; c) cellules incubées avec la fraction contenant les molécules du surnageant supérieur à 5 kDa d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta ApxIC\Delta ApxIIC$  et infectées avec le VSRRP; d) cellules avec le filtrat du surnageant d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta ApxIC\Delta ApxIIC$  et infectées avec le VSRRP. Grossissement : 100 X.

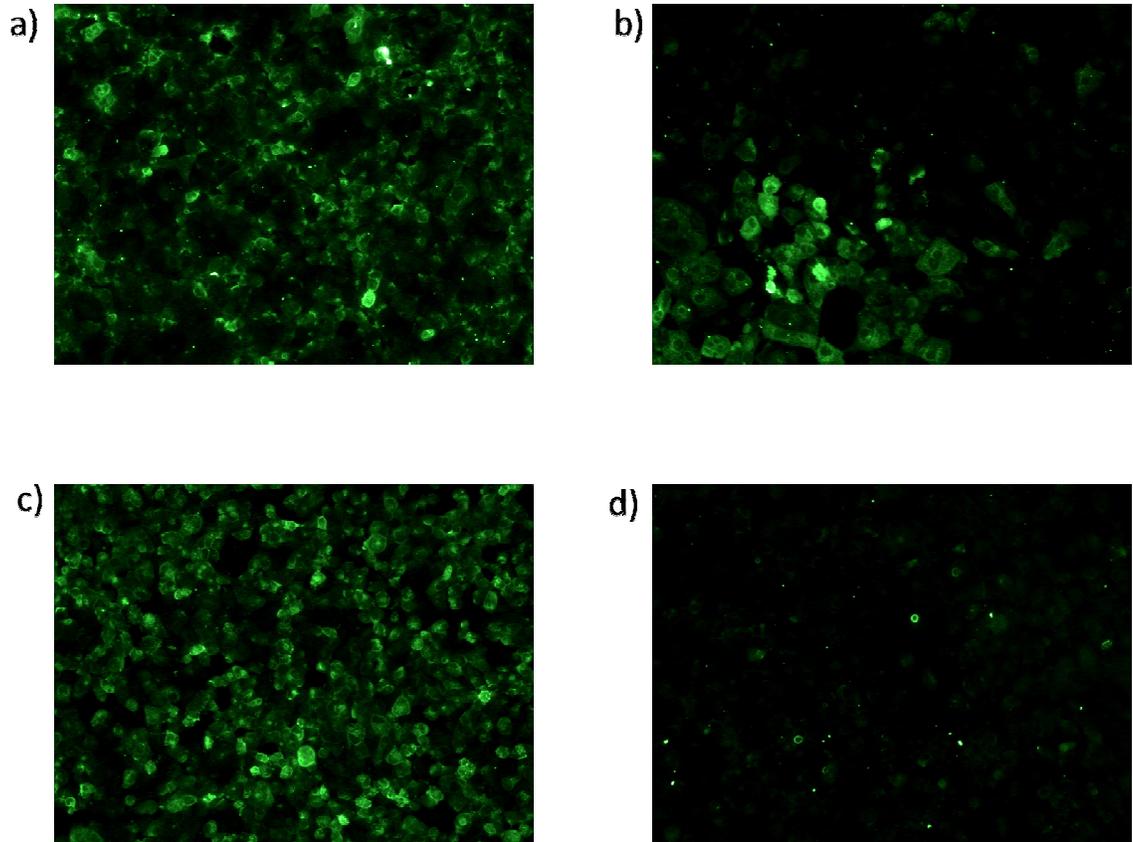


Figure 20.2 : Images de la lignée cellulaire MARC-145 incubée avec le surnageant fractionné d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ *ApxIC* $\Delta$ *ApxIIC* et infectée avec le VSRRP. Les cellules sont infectées 72 heures. a) cellules infectées avec le VSRRP; b) cellules incubées avec le surnageant d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ *ApxIC* $\Delta$ *ApxIIC* et infectées avec le VSRRP; c) cellules incubées avec la fraction contenant les molécules du surnageant supérieur à 5 kDa d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ *ApxIC* $\Delta$ *ApxIIC* et infectées avec le VSRRP; d) cellules avec le filtrat du surnageant d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ *ApxIC* $\Delta$ *ApxIIC* et infectées avec le VSRRP. Grossissement : 100 X.

## **DISCUSSION**

Le but du projet était de déterminer s'il y avait une interaction entre le VSRRP et la bactérie *A. pleuropneumoniae* lors d'une co-infection. Pour ce faire, nous avons développé deux modèles *in vitro* d'infection avec ces pathogènes. Nous avons utilisé les lignées cellulaires MARC-145 (Kim, *et al.*, 1993) et SJPL (Seo, *et al.*, 2001, Lévesque, *et al.*, 2009), car elles sont reconnues pour être permissives au VSRRP. De plus, il a été démontré qu'*A. pleuropneumoniae* adhère à la lignée SJPL (Auger, *et al.*, 2009).

Nos résultats ont montré que lorsqu'il y avait une infection des cellules avec le VSRRP pendant 72 heures, puis une infection avec *A. pleuropneumoniae* pendant 2 heures, il y avait augmentation de la mortalité cellulaire comparativement à une infection simple avec le VSRRP ou la bactérie *A. pleuropneumoniae* (Figure 10). Pour certaines expériences, le temps d'incubation avec *A. pleuropneumoniae* devait être prolongé plus de 2 heures. Comme la souche S4074 produit plusieurs toxines, nous avons travaillé avec le mutant 147 ( $\Delta apxIC\Delta apxIIC$ ) qui ne produisait pas de toxines ApxI et ApxII actives, permettant ainsi de prolonger les temps d'incubation. Nous avons également noté une augmentation de la mortalité cellulaire lorsqu'il y a incubation avec les cellules du VSRRP pendant 72 heures et avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta apxIC\Delta apxIIC$  pendant 4 à 6 heures (Figure 10). Plusieurs groupes ont démontré que le VSRRP causait l'apoptose des cellules (Suarez, *et al.*, 1996, Sur, *et al.*, 1997, Sirinarumitr, *et al.*, 1998, Kim, *et al.*, 2002, Miller & Fox, 2004). Dans ce projet, nous avons vérifié si la présence d'*A. pleuropneumoniae* jouait un rôle au niveau de l'apoptose. Nos résultats indiquent que le taux d'apoptose n'augmente ou ne diminue lorsqu'il y a co-infection avec le VSRRP et *A. pleuropneumoniae* (Figure 11). Lors d'infection *in vitro*, plusieurs expériences de co-infection ont démontré que les cellules se comportaient différemment lorsqu'il y avait une co-infection versus une infection simple. Il y a plusieurs expériences qui ont été faites avec le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (HIV-1) et des pathogènes opportunistes. Par exemple, *Mycobacterium tuberculosis* cause l'augmentation de la réplication d'HIV-1 chez les cellules mononucléaires du sang (PBMC) (Zhang, *et al.*, 1995, Goletti, *et al.*, 1996). Une expérience fait sur biopuces a démontré que les gènes étaient exprimés différemment lorsqu'il y avait une co-infection avec le virus HIV-1 et la bactérie *Neisseria gonorrhoeae* versus une infection simple avec HIV-1. Dans ce cas, les gènes qui sont exprimés

différemment lorsqu'il y a co-infection sont reliés à des mécanismes de mort cellulaire ou au système immunitaire (Montano, *et al.*, 2006).

Dans la majorité des cas, les expériences subséquentes ont démontré que les cytokines relâchées par les cellules jouaient un rôle dans l'augmentation de la mortalité cellulaire. Ce rôle a été prouvé lorsqu'il y a co-infection des macrophages alvéolaires avec le virus HIV-1 et *M. tuberculosis* (Zhang, *et al.*, 1995). Ils ont démontré qu'IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$  jouaient un rôle, car en bloquant ces cytokines, il y a diminution de la réplication d'HIV-1. D'autres expériences de co-infection faites avec *Leishmania infantum* et HIV-1 démontrent le rôle des cytokines dans l'augmentation de la réplication virale dans les cellules co-infectées avec ces deux pathogènes (Zhao, *et al.*, 2004). Dans certains cas, les cytokines semblent plutôt avoir un rôle d'inhibition sur la réplication virale. C'est le cas lorsqu'il y a co-infection avec HIV-1 et le virus de l'influenza. Lorsqu'il y a co-infection dans les PBMC, il y a production de plusieurs facteurs solubles. Il a été démontré qu'il y avait de l'IFN- $\alpha$  de sécrété et que cette molécule bloquait partiellement la réplication de virus HIV-1 (Pinto, *et al.*, 2000). Le même phénomène est observé lorsqu'il y a co-infection avec le VSRRP et le circovirus porcin de type 2 (PCV-2) de macrophages alvéolaires porcins ou de la lignée cellulaire MARC-145 (Chang, *et al.*, 2005). Bref, il y a diminution de l'effet cytopathique lorsqu'il y a co-infection et cela serait dû en partie à la libération d'IFN- $\alpha$ . Donc, nous avons fait des expériences pour détecter la présence de plusieurs cytokines dans le surnageant cellulaire. Selon les résultats obtenus, l'infection des cellules avec le VSRRP et/ou la bactérie *A. pleuropneumoniae* n'induit pas la libération d'IL-6, IL-10 et TNF- $\alpha$  (Annexe III). Cela ne signifie pas que ces cytokines ne sont pas produites lors d'infection chez le porc lorsqu'*A. pleuropneumoniae* et/ou de VSRRP sont présents, mais plutôt que dans nos conditions expérimentales, il n'a pas été possible de détecter ces cytokines. Par contre, les conditions expérimentales utilisées ont permis de détecter IL-8 et IFN- $\gamma$ . *A. pleuropneumoniae* induit la production d'IL-8 chez les lignées cellulaires MARC-145 et SJPL (Figure 12). IL-8 est une cytokine pro-inflammatoire qui est impliquée dans l'immunité innée lorsque les animaux sont infectés par des pathogènes extracellulaires au niveau entre autres des voies respiratoires. Il joue un rôle de chimio-attractant pour les cellules immunitaires, par exemple, les neutrophiles (Murtaugh, *et al.*, 1996). De plus, la présence ou l'absence du VSRRP ne semble pas avoir d'impact sur cette

production. Par contre, le VSRRP induit la production d'INF- $\gamma$ . Cette production est augmentée lors qu'il y a co-infection avec *A. pleuropneumoniae* après 48 et 72 heures d'incubation avec les pathogènes (Figure 12). IFN- $\gamma$  est produit lorsque les cellules sont infectées avec un pathogène intracellulaire, comme un virus par exemple. Il joue un rôle majeur au niveau de l'immunité innée et acquise (Hennig-Pauka, *et al.*, 2006). L'augmentation de la production d'interférons lors de co-infection a déjà été observée pour d'autres types de co-infection (Pinto, *et al.*, 2000, Chang, *et al.*, 2005). Il est important de souligner que les lignées utilisées pour nos expériences sont des lignées cellulaires qui ne sont pas d'origine porcine. Les anticorps utilisés pour faire ces tests sont des anticorps détectant les cytokines de porcs. Cela peut avoir joué un rôle dans les résultats obtenus.

L'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* sur les cellules n'est pas modifiée lorsqu'il y a pré-infection avec le VSRRP (Figure 13). Il se peut que le VSRRP ne modifie pas les récepteurs auxquels s'attachent *A. pleuropneumoniae*. *A. pleuropneumoniae* se fixe à des récepteurs lipidiques ou protéiniques (Abul-Milh, *et al.*, 1999, Van Overbeke, *et al.*, 2002, Boekema, *et al.*, 2003, Jeannotte, *et al.*, 2003). Donc, le VSRRP ne modifie pas ces récepteurs puisqu'*A. pleuropneumoniae* conserve sa capacité d'adhérer aux cellules. Il a été démontré que certains pathogènes modifient le récepteur d'un deuxième pathogène, modifiant ainsi l'infectivité du deuxième pathogène. C'est le cas lorsqu'il y a co-infection avec le virus épidémique de la diarrhée porcine (PEDV) et la bactérie *Chlamydia trachomatis* (Borel, *et al.*, 2010). Le virus causera une diminution de la présence des récepteurs permettant la création de syncytia et cela rendra la bactérie persistante. Une co-infection de monocytes avec le virus HIV-1 et *Trypanosoma cruzi* diminue l'infection d'HIV-1; cela serait causé par une diminution de co-récepteurs d'HIV-1 à la surface des cellules (Andreani, *et al.*, 2009). Les résultats obtenus lors de tests d'adhérence de la bactérie *A. pleuropneumoniae* sur des cellules pré-infectées avec le VSRRP démontrent qu'il n'y aurait pas de changement au niveau de l'adhérence. Par contre, comme il n'a pas été possible de déterminer si les bactéries se fixent préférentiellement aux cellules infectées par le VSRRP ou les cellules non infectées, il n'est pas possible de conclure définitivement que le VSRRP n'a pas d'influence sur l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae*.

En résumé, une pré-infection au VSRRP suivie d'une infection bactérienne induit une plus grande mort cellulaire et une plus grande production d'IFN- $\gamma$ . De plus, les expériences ont démontré que les lignées cellulaires MARC-145 et SJPL semblent avoir les mêmes caractéristiques lors d'infection soit avec le VSRRP ou *A. pleuropneumoniae* ou d'une pré-infection avec le VSRRP suivie d'une infection avec *A. pleuropneumoniae*. Il serait maintenant intéressant de poursuivre les travaux afin de déterminer les mécanismes impliqués lors de la co-infection.

Les études *in vitro* déterminent souvent l'effet d'une pré-infection virale sur une infection bactérienne subséquente. Dans plusieurs cas il est évident que l'infection *in vivo* débute par le virus et que par la suite, il y a un deuxième pathogène soit viral, bactérien ou parasitaire. Par contre, quand cela n'est pas clairement démontré, les expériences de co-infection sont faites de manière simultanée, avec une pré-infection virale ou bien avec une pré-infection bactérienne. Les résultats obtenus peuvent être différents selon l'ordre des infections (Borel, *et al.*, 2010). Dans notre cas, il n'a pas été démontré clairement qu'*in vivo* le VSRRP était présent avant ou après l'infection bactérienne, nous avons donc également fait des expériences de pré-infection bactérienne suivie d'infection virale. Les cellules ont été infectées avec la bactérie *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ *apxIC* $\Delta$ *apxIIC*, car celle-ci est beaucoup moins toxique pour les cellules que la souche sauvage lors d'incubation prolongée. Fait intéressant, nos résultats ont démontré que le VSRRP IAF-Klop n'avait pas la même capacité d'infecter la lignée cellulaire SJPL lorsqu'il y avait une pré-infection bactérienne. Cela a été démontré par immunofluorescence (Figure 14), par la détermination du titre viral (Figure 16) ainsi que par des tests de cytotoxicité (Figure 15). Par contre, cela n'est pas observé avec la lignée cellulaire MARC-145 où la réplication du virus est beaucoup moins influencée par la présence de la bactérie. Dans plusieurs cas de co-infection étudiés, il arrive qu'un des pathogènes diminue la capacité d'infection d'un second pathogène et ce par des mécanismes différents (Levy, *et al.*, 1990, Goletti, *et al.*, 1996, Asada, *et al.*, 1999, Pinto, *et al.*, 2000, Boudeau, *et al.*, 2003, Chang, *et al.*, 2005, Andreani, *et al.*, 2009). De plus, certaines études ont également démontré que la lignée cellulaire, la souche virale ou bactérienne, peuvent jouer un rôle dans l'inhibition de l'infection. Par exemple, il a été démontré que l'effet cytopathique est inhibé lors d'infection avec le VSRRP et le surnageant de PCV-2 (Chang, *et al.*, 2005). Par contre,

lorsqu'il y a ajout d'anticorps anti-IFN- $\alpha$  l'effet cytopathique est restauré chez la lignée cellulaire MARC-145, mais ce n'est pas le cas chez les macrophages alvéolaires. Des observations menant aux mêmes conclusions ont été obtenues lors de co-infections avec le virus de l'herpès humain de type 6 (HHV-6) et HIV-1 (Asada, *et al.*, 1999). Dans certains cas, le premier pathogène induit des cytokines qui permettent au système immunitaire de l'hôte d'éliminer le second pathogène ou du moins de diminuer sa virulence. C'est le cas avec l'IFN- $\alpha$  qui diminue le taux d'infection d'HIV-1 lorsqu'il y a co-infection avec le virus de l'influenza chez les PBMC (Pinto, *et al.*, 2000).

Pour essayer d'identifier quelle composante d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta apxIC\Delta apxIIC$  pouvait influencer la réplication du VSRRP, plusieurs tests ont été faits. Nous avons démontré que ni les molécules de la surface de la bactérie (Figure 16 et Annexe V), ni les LPS (Figure 16 et Annexe VI) ne jouaient un rôle dans la réplication virale, car une stimulation des cellules avec des bactéries inactivées ou des LPS purifiés ne modifie pas la réplication du virus chez les lignées cellulaires SJPL et MARC-145. Dans certains cas de co-infection, les LPS ou la bactérie inactivée jouaient un rôle dans la réplication du second pathogène (Chang, *et al.*, 2006, Deka, *et al.*, 2007). De plus, lorsque les cellules de la lignée cellulaire SJPL sont stimulées par le surnageant bactérien, il y a une diminution de la réplication du VSRRP chez ces cellules (Figure 16 et 18). Donc, selon nos données, *A. pleuropneumoniae*  $\Delta apxIC\Delta apxIIC$  sécrèterait une ou des molécule(s) dans le surnageant qui influencerait(aient) la réplication du virus. Nos résultats ont démontré que le métabolisme de la cellule est diminué en présence du surnageant bactérien, mais cela n'expliquerait pas le fait que le VSRRP ne peut pas se répliquer dans les cellules de la lignée cellulaire SJPL quand il y a présence du surnageant, car cette diminution est également observée chez la lignée cellulaire MARC-145 et que chez cette lignée, la présence du surnageant bactérien n'influence pas autant la réplication virale que chez la lignée cellulaire SJPL (Figure 17).

En conclusion, *A. pleuropneumoniae* sécrète une ou des molécule(s) qui empêche(ent) le VSRRP de se répliquer normalement dans la lignée cellulaire SJPL, mais cela ne se produit pas avec la lignée cellulaire MARC-145. Selon les résultats préliminaires obtenus cette ou ces molécule(s) aurait(aient) un faible poids moléculaire et serait(aient)

résistante(s) à la chaleur (Figure 19 et 20). Il faut donc poursuivre leur caractérisation. Une étude a démontré que lors de co-infection d'anneaux de la trachée de porcs avec *Pasteurella multocida* et *Bordetella bronchiseptica* il y avait une molécule de faible poids moléculaire sécrétée par *B. bronchiseptica* qui influençait l'adhérence de *P. multocida*. Cette molécule est un disaccharide-tétrapeptide de la paroi cellulaire (Dugal, *et al.*, 1992). Il serait donc intéressant de tester cette molécule avec notre modèle d'infection. Il serait également intéressant de fractionner davantage le filtrat par chromatographie afin de caractériser par spectroscopie de masse les fractions actives capables de bloquer la réplication du VSRRP. En continuant à chercher le mécanisme et les composantes permettant de bloquer la réplication du VSRRP, cela pourrait mener à la découverte de traitements plus efficaces contre les infections au VSRRP chez les porcs.

## **CONCLUSION**

Selon les résultats obtenus lors de ce projet, nous pouvons conclure que les modèles *in vitro* de co-infection avec le VSRRP et *A. pleuropneumoniae* sont de bons modèles pour étudier les interactions entre ces pathogènes. Les données obtenues avec une pré-infection du VSRRP, suivi d'une infection avec *A. pleuropneumoniae* ont démontré qu'il y avait interaction entre les deux pathogènes et les cellules, car nous avons observé par exemple une augmentation de la cytotoxicité. Il serait intéressant de pousser les analyses plus en profondeur pour comprendre les mécanismes déployés par le virus, la bactérie et la cellule dans un tel contexte. Par exemple, il serait intéressant de savoir si la bactérie s'attache préférentiellement sur des cellules infectées par le VSRRP ou les cellules saines lors de co-infection. Aussi, il serait intéressant de confirmer les résultats obtenus *in vitro* avec des expériences *in vivo*. Il a été démontré qu'une co-infection *in vivo* des porcs avec ces deux pathogènes n'aggravent pas la pathologie (Pol, *et al.*, 1997). De plus, il serait intéressant de voir si les gènes d'*A. pleuropneumoniae* sont exprimés différemment lorsque la bactérie infecte les cellules seule versus lors d'une co-infection.

Lors du projet, nous avons obtenu un résultat très intéressant. Lorsqu'on a pré-infecté les cellules avec *A. pleuropneumoniae*, il y avait une diminution de l'infection du VSRRP au niveau de la lignée cellulaire SJPL. Il y aurait une ou des molécule(s) relâchée(s) dans le milieu qui bloquerait(ent) la réplication du virus. Il serait donc intéressant d'identifier celle(s)-ci, car cela permettrait peut-être de développer un nouveau traitement contre le VSRRP. Il serait aussi intéressant de savoir si l'effet observé est bactérie et/ou virus spécifique.

Ce projet a permis d'identifier de nouvelles avenues de recherche afin de mieux comprendre les interactions entre différents pathogènes et les cellules de l'hôte ce qui pourrait aider au développement de nouveaux outils prophylactiques et thérapeutiques.

## **RÉFÉRENCES**

Abul-Milh M, Paradis SE, Dubreuil JD & Jacques M (1999) Binding of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lipopolysaccharides to glycosphingolipids evaluated by thin-layer chromatography. *Infection and Immunity* 67: 4983-4987.

Ajito T, Haga Y, Homma S, Goryo M & Okada K (1996) Immunohistological evaluation on respiratory lesions of pigs intranasally inoculated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Journal of Veterinary Medical Science* 58: 297-303.

Albina E (1997) Porcine reproductive and respiratory syndrome: ten years of experience (1986-1996) with this undesirable viral infection. *Veterinary Research* 28: 305-352.

Albina E, Carrat C & Charley B (1998) Interferon-alpha response to swine arterivirus (PoAV), the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 18: 485-490.

Allende R, Lewis TL, Lu Z, *et al.* (1999) North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. *Journal of General Virology* 80 : 307-315.

Allende R, Kutish GF, Laegreid W, *et al.* (2000) Mutations in the genome of porcine reproductive and respiratory syndrome virus responsible for the attenuation phenotype. *Archives of Virology* 145: 1149-1161.

Allison CP, Marr AL, Berry NL, *et al.* (2006) Effects of halothane sensitivity on mobility status and blood metabolites of HAL-1843-normal pigs after rigorous handling. *Journal of Animal Science* 84: 1015-1021.

Altman E, Brisson JR & Perry MB (1986) Structure of the O-chain of the lipopolysaccharide of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 1. *Biochemistry and Cell Biology* 64: 1317-1325.

Andreani G, Celentano AM, Solana ME, Cazorla SI, Malchiodi EL, Martinez Peralta LA & Dolcini GL (2009) Inhibition of HIV-1 replication in human monocyte-derived macrophages by parasite *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE* 4: e8246.

Ansari IH, Kwon B, Osorio FA & Pattnaik AK (2006) Influence of N-linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies. *Journal of Virology* 80: 3994-4004.

Archambault M, Rioux S & Jacques M (1999) Evaluation of the hemoglobin-binding activity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* using fluorescein-labeled pig hemoglobin and flow cytometry. *FEMS Microbiology Letters* 173: 17-25.

Asada H, Klaus-Kovtun V, Golding H, Katz SI & Blauvelt A (1999) Human herpesvirus 6 infects dendritic cells and suppresses human immunodeficiency virus type 1 replication in coinfecting cultures. *Journal of Virology* 73: 4019-4028.

- Auger E, Deslandes V, Ramjeet M, *et al.* (2009) Host-pathogen interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with porcine lung and tracheal epithelial cells. *Infection and Immunity* 77: 1426-1441.
- Baarsch MJ, Foss DL & Murtaugh MP (2000) Pathophysiologic correlates of acute porcine pleuropneumonia. *American Journal of Veterinary Research* 61: 684-690.
- Baarsch MJ, Scamurra RW, Burger K, Foss DL, Maheswaran SK & Murtaugh MP (1995) Inflammatory cytokine expression in swine experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity* 63: 3587-3594.
- Balaji R, Wright KJ, Turner JL, *et al.* (2002) Circulating cortisol, tumor necrosis factor- $\alpha$  interleukin-1 $\beta$ , and interferon- $\gamma$  in pigs infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Journal of animal science* 80: 202-207.
- Baltes N, Hennig-Pauka I & Gerlach GF (2002) Both transferrin binding proteins are virulence factors in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 infection. *FEMS Microbiology Letters* 209: 283-287.
- Baltes N, Tonpitak W, Gerlach GF, Hennig-Pauka I, Hoffmann-Moujahid A, Ganter M & Rothkotter HJ (2001) *Actinobacillus pleuropneumoniae* iron transport and urease activity: effects on bacterial virulence and host immune response. *Infection and Immunity* 69: 472-478.
- Bane D, Neumann E, Hall W, Harlin K & Slife L (1992) PRRS associated with fumonisin contamination of feed. *American Association of Swine Practitioners Newsletter* 4: 22-23.
- Barfoed AM, Blixenkroner-Møller M, Jensen MH, Botner A & Kamstrup S (2004) DNA vaccination of pigs with open reading frame 1-7 of PRRS virus. *Vaccine* 22: 3628-3641.
- Bastos RG, Dellagostin OA, Barletta RG, Doster AR, Nelson E, Zuckermann F & Osorio FA (2004) Immune response of pigs inoculated with Mycobacterium bovis BCG expressing a truncated form of GP5 and M protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* 22: 467-474.
- Bautista EM & Molitor TW (1997) Cell-mediated immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine. *Viral Immunology* 10: 83-94.
- Bautista EM, Suarez P & Molitor TW (1999) T cell responses to the structural polypeptides of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Archives of Virology* 144: 117-134.
- Bautista EM, Faaberg KS, Mickelson D & McGruder ED (2002) Functional properties of the predicted helicase of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 298: 258-270.
- Beck M, van den Bosch JF, Jongenelen IM, Loeffen PL, Nielsen R, Nicolet J & Frey J (1994) RTX toxin genotypes and phenotypes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* field strains. *Journal of Clinical Microbiology* 32: 2749-2754.

- Bélanger M, Begin C & Jacques M (1995) Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infection and Immunity* 63: 656-662.
- Benfield DA, Nelson E, Collins JE, *et al.* (1992) Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 4: 127-133.
- Benga L, Hoeltig D, Rehm T, Rothkoetter HJ, Pabst R & Valentin-Weigand P (2009) Expression levels of immune markers in *Actinobacillus pleuropneumoniae* infected pigs and their relation to breed and clinical symptoms. *BMC Veterinary Research* 5: 13.
- Bertram TA (1985) Quantitative morphology of peracute pulmonary lesions in swine induced by *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Veterinary Pathology* 22: 598-609.
- Bertram TA (1988) Pathobiology of Acute Pulmonary Lesions in Swine Infected with *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae*. *Canadian Veterinary Journal* 29: 574-577.
- Beura LK, Sarkar SN, Kwon B, Subramaniam S, Jones C, Pattnaik AK & Osorio FA (2010) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1beta modulates host innate immune response by antagonizing IRF3 activation. *Journal of Virology* 84: 1574-1584.
- Beyer J, Fichtner D, Schirrmeier H, Polster U, Weiland E & Wege H (2000) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): kinetics of infection in lymphatic organs and lung. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 47: 9-25.
- Bilinski T (1991) Oxygen toxicity and microbial evolution. *Biosystems* 24: 305-312.
- Bilodeau R, Dea S, Sauvageau RA & Martineau GP (1991) 'Porcine reproductive and respiratory syndrome' in Quebec. *Veterinary Record* 129: 102-103.
- Blackall PJ, Klaasen HL, van den Bosch H, Kuhnert P & Frey J (2002) Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Veterinary Microbiology* 84: 47-52.
- Bloemraad M, de Kluijver EP, Petersen A, Burkhardt GE & Wensvoort G (1994) Porcine reproductive and respiratory syndrome: temperature and pH stability of Lelystad virus and its survival in tissue specimens from viraemic pigs. *Veterinary Microbiology* 42: 361-371.
- Boekema BK, Stockhofe-Zurwieden N, Smith HE, Kamp EM, van Putten JP & Verheijden JH (2003) Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to primary cultures of porcine lung epithelial cells. *Veterinary Microbiology* 93: 133-144.
- Borel N, Dumrese C, Ziegler U, Schifferli A, Kaiser C & Pospischil A (2010) Mixed infections with Chlamydia and porcine epidemic diarrhea virus - a new in vitro model of chlamydial persistence. *BMC Microbiology* 10: 201.

- Bossé JT & MacInnes JI (2000) Urease activity may contribute to the ability of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to establish infection. *Canadian Journal of Veterinary Research* 64: 145-150.
- Bossé JT, Janson H, Sheehan BJ, Beddek AJ, Rycroft AN, Kroll JS & Langford PR (2002) *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes and Infection* 4: 225-235.
- Botner A, Strandbygaard B, Sorensen KJ, Have P, Madsen KG, Madsen ES & Alexandersen S (1997) Appearance of acute PRRS-like symptoms in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine. *Veterinary Record* 141: 497-499.
- Boudeau J, Glasser AL, Julien S, Colombel JF & Darfeuille-Michaud A (2003) Inhibitory effect of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive *E. coli* strains isolated from patients with Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 18: 45-56.
- Boyen F, Eeckhaut V, Van Immerseel F, Pasmans F, Ducatelle R & Haesebrouck F (2009) Quorum sensing in veterinary pathogens: mechanisms, clinical importance and future perspectives. *Veterinary Microbiology* 135: 187-195.
- Brierley I (1995) Ribosomal frameshifting viral RNAs. *Journal of General Virology* 76: 1885-1892.
- Brisson JR, Crawford E, Uhrin D, Khieu NH, Perry MB, Severn WB & Richards JC (2002) The core oligosaccharic component from *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* serotype A1 lipopolysaccharide contains L-glycero-D-manno- and D-glycero-D-manno-heptoses: Analysis of the structure and conformation by high-resolution NMR spectroscopy. *Canadian Journal of Chemistry* 80: 949-963.
- Brockmeier SL, Palmer MV, Bolin SR & Rimler RB (2001) Effects of intranasal inoculation with *Bordetella bronchiseptica*, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, or a combination of both organisms on subsequent infection with *Pasteurella multocida* in pigs. *American Journal of Veterinary Research* 62: 521-525.
- Butler JE, Wertz N, Weber P & Lager KM (2008) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus subverts repertoire development by proliferation of germline-encoded B cells of all isotypes bearing hydrophobic heavy chain CDR3. *Journal of Immunology* 180: 2347-2356.
- Calvert JG, Sheppard MG & Welch S-KW (2003) Infection cDNA clone of North American porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and uses thereof. *US Patent Application* 20,030,157,689.
- Calvert JG, Slade DE, Shields SL, Jolie R, Mannan RM, Ankenbauer RG & Welch SK (2007) CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Journal of Virology* 81: 7371-7379.

Cancel-Tirado SM & Yoon KJ (2003) Antibody dependent enhancement of virus infection and disease. *Viral Immunology* 16: 69-86.

Cancel-Tirado SM, Evans RB & Yoon KJ (2004) Monoclonal antibody analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus epitopes associated with antibody-dependent enhancement and neutralization of virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 102: 249-262.

Cavanagh D (1997) *Nidovirales*: a new order comprising *Coronaviridae* and *Arteriviridae*. *Archives of Virology* 142: 629-633.

Chang HC, Peng YT, Chang HL, Chaung HC & Chung WB (2008) Phenotypic and functional modulation of bone marrow-derived dendritic cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Microbiology* 129: 281-293.

Chang HW, Pang VF, Chen LJ, Chia MY, Tsai YC & Jeng CR (2006) Bacterial lipopolysaccharide induces porcine circovirus type 2 replication in swine alveolar macrophages. *Veterinary Microbiology* 115: 311-319.

Chang HW, Jeng CR, Liu JJ, *et al.* (2005) Reduction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in swine alveolar macrophages by porcine circovirus 2 (PCV2)-induced interferon-alpha. *Veterinary Microbiology* 108: 167-177.

Chang HW, Jeng CR, Lin CM, *et al.* (2007) The involvement of Fas/FasL interaction in porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus co-inoculation-associated lymphocyte apoptosis in vitro. *Veterinary Microbiology* 122: 72-82.

Chang YF, Shi J, Ma DP, Shin SJ & Lein DH (1993) Molecular analysis of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX toxin-III gene cluster. *DNA and Cell Biology* 12: 351-362.

Charerntantanakul W, Platt R, Johnson W, Roof M, Vaughn E & Roth JA (2006) Immune responses and protection by vaccine and various vaccine adjuvant candidates to virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 109: 99-115.

Chen Z, Lawson S, Sun Z, *et al.* (2010) Identification of two auto-cleavage products of nonstructural protein 1 (nsp1) in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infected cells: nsp1 function as interferon antagonist. *Virology* 398: 87-97.

Chiers K, van Overbeke I, De Laender P, Ducatelle R, Carel S & Haesebrouck F (1998) Effects of endobronchial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 of pigs vaccinated with inactivated vaccines containing the Apx toxins. *Veterinary Quarterly* 20: 65-69.

Chin N, Frey J, Chang CF & Chang YF (1996) Identification of a locus involved in the utilization of iron by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiology Letters* 143: 1-6.

- Cho WS & Chae C (2001) Expression of the apxIV gene in pigs naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Journal of Comparative Pathology* 125: 34-40.
- Cho WS & Chae C (2002) Expression of nitric oxide synthase 2 and tumor necrosis factor alpha in swine naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Pathology* 39: 27-32.
- Choi C & Chae C (2002) Expression of tumour necrosis factor-alpha is associated with apoptosis in lungs of pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Research in Veterinary Science* 72: 45-49.
- Choi YK, Goyal SM & Joo HS (2003) Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs. *Canadian Veterinary Journal* 44: 735-737.
- Christianson WT (1992) Stillbirths, mummies, abortions, and early embryonic death. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 8: 623-639.
- Christianson WT, Choi CS, Collins JE, Molitor TW, Morrison RB & Joo HS (1993) Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses. *Canadian Journal of Veterinary Research* 57: 262-268.
- Collins JE, Benfield DA, Christianson WT, *et al.* (1992) Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 4: 117-126.
- Costers S, Delputte PL & Nauwynck HJ (2006) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected alveolar macrophages contain no detectable levels of viral proteins in their plasma membrane and are protected against antibody-dependent, complement-mediated cell lysis. *Journal of General Virology* 87: 2341-2351.
- Costers S, Lefebvre DJ, Delputte PL & Nauwynck HJ (2008) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus modulates apoptosis during replication in alveolar macrophages. *Archives of Virology* 153: 1453-1465.
- Crujisen TL, Van Leengoed LA, Dekker-Nooren TC, Schoevers EJ & Verheijden JH (1992) Phagocytosis and killing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes isolated from pigs. *Infection and Immunity* 60: 4867-4871.
- Daban M, Medrano A & Querol E (1996) Cloning, sequencing and expression of the transferrin-binding protein 1 gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Biochemical Journal* 315: 257-264.
- Das PB, Dinh PX, Ansari IH, de Lima M, Osorio FA & Pattnaik AK (2010) The minor envelope glycoproteins GP2a and GP4 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus interact with the receptor CD163. *Journal of Virology* 84: 1731-1740.

de Lima M, Pattnaik AK, Flores EF & Osorio FA (2006) Serologic marker candidates identified among B-cell linear epitopes of Nsp2 and structural proteins of a North American strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 353: 410-421.

de Lima M, Kwon B, Ansari IH, Pattnaik AK, Flores EF & Osorio FA (2008) Development of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus differentiable (DIVA) strain through deletion of specific immunodominant epitopes. *Vaccine* 26: 3594-3600.

Dee S, Otake S, Oliveira S & Deen J (2009) Evidence of long distance airborne transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Research Communications* 40: 39.

Deka S, Vanover J, Sun J, Kintner J, Whittimore J & Schoborg RV (2007) An early event in the herpes simplex virus type-2 replication cycle is sufficient to induce Chlamydia trachomatis persistence. *Cellular Microbiology* 9: 725-737.

Delputte PL & Nauwynck HJ (2004) Porcine arterivirus infection of alveolar macrophages is mediated by sialic acid on the virus. *Journal of Virology* 78: 8094-8101.

Delputte PL, Costers S & Nauwynck HJ (2005) Analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization: distinctive roles for heparan sulphate and sialoadhesin. *Journal of General Virology* 86: 1441-1445.

Delputte PL, Vanderheijden N, Nauwynck HJ & Pensaert MB (2002) Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages. *Journal of Virology* 76: 4312-4320.

Delputte PL, Meerts P, Costers S & Nauwynck HJ (2004) Effect of virus-specific antibodies on attachment, internalization and infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in primary macrophages. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 102: 179-188.

Delputte PL, Van Breedam W, Barbe F, Van Reeth K & Nauwynck HJ (2007) IFN-alpha treatment enhances porcine *Arterivirus* infection of monocytes via upregulation of the porcine Arterivirus receptor sialoadhesin. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 27: 757-766.

Delputte PL, Van Breedam W, Delrue I, Oetke C, Crocker PR & Nauwynck HJ (2007) Porcine arterivirus attachment to the macrophage-specific receptor sialoadhesin is dependent on the sialic acid-binding activity of the N-terminal immunoglobulin domain of sialoadhesin. *Journal of Virology* 81: 9546-9550.

den Boon JA, Snijder EJ, Chirnside ED, de Vries AA, Horzinek MC & Spaan WJ (1991) Equine arteritis virus is not a togavirus but belongs to the coronaviruslike superfamily. *Journal of Virology* 65: 2910-2920.

den Boon JA, Faaberg KS, Meulenbergh JJ, Wassenaar AL, Plagemann PG, Gorbalenya AE & Snijder EJ (1995) Processing and evolution of the N-terminal region of the arterivirus

- replicase ORF1a protein: identification of two papainlike cysteine proteases. *Journal of Virology* 69: 4500-4505.
- Deneer HG & Potter AA (1989) Effect of iron restriction on the outer membrane proteins of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity* 57: 798-804.
- Deslandes V, Nash JH, Harel J, Coulton JW & Jacques M (2007) Transcriptional profiling of *Actinobacillus pleuropneumoniae* under iron-restricted conditions. *BMC Genomics* 8: 72.
- Deslandes V, Denicourt M, Girard C, Harel J, Nash JH & Jacques M (2010) Transcriptional profiling of *Actinobacillus pleuropneumoniae* during the acute phase of a natural infection in pigs. *BMC Genomics* 11: 98.
- Devenish J, Rosendal S & Bosse JT (1990) Humoral antibody response and protective immunity in swine following immunization with the 104-kilodalton hemolysin of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity* 58: 3829-3832.
- Dewey CE, Wilson S, Buck P & Leyenaar JK (2004) Effects of porcine reproductive and respiratory syndrome vaccination in breeding-age animals. *Preventive Veterinary Medicine* 62: 299-307.
- Diaz I, Darwich L, Pappaterra G, Pujols J & Mateu E (2006) Different European-type vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus have different immunological properties and confer different protection to pigs. *Virology* 351: 249-259.
- Dom P, Haesebrouck F & De Baetselier P (1992) Stimulation and suppression of the oxygenation activity of porcine pulmonary alveolar macrophages by *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its metabolites. *American Journal of Veterinary Research* 53: 1113-1118.
- Dom P, Haesebrouck F, Kamp EM & Smits MA (1992) Influence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 and its cytolytins on porcine neutrophil chemiluminescence. *Infection and Immunity* 60: 4328-4334.
- Donlan RM & Costerton JW (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Review* 15: 167-193.
- Du Y, Zuckermann FA & Yoo D (2010) Myristoylation of the small envelope protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus is non-essential for virus infectivity but promotes its growth. *Virus Research* 147: 294-299.
- Duan X, Nauwynck HJ & Pensaert MB (1997) Effects of origin and state of differentiation and activation of monocytes/macrophages on their susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Archives of Virology* 142: 2483-2497.

Dubreuil JD, Jacques M, Mittal KR & Gottschalk M (2000) *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. *Animal Health Research Reviews* 1: 73-93.

Dugal F, Belanger M & Jacques M (1992) Enhanced adherence of *Pasteurella multocida* to porcine tracheal rings preinfected with *Bordetella bronchiseptica*. *Canadian Journal of Veterinary Research* 56: 260-264.

Faaberg KS & Plagemann PG (1997) ORF 3 of lactate dehydrogenase-elevating virus encodes a soluble, nonstructural, highly glycosylated, and antigenic protein. *Virology* 227: 245-251.

Fang Y, Kim DY, Ropp S, Steen P, Christopher-Hennings J, Nelson EA & Rowland RR (2004) Heterogeneity in Nsp2 of European-like porcine reproductive and respiratory syndrome viruses isolated in the United States. *Virus Research* 100: 229-235.

Fitter S, Sincock PM, Jolliffe CN & Ashman LK (1999) Transmembrane 4 superfamily protein CD151 (PETA-3) associates with beta 1 and alpha IIB beta 3 integrins in haemopoietic cell lines and modulates cell-cell adhesion. *Biochemical Journal* 338: 61-70.

Flores-Mendoza L, Silva-Campa E, Resendiz M, Osorio FA & Hernandez J (2008) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infects mature porcine dendritic cells and up-regulates interleukin-10 production. *Canadian Journal of Veterinary Research* 15: 720-725.

Foote SJ, Bosse JT, Bouevitch AB, Langford PR, Young NM & Nash JH (2008) The complete genome sequence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* L20 (serotype 5b). *Journal of Bacteriology* 190: 1495-1496.

Fossum C, Watrang E, Fuxler L, Jensen KT & Wallgren P (1998) Evaluation of various cytokines (IL-6, IFN-alpha, IFN-gamma, TNF-alpha) as markers for acute bacterial infection in swine--a possible role for serum interleukin-6. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 64: 161-172.

Frey J (1995) Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends in Microbiology* 3: 257-261.

Frey J & Nicolet J (1988) Regulation of hemolysin expression in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 by Ca<sup>2+</sup>. *Infection and Immunity* 56: 2570-2575.

Frey J & Nicolet J (1990) Hemolysin patterns of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology* 28: 232-236.

Frey J & Nicolet J (1991) Immunological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* hemolysin I. *Veterinary Microbiology* 28: 61-73.

Frey J, Kuhn R & Nicolet J (1994) Association of the CAMP phenomenon in *Actinobacillus pleuropneumoniae* with the RTX toxins ApxI, ApxII and ApxIII. *FEMS Microbiology Letters* 124: 245-251.

- Frey J, van den Bosch H, Segers R & Nicolet J (1992) Identification of a second hemolysin (HlyII) in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 and expression of the gene in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 60: 1671-1676.
- Frey J, Beck M, Stucki U & Nicolet J (1993) Analysis of hemolysin operons in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Gene* 123: 51-58.
- Frey J, Haldimann A, Nicolet J, Boffini A & Prentki P (1994) Sequence analysis and transcription of the apxI operon (hemolysin I) from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Gene* 142: 97-102.
- Frey J, Bosse JT, Chang YF, *et al.* (1993) *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of haemolysins, cytolysins, pleurotoxin and their genes. *Journal of General Microbiology* 139: 1723-1728.
- Frey J, Beck, M., Nicolet, J. (1994) Bacterial Protein Toxins. Gustav Fischer, Freer Jea. pp. 322-332.
- Fuller CA, Yu R, Irwin SW & Schryvers AB (1998) Biochemical evidence for a conserved interaction between bacterial transferrin binding protein A and transferrin binding protein B. *Microbial Pathogenesis* 24: 75-87.
- Fuller TE, Martin S, Teel JF, Alaniz GR, Kennedy MJ & Lowery DE (2000) Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence genes using signature-tagged mutagenesis in a swine infection model. *Microbial Pathogenesis* 29: 39-51.
- Furesz SE, Mallard BA, Bosse JT, Rosendal S, Wilkie BN & MacInnes JI (1997) Antibody- and cell-mediated immune responses of *Actinobacillus pleuropneumoniae*-infected and bacterin-vaccinated pigs. *Infection and Immunity* 65: 358-365.
- Gagnon CA, Lachapelle G, Langelier Y, Massie B & Dea S (2003) Adenoviral-expressed GP5 of porcine respiratory and reproductive syndrome virus differs in its cellular maturation from the authentic viral protein but maintains known biological functions. *Archives of Virology* 148: 951-972.
- Garcia-Cuellar C, Montanez C, Tenorio V, *et al.* (2000) A 24-kDa cloned zinc metalloprotease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* is common to all serotypes and cleaves actin *in vitro*. *Canadian Journal of Veterinary Research* 64: 88-95.
- Genini S, Delputte PL, Malinverni R, Cecere M, Stella A, Nauwynck HJ & Giuffra E (2008) Genome-wide transcriptional response of primary alveolar macrophages following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of General Virology* 89: 2550-2564.
- Gerlach GF, Klashinsky S, Anderson C, Potter AA & Willson PJ (1992) Characterization of two genes encoding distinct transferrin-binding proteins in different *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. *Infection and Immunity* 60: 3253-3261.

- Gerlach GF, Anderson C, Potter AA, Klashinsky S & Willson PJ (1992) Cloning and expression of a transferrin-binding protein from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity* 60: 892-898.
- Godeny EK, Chen L, Kumar SN, Methven SL, Koonin EV & Brinton MA (1993) Complete genomic sequence and phylogenetic analysis of the lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV). *Virology* 194: 585-596.
- Goletti D, Weissman D, Jackson RW, *et al.* (1996) Effect of *Mycobacterium tuberculosis* on HIV replication. Role of immune activation. *Journal of Immunology* 157: 1271-1278.
- Gonin P, Pirzadeh B, Gagnon CA & Dea S (1999) Seroneutralization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus correlates with antibody response to the GP5 major envelope glycoprotein. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 11: 20-26.
- Gonin P, Mardassi H, Gagnon CA, Massie B & Dea S (1998) A nonstructural and antigenic glycoprotein is encoded by ORF3 of the IAF-Klop strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Archives of Virology* 143: 1927-1940.
- Gonzalez GC, Yu RH, Rosteck PR, Jr. & Schryvers AB (1995) Sequence, genetic analysis, and expression of *Actinobacillus pleuropneumoniae* transferrin receptor genes. *Microbiology* 141: 2405-2416.
- Gorbalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP & Blinov VM (1989) Coronavirus genome: prediction of putative functional domains in the non-structural polyprotein by comparative amino acid sequence analysis. *Nucleic Acids Research* 17: 4847-4861.
- Gorbalenya AE, Enjuanes L, Ziebuhr J & Snijder EJ (2006) Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. *Virus Research* 117: 17-37.
- Gottschalk M (2007) *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes, pathogenicity and virulence. American association of swine veterinarians, Orlando, Florida, États-Unis. pp. 381-384.
- Gouré J, Findlay WA, Deslandes V, *et al.* (2009) Microarray-based comparative genomic profiling of reference strains and selected Canadian field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *BMC Genomics* 10: 88.
- Gutierrez-Martin CB, Rodriguez-Delgado O, Alvarez-Nistal D, De La Puente-Redondo VA, Garcia-Rioja F, Martin-Vicente J & Rodriguez Ferri EF (2000) Simultaneous serological evidence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, PRRS, Aujeszky's disease and influenza viruses in Spanish finishing pigs. *Research in Veterinary Science* 68: 9-13.
- Gygi D, Nicolet J, Frey J, Cross M, Koronakis V & Hughes C (1990) Isolation of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* haemolysin gene and the activation and secretion of the prohaemolysin by the HlyC, HlyB and HlyD proteins of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 4: 123-128.

Habrun B BV, Cvetnic Z, Humski A, Benic M (2002) Porcine pleuropneumonia : the first evaluation of field efficacy of a subunit vaccine in Croatia. *Veterinary Medicine - Czech* 47: 213-218.

Haesebrouck F, Chiers K, Van Overbeke I & Ducatelle R (1997) *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Veterinary Microbiology* 58: 239-249.

Haesebrouck F, Van de Kerkhof A, Dom P, Chiers K & Ducatelle R (1996) Cross-protection between *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotypes-serotypes in pigs. *Veterinary Microbiology* 52: 277-284.

Haga Y, Ogino S, Ohashi S, Ajito T, Hashimoto K & Sawada T (1997) Protective efficacy of an affinity-purified hemolysin vaccine against experimental swine pleuropneumonia. *Journal of Veterinary Medical Science* 59: 115-120.

Halbur PG, Miller LD, Paul PS, Meng XJ, Huffman EL & Andrews JJ (1995) Immunohistochemical identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigen in the heart and lymphoid system of three-week-old colostrum-deprived pigs. *Veterinary Pathology* 32: 200-204.

Halbur PG, Paul PS, Meng XJ, Lum MA, Andrews JJ & Rathje JA (1996) Comparative pathogenicity of nine US porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in a five-week-old cesarean-derived, colostrum-deprived pig model. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 8: 11-20.

Harding JC, Baarsch MJ & Murtaugh MP (1997) Association of tumour necrosis factor and acute phase reactant changes with post arrival disease in swine. *Zentralblatt für Veterinärmedizin* 44: 405-413.

Hasegawa H, Nomura T, Kishimoto K, Yanagisawa K & Fujita S (1998) SFA-1/PETA-3 (CD151), a member of the transmembrane 4 superfamily, associates preferentially with alpha 5 beta 1 integrin and regulates adhesion of human T cell leukemia virus type 1-infected T cells to fibronectin. *Journal of Immunology* 161: 3087-3095.

Haynes JS, Halbur PG, Sirinarumitr T, Paul PS, Meng XJ & Huffman EL (1997) Temporal and morphologic characterization of the distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by in situ hybridization in pigs infected with isolates of PRRSV that differ in virulence. *Veterinary Pathology* 34: 39-43.

Hedges JF, Balasuriya UB & MacLachlan NJ (1999) The open reading frame 3 of equine arteritis virus encodes an immunogenic glycosylated, integral membrane protein. *Virology* 264: 92-98.

Hennig-Pauka I, Jacobsen I, Blecha F, Waldmann KH & Gerlach GF (2006) Differential proteomic analysis reveals increased cathelicidin expression in porcine bronchoalveolar lavage fluid after an *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Veterinary Research Communications* 37: 75-87.

- Hensel A, Windt H, Stockhofe-Zurwieden N, Lödding N, Koch W & Petzoldt K (1993) A porcine aerosol infection model for studying dose dependent effects caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* bacteria. *Journal of Aerosol Medicine* 6: 73-88.
- Herold J, Siddell S & Ziebuhr J (1996) Characterization of coronavirus RNA polymerase gene products. *Methods in Enzymology* 275: 68-89.
- Huang H, Potter AA, Campos M, Leighton FA, Willson PJ, Haines DM & Yates WD (1999) Pathogenesis of porcine *Actinobacillus pleuropneumoniae*, part II: roles of proinflammatory cytokines. *Canadian Journal of Veterinary Research* 63: 69-78.
- Huang H, Zhou R, Fan H, *et al.* (2006) Generation of monoclonal antibodies and epitope mapping of ApxIVA of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Molecular Immunology* 43: 2130-2134.
- Inzana TJ, Todd J, Ma JN & Veit H (1991) Characterization of a non-hemolytic mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5: role of the 110 kilodalton hemolysin in virulence and immunoprotection. *Microbial Pathogenesis* 10: 281-296.
- Inzana TJ, Ma J, Workman T, Gogolewski RP & Anderson P (1988) Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5. *Infection and Immunity* 56: 1880-1889.
- Jacques M (2004) Surface polysaccharides and iron-uptake systems of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Canadian Journal of Veterinary Research* 68: 81-85.
- Jansen R, Briaire J, Kamp EM, Gielkens AL & Smits MA (1993) Cloning and characterization of the *Actinobacillus pleuropneumoniae*-RTX-toxin III (ApxIII) gene. *Infection and Immunity* 61: 947-954.
- Jeannotte ME, Abul-Milh M, Dubreuil JD & Jacques M (2003) Binding of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to phosphatidylethanolamine. *Infection and Immunity* 71: 4657-4663.
- Jiang W, Jiang P, Wang X, Li Y & Du Y (2008) Enhanced immune responses of mice inoculated recombinant adenoviruses expressing GP5 by fusion with GP3 and/or GP4 of PRRS virus. *Virus Research* 136: 50-57.
- Jiang Y, Xiao S, Fang L, Yu X, Song Y, Niu C & Chen H (2006) DNA vaccines co-expressing GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) display enhanced immunogenicity. *Vaccine* 24: 2869-2879.
- Jobert JL, Savoye C, Cariolet R, Kobisch M & Madec F (2000) Experimental aerosol transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research* 64: 21-26.
- Johnson CR, Yu W & Murtaugh MP (2007) Cross-reactive antibody responses to nsp1 and nsp2 of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of General Virology* 88: 1184-1195.

- Jolie RA, Mulks MH & Thacker BJ (1995) Cross-protection experiments in pigs vaccinated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* subtypes 1A and 1B. *Veterinary Microbiology* 45: 383-391.
- Kamp EM, Popma JK, Anakotta J & Smits MA (1991) Identification of hemolytic and cytotoxic proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by use of monoclonal antibodies. *Infection and Immunity* 59: 3079-3085.
- Kamp EM, Vermeulen TM, Smits MA & Haagsma J (1994) Production of Apx toxins by field strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus suis*. *Infection and Immunity* 62: 4063-4065.
- Kamp EM, Stockhofe-Zurwieden N, van Leengoed LA & Smits MA (1997) Endobronchial inoculation with Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* leads to pleuropneumonia in pigs. *Infection and Immunity* 65: 4350-4354.
- Kaplan JB & Mulks MH (2005) Biofilm formation is prevalent among field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 108: 89-94.
- Kaplan JB, Velliyagounder K, Ragunath C, Rohde H, Mack D, Knobloch JK & Ramasubbu N (2004) Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. *Journal of Bacteriology* 186: 8213-8220.
- Katz JB, Shafer AL, Eernisse KA, Landgraf JG & Nelson EA (1995) Antigenic differences between European and American isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) are encoded by the carboxyterminal portion of viral open reading frame 3. *Veterinary Microbiology* 44: 65-76.
- Keffaber KK (1989) Reproductive failure of unknown etiology. *American Association of Swine Practitioners Newsletter* 1: 1-9.
- Key KF, Guenette DK, Yoon KJ, Halbur PG, Toth TE & Meng XJ (2003) Development of a heteroduplex mobility assay to identify field isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with nucleotide sequences closely related to those of modified live-attenuated vaccines. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 2433-2439.
- Kheyar A, Jabrane A, Zhu C, Cleroux P, Massie B, Dea S & Gagnon CA (2005) Alternative codon usage of PRRS virus ORF5 gene increases eucaryotic expression of GP(5) glycoprotein and improves immune response in challenged pigs. *Vaccine* 23: 4016-4022.
- Kim HS, Kwang J, Yoon IJ, Joo HS & Frey ML (1993) Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogenous subpopulation of MA-104 cell line. *Archives of Virology* 133: 477-483.

- Kim JK, Fahad AM, Shanmukhappa K & Kapil S (2006) Defining the cellular target(s) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus blocking monoclonal antibody 7G10. *Journal of Virology* 80: 689-696.
- Kim TS, Benfield DA & Rowland RR (2002) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced cell death exhibits features consistent with a nontypical form of apoptosis. *Virus Research* 85: 133-140.
- Kimman TG, Cornelissen LA, Moormann RJ, Rebel JM & Stockhofe-Zurwieden N (2009) Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccinology. *Vaccine* 27: 3704-3718.
- Kreutz LC & Ackermann MR (1996) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus enters cells through a low pH-dependent endocytic pathway. *Virus Research* 42: 137-147.
- Kroese MV, Zevenhoven-Dobbe JC, Bos-de Ruijter JN, Peeters BP, Meulenberg JJ, Cornelissen LA & Snijder EJ (2008) The nsp1alpha and nsp1 papain-like autoproteases are essential for porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA synthesis. *Journal of General Virology* 89: 494-499.
- Labarque G, Van Gucht S, Van Reeth K, Nauwynck H & Pensaert M (2003) Respiratory tract protection upon challenge of pigs vaccinated with attenuated porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines. *Veterinary Microbiology* 95: 187-197.
- Labarque G, Van Gucht S, Nauwynck H, Van Reeth K & Pensaert M (2003) Apoptosis in the lungs of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and associations with the production of apoptogenic cytokines. *Veterinary Research Communications* 34: 249-260.
- Labrie J, Pelletier-Jacques G, Deslandes V, Ramjeet M, Auger E, Nash JH & Jacques M (2010) Effects of growth conditions on biofilm formation by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Research* 41: 3.
- Langford PR, Loynds BM & Kroll JS (1996) Cloning and molecular characterization of Cu,Zn superoxide dismutase from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity* 64: 5035-5041.
- Lechtenberg KF, Shryock TR & Moore G (1994) Characterization of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* seeder pig challenge-exposure model. *American Journal of Veterinary Research* 55: 1703-1709.
- Lee C & Yoo D (2006) The small envelope protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus possesses ion channel protein-like properties. *Virology* 355: 30-43.
- Lee C, Bachand A, Murtaugh MP & Yoo D (2004) Differential host cell gene expression regulated by the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP4 and GP5 glycoproteins. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 102: 189-198.

- Lee SM & Kleiboeker SB (2007) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis through a mitochondria-mediated pathway. *Virology* 365: 419-434.
- Lee SM, Schommer SK & Kleiboeker SB (2004) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus field isolates differ in in vitro interferon phenotypes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 102: 217-231.
- Lévesque C, Gagnon CA & Jacques M (2009) Modèle cellulaire de co-infection avec le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin et *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Journée de la recherche, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada. Affiche #18, page 54.
- Lévesque C, Gagnon CA & Jacques M (2009) Increased cytotoxicité is observed following *in vitro* co-infection of cells with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Actinobacillus pleuropneumoniae*. International PRRS Symposium, Chicago, Illinois, États-Unis. Affiche # 28, p.109.
- Levy P, Marcellin P, Martinot-Peignoux M, Degott C, Nataf J & Benhamou JP (1990) Clinical course of spontaneous reactivation of hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 12: 570-574.
- Liggett AD, Harrison LR & Farrell RL (1987) Sequential study of lesion development in experimental *Haemophilus pleuropneumonia*. *Research in Veterinary Science* 42: 204-212.
- Liu JL, Chen X, Tan C, Guo Y, Chen Y & Fu SL (2009) *In vivo* induced RTX toxin ApxIVA is essential for the full virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 137: 282-289.
- Loemba HD, Mounir S, Mardassi H, Archambault D & Dea S (1996) Kinetics of humoral immune response to the major structural proteins of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Archives of Virology* 141: 751-761.
- Lone AG, Deslandes V, Nash JH, Jacques M & MacInnes JI (2009) Modulation of gene expression in *Actinobacillus pleuropneumoniae* exposed to bronchoalveolar fluid. *PLoS One* 4: e6139.
- Lone AG, Deslandes V, Nash JH, Jacques M & MacInnes JI (2009) malt knockout mutation invokes a stringent type gene-expression profile in *Actinobacillus pleuropneumoniae* in bronchoalveolar fluid. *BMC Microbiology* 9: 195.
- Lopez OJ, Oliveira MF, Garcia EA, Kwon BJ, Doster A & Osorio FA (2007) Protection against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection through passive transfer of PRRSV-neutralizing antibodies is dose dependent. *Clinical and Vaccine Immunology* 14: 269-275.
- Loula T (1991) Mystery pig Disease. *Agri-practice* 12: 23-34.

- Loving CL, Brockmeier SL & Sacco RE (2007) Differential type I interferon activation and susceptibility of dendritic cell populations to porcine arterivirus. *Immunology* 120: 217-229.
- MacDonald J & Rycroft AN (1992) Molecular cloning and expression of ptxA, the gene encoding the 120-kilodalton cytotoxin of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2. *Infection and Immunity* 60: 2726-2732.
- MacLean LL, Perry MB & Vinogradov E (2004) Characterization of the antigenic lipopolysaccharide O chain and the capsular polysaccharide produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 13. *Infection and immunity* 72: 5925-5930.
- Mardassi H, Mounir S & Dea S (1994) Identification of major differences in the nucleocapsid protein genes of a Quebec strain and European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of General Virology* 75 ( Pt 3): 681-685.
- Mardassi H, Mounir S & Dea S (1995) Molecular analysis of the ORFs 3 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Quebec reference strain. *Archives of Virology* 140: 1405-1418.
- Mardassi H, Massie B & Dea S (1996) Intracellular synthesis, processing, and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 221: 98-112.
- Mardassi H, Gonin P, Gagnon CA, Massie B & Dea S (1998) A subset of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP3 glycoprotein is released into the culture medium of cells as a non-virion-associated and membrane-free (soluble) form. *Journal of Virology* 72: 6298-6306.
- Marois C, Gottschalk M, Morvan H, Fablet C, Madec F & Kobisch M (2008) Experimental infection of SPF pigs with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 alone or in association with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 135: 283-291.
- Meehan BM, McNeilly F, Todd D, *et al.* (1998) Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *Journal of General Virology* 79: 2171-2179.
- Meeusen EN, Walker J, Peters A, Pastoret PP & Jungersen G (2007) Current status of veterinary vaccines. *Clinical Microbiology Reviews* 20: 489-510, table of contents.
- Meng XJ, Paul PS, Halbur PG & Lum MA (1995) Phylogenetic analyses of the putative M (ORF 6) and N (ORF 7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the U.S.A. and Europe. *Archives of Virology* 140: 745-755.
- Meng XJ, Paul PS, Halbur PG & Morozov I (1995) Sequence comparison of open reading frames 2 to 5 of low and high virulence United States isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of General Virology* 76: 3181-3188.

- Mengeling WL, Lager KM, Vorwald AC & Clouser DF (2003) Comparative safety and efficacy of attenuated single-strain and multi-strain vaccines for porcine reproductive and respiratory syndrome. *Veterinary Microbiology* 93: 25-38.
- Meulenberg JJ (2000) PRRSV, the virus. *Veterinary Research* 31: 11-21.
- Meulenberg JJ, de Meijer EJ & Moormann RJ (1993) Subgenomic RNAs of Lelystad virus contain a conserved leader-body junction sequence. *Journal of General Virology* 74: 1697-1701.
- Meulenberg JJ, Bos-de Ruijter JN, van de Graaf R, Wensvoort G & Moormann RJ (1998) Infectious transcripts from cloned genome-length cDNA of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Virology* 72: 380-387.
- Meulenberg JJ, Petersen-den Besten A, de Kluyver EP, Moormann RJ, Schaaper WM & Wensvoort G (1995) Characterization of structural proteins of Lelystad virus. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 380: 271-276.
- Meulenberg JJ, Petersen-den Besten A, De Kluyver EP, Moormann RJ, Schaaper WM & Wensvoort G (1995) Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology* 206: 155-163.
- Meulenberg JJ, Petersen den Besten A, de Kluyver E, van Nieuwstadt A, Wensvoort G & Moormann RJ (1997) Molecular characterization of Lelystad virus. *Veterinary Microbiology* 55: 197-202.
- Meulenberg JJ, van Nieuwstadt AP, van Essen-Zandbergen A, Bos-de Ruijter JN, Langeveld JP & Meloen RH (1998) Localization and fine mapping of antigenic sites on the nucleocapsid protein N of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with monoclonal antibodies. *Virology* 252: 106-114.
- Meulenberg JJ, Hulst MM, de Meijer EJ, *et al.* (1993) Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology* 192: 62-72.
- Michael FS, Brisson JR, Larocque S, *et al.* (2004) Structural analysis of the lipopolysaccharide derived core oligosaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2, 5a and the genome strain 5b. *Carbohydrate Research* 339: 1973-1984.
- Mikael LG, Pawelek PD, Labrie J, Sirois M, Coulton JW & Jacques M (2002) Molecular cloning and characterization of the ferric hydroxamate uptake (fhu) operon in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology* 148: 2869-2882.
- Miller LC & Fox JM (2004) Apoptosis and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 102: 131-142.

- Misinzo GM, Delputte PL & Nauwynck HJ (2008) Involvement of proteases in porcine reproductive and respiratory syndrome virus uncoating upon internalization in primary macrophages. *Veterinary Research Communications* 39: 55.
- Molitor TW, Leitner G, Choi C, Risdahl J, Rossow KD & Collins J (1992) Modulation of host immune responses by SIRS virus. *American Association of Swine Practitioners Newsletter* 4: 27-28.
- Montano M, Rarick M, Sebastiani P, Brinkmann P, Skefos J & Ericksen R (2006) HIV-1 burden influences host response to co-infection with *Neisseria gonorrhoeae in vitro*. *International Immunology* 18: 125-137.
- Murtaugh MP, Xiao Z & Zuckermann F (2002) Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Viral Immunology* 15: 533-547.
- Murtaugh MP, Baarsch MJ, Zhou Y, Scamurra RW & Lin G (1996) Inflammatory cytokines in animal health and disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 54: 45-55.
- Music N & Gagnon CA (2010) The role of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus structural and non-structural proteins in virus pathogenesis. *Animal Health Research Reviews* 11:135-163.
- Nauwynck HJ, Duan X, Favoreel HW, Van Oostveldt P & Pensaert MB (1999) Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor-mediated endocytosis. *Journal of General Virology* 80: 297-305.
- Negrete-Abascal E, Tenorio VR, Serrano JJ, Garcia C & de la Garza M (1994) Secreted proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 degrade porcine gelatin, hemoglobin and immunoglobulin A. *Canadian Journal of Veterinary Research* 58: 83-86.
- Nelsen CJ, Murtaugh MP & Faaberg KS (1999) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. *Journal of Virology* 73: 270-280.
- Nelson EA, Christopher-Hennings J, Drew T, Wensvoort G, Collins JE & Benfield DA (1993) Differentiation of U.S. and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology* 31: 3184-3189.
- Neumann EJ, Kliebenstein JB, Johnson CD, *et al.* (2005) Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 227: 385-392.
- Nielsen R (1984) *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes--cross protection experiments. *Nordisk Veterinaermedicin* 36: 221-234.

Niven D.F. LM (1988) V-Factor-dependent growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2. *International Journal of Systematic Bacteriology* 38.

Oleksiewicz MB & Nielsen J (1999) Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) on alveolar lung macrophage survival and function. *Veterinary Microbiology* 66: 15-27.

Oleksiewicz MB, Botner A & Normann P (2002) Porcine B-cells recognize epitopes that are conserved between the structural proteins of American- and European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of General Virology* 83: 1407-1418.

Oleksiewicz MB, Snijder EJ & Normann P (2004) Phage display of the Equine arteritis virus nsp1 ZF domain and examination of its metal interactions. *Journal of Virological Methods* 119: 159-169.

Oleksiewicz MB, Botner A, Toft P, Normann P & Storgaard T (2001) Epitope mapping porcine reproductive and respiratory syndrome virus by phage display: the nsp2 fragment of the replicase polyprotein contains a cluster of B-cell epitopes. *Journal of Virology* 75: 3277-3290.

Ostrowski M, Galeota JA, Jar AM, Platt KB, Osorio FA & Lopez OJ (2002) Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *Journal of Virology* 76: 4241-4250.

Pabst R & Binns RM (1994) The immune system of the respiratory tract in pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 43: 151-156.

Paton DJ, Brown IH, Edwards S & Wensvoort G (1991) 'Blue ear' disease of pigs. *Veterinary Record* 128: 617.

Pattison JH, Howell, D.G. et Elliot, J. (1957) A *haemophilus*-like organism isolated from pig lung and the associated pneumonic lesions. *Journal of Comparative Pathology* 67: 320-330.

Patton JB, Rowland RR, Yoo D & Chang KO (2009) Modulation of CD163 receptor expression and replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine macrophages. *Virus Research* 140: 161-171.

Payment P & Trudel M (1989) Isolement et identification des virus. *Manuel de techniques virologiques*, Presse de l'Université du Québec, St-Foy, Québec. pp. 350.

Pedersen KW, van der Meer Y, Roos N & Snijder EJ (1999) Open reading frame 1a-encoded subunits of the arterivirus replicase induce endoplasmic reticulum-derived double-membrane vesicles which carry the viral replication complex. *Journal of Virology* 73: 2016-2026.

Perry M.B., Altman E., Brisson J.R., Beynon L.M. & J.C. R (1990) Structural characteristics of the antigen capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in

the serological classification of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* strains. *Serodiagnosis and Immunotherapy in Infectious Disease* 4: 299-308.

Perry MB & MacLean LL (2004) Structural characterization of the antigenic O-polysaccharide in the lipopolysaccharide produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 14. *Carbohydrate Research* 339: 1399-1402.

Perry MB, MacLean LL & Vinogradov E (2005) Structural characterization of the antigenic capsular polysaccharide and lipopolysaccharide O-chain produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 15. *Biochemistry and cell biology* 83: 61-69.

Pinto LA, Blazevic V, Patterson BK, Mac Trubey C, Dolan MJ & Shearer GM (2000) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication prior to reverse transcription by influenza virus stimulation. *Journal of Virology* 74: 4505-4511.

Pirzadeh B & Dea S (1997) Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants. *Journal of General Virology* 78: 1867-1873.

Pirzadeh B & Dea S (1998) Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of General Virology* 79: 989-999.

Pirzadeh B, Gagnon CA & Dea S (1998) Genomic and antigenic variations of porcine reproductive and respiratory syndrome virus major envelope GP5 glycoprotein. *Canadian Journal of Veterinary Research* 62: 170-177.

Plagemann PG (2004) GP5 ectodomain epitope of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, strain Lelystad virus. *Virus Research* 102: 225-230.

Pol JM & Wagenaar F (1992) Morphogenesis of Lelystad virus in porcine lung alveolar macrophages. *American Association of Swine Practitioners Newsletter* 4: 29.

Pol JM, van Dijk JE, Wensvoort G & Terpstra C (1991) Pathological, ultrastructural, and immunohistochemical changes caused by Lelystad virus in experimentally induced infections of mystery swine disease (synonym: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS)). *Veterinary Quarterly* 13: 137-143.

Pol JM, van Leengoed LA, Stockhofe N, Kok G & Wensvoort G (1997) Dual infections of PRRSV/influenza or PRRSV/*Actinobacillus pleuropneumoniae* in the respiratory tract. *Veterinary Microbiology* 55: 259-264.

Qui HJ, Tian ZJ, Tong GZ, Zhou YJ, Ni JQ & Luo YZ (2005) Protective immunity induced by a recombinant pseudorabies virus expression the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in piglets. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 106: 309-319.

- Ramjeet M, Deslandes V, Goure J & Jacques M (2008) *Actinobacillus pleuropneumoniae* vaccines: from bacterins to new insights into vaccination strategies. *Animal Health Research Reviews* 9: 25-45.
- Ramjeet M, Cox AD, Hancock MA, Mourez M, Labrie J, Gottschalk M & Jacques M (2008) Mutation in the LPS outer core biosynthesis gene, galU, affects LPS interaction with the RTX toxins ApxI and ApxII and cytolytic activity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Molecular Microbiology* 70: 221-235.
- Reimer D, Frey J, Jansen R, Veit HP & Inzana TJ (1995) Molecular investigation of the role of ApxI and ApxII in the virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. *Microbial Pathogenesis* 18: 197-209.
- Rioux S, Galarneau C, Harel J, Kobisch M, Frey J, Gottschalk M & Jacques M (2000) Isolation and characterization of a capsule-deficient mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Microbial Pathogenesis* 28: 279-289.
- Rioux S, Galarneau C, Harel J, *et al.* (1999) Isolation and characterization of mini-Tn10 lipopolysaccharide mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Canadian Journal of Microbiology* 45: 1017-1026.
- Rodriguez MJ, Sarraseca J, Garcia J, Sanz A, Plana-Duran J & Ignacio Casal J (1997) Epitope mapping of the nucleocapsid protein of European and North American isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of General Virology* 78 : 2269-2278.
- Rogers RJ, Eaves LE, Blackall PJ & Truman KF (1990) The comparative pathogenicity of four serovars of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Australian Veterinary Journal* 67: 9-12.
- Rompato G, Ling E, Chen Z, Van Kruiningen H & Garmendia AE (2006) Positive inductive effect of IL-2 on virus-specific cellular responses elicited by a PRRSV-ORF7 DNA vaccine in swine. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 109: 151-160.
- Rosendal S, Boyd DA & Gilbride KA (1985) Comparative virulence of porcine *Haemophilus* bacteria. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 49: 68-74.
- Rossow KD, Morrison RB, Goyal SM, Singh GS & Collins JE (1994) Lymph node lesions in neonatal pigs congenitally exposed to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 6: 368-371.
- Rowland RR, Kervin R, Kuckleburg C, Sperlich A & Benfield DA (1999) The localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein to the nucleolus of infected cells and identification of a potential nucleolar localization signal sequence. *Virus Research* 64: 1-12.

- Rycroft AN & Cullen JM (1990) Complement resistance in *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infection of swine. *American Journal of Veterinary Research* 51: 1449-1453.
- Rycroft AN & Garside LH (2000) *Actinobacillus* species and their role in animal disease. *Veterinary Journal* 159: 18-36.
- Schaller A, Kuhn R, Kuhnert P, *et al.* (1999) Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology* 145: 2105-2116.
- Schwartz KJ (2004) Swine disease manual. Schwartz KJ, Perry, Iowa, USA. p.192.
- Seah JN & Kwang J (2004) Localization of linear cytotoxic and pro-apoptotic epitopes in RTX toxin ApxIII of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vaccine* 22: 1494-1497.
- Sebunya TN, Saunders JR & Osborne AD (1983) Dose response relationship of *Haemophilus pleuropneumoniae* aerosols in pigs. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 47: 54-56.
- Seo SH, Goloubeva O, Webby R & Webster RG (2001) Characterization of a porcine lung epithelial cell line suitable for influenza virus studies. *Journal of Virology* 75: 9517-9525.
- Serebrin S, Rosendal S, Valdivieso-Garcia A & Little PB (1991) Endothelial cytotoxicity of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Research in Veterinary Science* 50: 18-22.
- Shakarji L, Mikael LG, Srikumar R, Kobisch M, Coulton JW & Jacques M (2006) Fhva and HgbA, outer membrane proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: their role as virulence determinants. *Canadian Journal of Microbiology* 52: 391-396.
- Shanmukhappa K, Kim JK & Kapil S (2007) Role of CD151, A tetraspanin, in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Virology Journal* 4: 62.
- Shea RJ & Mulks MH (2002) *ohr*, encoding an organic hydroperoxide reductase, is an in vivo-induced gene in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity* 70: 794-802.
- Sheehan BJ, Langford PR, Rycroft AN & Kroll JS (2000) [Cu,Zn]-Superoxide dismutase mutants of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae* are unattenuated in infections of the natural host. *Infection and Immunity* 68: 4778-4781.
- Shen S, Kwang J, Liu W & Liu DX (2000) Determination of the complete nucleotide sequence of a vaccine strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and identification of the *Nsp2* gene with a unique insertion. *Archives of Virology* 145: 871-883.
- Shimizu M, Yamada S, Kawashima K, Ohashi S, Shimizu S & Ogawa T (1996) Changes of lymphocyte subpopulations in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 50: 19-27.

Shimizu M, Yamada S, Murakami Y, *et al.* (1994) Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus from Heko-Heko disease of pigs. *Journal of Veterinary Medical Science* 56: 389-391.

Shope RE (1964) Porcine contagious pleuropneumonia. I. Experimental transmission, etiology, and pathology. *Journal of Experimental Medicine* 119: 357-368.

Sibille Y & Reynolds HY (1990) Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *American Review of Respiratory Disease* 141: 471-501.

Sidibé M, Messier S, Lariviere S, Gottschalk M & Mittal KR (1993) Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the porcine upper respiratory tract as a complement to serological tests. *Canadian Journal of Veterinary Research* 57: 204-208.

Silversides DW, Music N, Jacques M, Gagnon CA & Webby R (2010) Investigation of the species origin of the St. Jude Porcine Lung epithelial cell line (SJPL) made available to researchers. *Journal of Virology* 84: 5454-5455.

Sincock PM, Fitter S, Parton RG, Berndt MC, Gamble JR & Ashman LK (1999) PETA-3/CD151, a member of the transmembrane 4 superfamily, is localised to the plasma membrane and endocytic system of endothelial cells, associates with multiple integrins and modulates cell function. *Journal of Cell Science* 112: 833-844.

Sirinarumitr T, Zhang Y, Kluge JP, Halbur PG & Paul PS (1998) A pneumo-virulent United States isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis in bystander cells both *in vitro* and *in vivo*. *Journal of General Virology* 79: 2989-2995.

Snijder EJ & Meulenberg JJ (1998) The molecular biology of arteriviruses. *Journal of general virology* 79: 961-979.

Snijder EJ, Wassenaar AL & Spaan WJ (1994) Proteolytic processing of the replicase ORF1a protein of equine arteritis virus. *Journal of Virology* 68: 5755-5764.

Snijder EJ, van Tol H, Roos N & Pedersen KW (2001) Non-structural proteins 2 and 3 interact to modify host cell membranes during the formation of the arterivirus replication complex. *Journal of General Virology* 82: 985-994.

Snijder EJ, van Tol H, Pedersen KW, Raamsman MJ & de Vries AA (1999) Identification of a novel structural protein of arteriviruses. *Journal of Virology* 73: 6335-6345.

Spilman MS, Welbon C, Nelson E & Dokland T (2009) Cryo-electron tomography of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: organization of the nucleocapsid. *Journal of General Virology* 90: 527-535.

Srikumar R, Mikael LG, Pawelek PD, Khamessan A, Gibbs BF, Jacques M & Coulton JW (2004) Molecular cloning of haemoglobin-binding protein HgbA in the outer membrane of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology* 150: 1723-1734.

St Michael F, Li J & Cox AD (2005) Structural analysis of the core oligosaccharide from *Pasteurella multocida* strain X73. *Carbohydrate Research* 340: 1253-1257.

Suarez P, Diaz-Guerra M, Prieto C, Esteban M, Castro JM, Nieto A & Ortin J (1996) Open reading frame 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as a cause of virus-induced apoptosis. *Journal of Virology* 70: 2876-2882.

Sur JH, Cooper VL, Galeota JA, Hesse RA, Doster AR & Osorio FA (1996) *In vivo* detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA by in situ hybridization at different times postinfection. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 2280-2286.

Sur JH, Doster AR, Christian JS, Galeota JA, Wills RW, Zimmerman JJ & Osorio FA (1997) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis. *Journal of Virology* 71: 9170-9179.

Tascon RI, Vazquez-Boland JA, Gutierrez-Martin CB, Rodriguez-Barbosa I & Rodriguez-Ferri EF (1994) The RTX haemolysins ApxI and ApxII are major virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*: evidence from mutational analysis. *Molecular Microbiology* 14: 207-216.

Taylor DJ (1999) *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Diseases of Swine*. B.E. Shaw SDA, W.L. Mengeling. Blackwell Science, Oxford. pp. 343-354

Thacker E & Halbur PG (1996) Effect of PRRS infection antigen expression and lymphocyte populations. Bologna. p. 194.

Thacker EL, Halbur PG, Ross RF, Thanawongnuwech R & Thacker BJ (1999) *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 620-627.

Thanawongnuwech R, Young TF, Thacker BJ & Thacker EL (2001) Differential production of proinflammatory cytokines: in vitro PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* co-infection model. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 79: 115-127.

Thanawongnuwech R, Halbur PG, Ackermann MR, Thacker EL & Royer RL (1998) Effects of low (modified-live virus vaccine) and high (VR-2385)-virulence strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on pulmonary clearance of copper particles in pigs. *Veterinary Pathology* 35: 398-406.

Thiry É (2004) *Virologie clinique du porc*. Collection virologie clinique, Édition du point Vétérinaire, France. pp.26-36

Thwaites RN & Kadis S (1993) Purification of surface-exposed integral outer membrane proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and their role in opsonophagocytosis. *American Journal of Veterinary Research* 54: 1462-1470.

Tijms MA & Snijder EJ (2003) Equine arteritis virus non-structural protein 1, an essential factor for viral subgenomic mRNA synthesis, interacts with the cellular transcription co-factor p100. *Journal of General Virology* 84: 2317-2322.

Tijms MA, van Dinten LC, Gorbalenya AE & Snijder EJ (2001) A zinc finger-containing papain-like protease couples subgenomic mRNA synthesis to genome translation in a positive-stranded RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 1889-1894.

Tonpitak W, Thiede S, Oswald W, Baltes N & Gerlach GF (2000) *Actinobacillus pleuropneumoniae* iron transport: a set of *exbBD* genes is transcriptionally linked to the *tbpB* gene and required for utilization of transferrin-bound iron. *Infection and Immunity* 68: 1164-1170.

Torremorell M, Pijoan C, Janni K, Walker R & Joo HS (1997) Airborne transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nursery pigs. *American Journal of Veterinary Research* 58: 828-832.

Tumamao JQ, Bowles RE, van den Bosch H, Klaasen HL, Fenwick BW, Storie GJ & Blackall PJ (2004) Comparison of the efficacy of a subunit and a live streptomycin-dependent porcine pleuropneumonia vaccine. *Australian Veterinary Journal* 82: 370-374.

Udeze FA & Kadis S (1992) Inhibition of bactericidal activity of anticapsular antibody by nonspecific antibodies reactive with surface-exposed antigenic determinants on *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity* 60: 3852-3860.

Utrera V & Pijoan C (1991) Fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pig respiratory tracts. *Veterinary Record* 128: 357-358.

Van Breedam W, Van Gorp H, Zhang JQ, Crocker PR, Delputte PL & Nauwynck HJ (2010) The M/GP(5) glycoprotein complex of porcine reproductive and respiratory syndrome virus binds the sialoadhesin receptor in a sialic acid-dependent manner. *PLoS Pathogens* 6: e1000730.

Van de Kerkhof A, Haesebrouck F, Chiers K, Ducatelle R, Kamp EM & Smits MA (1996) Influence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its metabolites on porcine alveolar epithelial cells. *Infection and Immunity* 64: 3905-3907.

van den Bosch H & Frey J (2003) Interference of outer membrane protein PalA with protective immunity against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in vaccinated pigs. *Vaccine* 21: 3601-3607.

van Dinten LC, Rensen S, Gorbalenya AE & Snijder EJ (1999) Proteolytic processing of the open reading frame 1b-encoded part of arterivirus replicase is mediated by nsp4 serine protease and is essential for virus replication. *Journal of Virology* 73: 2027-2037.

van Dinten LC, Wassenaar AL, Gorbalenya AE, Spaan WJ & Snijder EJ (1996) Processing of the equine arteritis virus replicase ORF1b protein: identification of cleavage products

containing the putative viral polymerase and helicase domains. *Journal of Virology* 70: 6625-6633.

Van Gorp H, Van Breedam W, Delputte PL & Nauwynck HJ (2008) Sialoadhesin and CD163 join forces during entry of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of General Virology* 89: 2943-2953.

Van Gorp H, Van Breedam W, Delputte PL & Nauwynck HJ (2009) The porcine reproductive and respiratory syndrome virus requires trafficking through CD163-positive early endosomes, but not late endosomes, for productive infection. *Archives of Virology* 154: 1939-1943.

Van Gucht S, Labarque G & Van Reeth K (2004) The combination of PRRS virus and bacterial endotoxin as a model for multifactorial respiratory disease in pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 102: 165-178.

van Nieuwstadt AP, Meulenbergh JJ, van Essen-Zanbergen A, Petersen-den Besten A, Bende RJ, Moormann RJ & Wensvoort G (1996) Proteins encoded by open reading frames 3 and 4 of the genome of Lelystad virus (*Arteriviridae*) are structural proteins of the virion. *Journal of Virology* 70: 4767-4772.

Van Overbeke I, Chiers K, Ducatelle R & Haesebrouck F (2001) Effect of endobronchial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 of pigs vaccinated with a vaccine containing Apx toxins and transferrin-binding proteins. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 48: 15-20.

Van Overbeke I, Chiers K, Charlier G, Vandenberghe I, Van Beeumen J, Ducatelle R & Haesebrouck F (2002) Characterization of the in vitro adhesion of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine alveolar epithelial cells. *Veterinary Microbiology* 88: 59-74.

Van Reeth K, Labarque G, Nauwynck H & Pensaert M (1999) Differential production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections: correlations with pathogenicity. *Research in Veterinary Science* 67: 47-52.

Vanderheijden N, Delputte P, Nauwynck H & Pensaert M (2001) Effects of heparin on the entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into alveolar macrophages. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 494: 683-689.

Vanderheijden N, Delputte PL, Favoreel HW, Vandekerckhove J, Van Damme J, van Woensel PA & Nauwynck HJ (2003) Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages. *Journal of Virology* 77: 8207-8215.

Verheije MH, Welting TJ, Jansen HT, Rottier PJ & Meulenbergh JJ (2002) Chimeric arteriviruses generated by swapping of the M protein ectodomain rule out a role of this domain in viral targeting. *Virology* 303: 364-373.

- Wang C, Wang Y, Shao M, *et al.* (2009) Positive role for rApxIVN in the immune protection of pigs against infection by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vaccine* 27: 5816-5821.
- Ward CK & Inzana TJ (1994) Resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to bactericidal antibody and complement is mediated by capsular polysaccharide and blocking antibody specific for lipopolysaccharide. *Journal of Immunology* 153: 2110-2121.
- Ward CK, Lawrence ML, Veit HP & Inzana TJ (1998) Cloning and mutagenesis of a serotype-specific DNA region involved in encapsulation and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5a: concomitant expression of serotype 5a and 1 capsular polysaccharides in recombinant *A. pleuropneumoniae* serotype 1. *Infection and Immunity* 66: 3326-3336.
- Weiland E, Wieczorek-Krohmer M, Kohl D & Weiland F (1996) Monoclonal antibodies of the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are more effective in virus neutralization than monoclonal antibodies to the GP4. *Veterinary Microbiology* 51: 257-266.
- Weiland E, Wieczorek-Krohmer M, Kohl D, Conzelmann KK & Weiland F (1999) Monoclonal antibodies to the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are more effective in virus neutralization than monoclonal antibodies to the GP4. *Veterinary Microbiology* 66: 171-186.
- Welch SK, Jolie R, Pearce DS, *et al.* (2004) Construction and evaluation of genetically engineered replication-defective porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine candidates. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 102: 277-290.
- Wensvoort G, Terpstra C, Pol JM, *et al.* (1991) Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Veterinary Quarterly* 13: 121-130.
- Wilke M, Franz B & Gerlach GF (1997) Characterization of a large transferrin-binding protein from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7. *Zentralblatt für Veterinärmedizin* 44: 73-86.
- Wissink EH, Kroese MV, van Wijk HA, Rijsewijk FA, Meulenberg JJ & Rottier PJ (2005) Envelope protein requirements for the assembly of infectious virions of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Virology* 79: 12495-12506.
- Wissink EH, van Wijk HA, Kroese MV, Weiland E, Meulenberg JJ, Rottier PJ & van Rijn PA (2003) The major envelope protein, GP5, of a European porcine reproductive and respiratory syndrome virus contains a neutralization epitope in its N-terminal ectodomain. *Journal of General Virology* 84: 1535-1543.
- Wissink EH, Kroese MV, Maneschijn-Bonsing JG, Meulenberg JJ, van Rijn PA, Rijsewijk FA & Rottier PJ (2004) Significance of the oligosaccharides of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus glycoproteins GP2a and GP5 for infectious virus production. *Journal of General Virology* 85: 3715-3723.

- Wootton S, Yoo D & Rogan D (2000) Full-length sequence of a Canadian porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolate. *Archives of Virology* 145: 2297-2323.
- Wootton SK, Nelson EA & Yoo D (1998) Antigenic structure of the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 5: 773-779.
- Wu WH, Fang Y, Farwell R, Steffen-Bien M, Rowland RR, Christopher-Hennings J & Nelson EA (2001) A 10-kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF2b. *Virology* 287: 183-191.
- Wu WH, Fang Y, Rowland RR, Lawson SR, Christopher-Hennings J, Yoon KJ & Nelson EA (2005) The 2b protein as a minor structural component of PRRSV. *Virus Research* 114: 177-181.
- Xu Z, Zhou Y, Li L, *et al.* (2008) Genome biology of *Actinobacillus pleuropneumoniae* JL03, an isolate of serotype 3 prevalent in China. *PLoS One* 3: e1450.
- Xue Q, Zhao YG, Zhou YJ, *et al.* (2004) Immune responses of swine following DNA immunization with plasmids encoding porcine reproductive and respiratory syndrome virus ORFs 5 and 7, and porcine IL-2 and IFN $\gamma$ . *Veterinary Immunology and Immunopathology* 102: 291-298.
- Yoon IJ, Joo HS, Goyal SM & Molitor TW (1994) A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 6: 289-292.
- Yoon KJ, Wu LL, Zimmerman JJ & Platt KB (1997) Field isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vary in their susceptibility to antibody dependent enhancement (ADE) of infection. *Veterinary Microbiology* 55: 277-287.
- Yoon KJ, Zimmerman JJ, Swenson SL, *et al.* (1995) Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 7: 305-312.
- Yuan S, Murtaugh MP & Faaberg KS (2000) Heteroclitite subgenomic RNAs are produced in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Virology* 275: 158-169.
- Zhang Y, Sharma RD & Paul PS (1998) Monoclonal antibodies against conformationally dependent epitopes on porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Microbiology* 63: 125-136.
- Zhang Y, Nakata K, Weiden M & Rom WN (1995) *Mycobacterium tuberculosis* enhances human immunodeficiency virus-1 replication by transcriptional activation at the long terminal repeat. *Journal of Clinical Investigation* 95: 2324-2331.

Zhang Y, Tennent JM, Ingham A, Beddome G, Prideaux C & Michalski WP (2000) Identification of type 4 fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiology Letters* 189: 15-18.

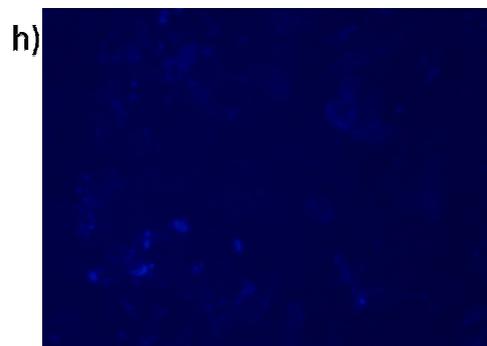
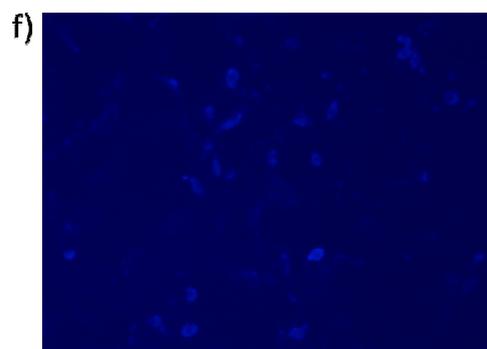
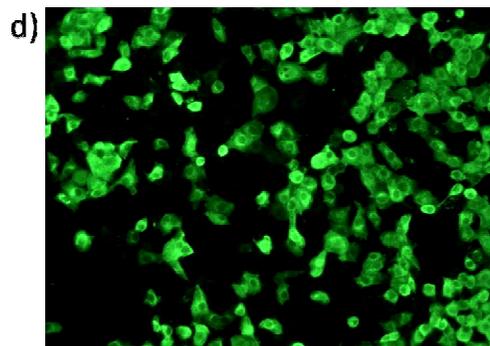
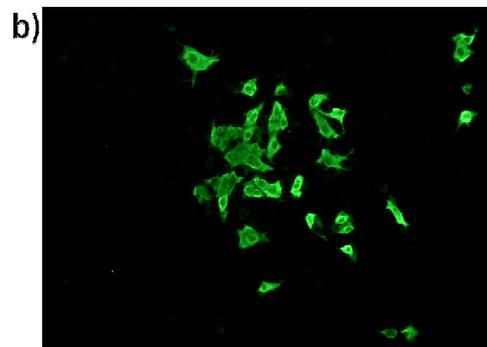
Zhao C, Papadopoulou B & Tremblay MJ (2004) *Leishmania infantum* promotes replication of HIV type 1 in human lymphoid tissue cultured *ex vivo* by inducing secretion of the proinflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1 alpha. *Journal of Immunology* 172: 3086-3093.

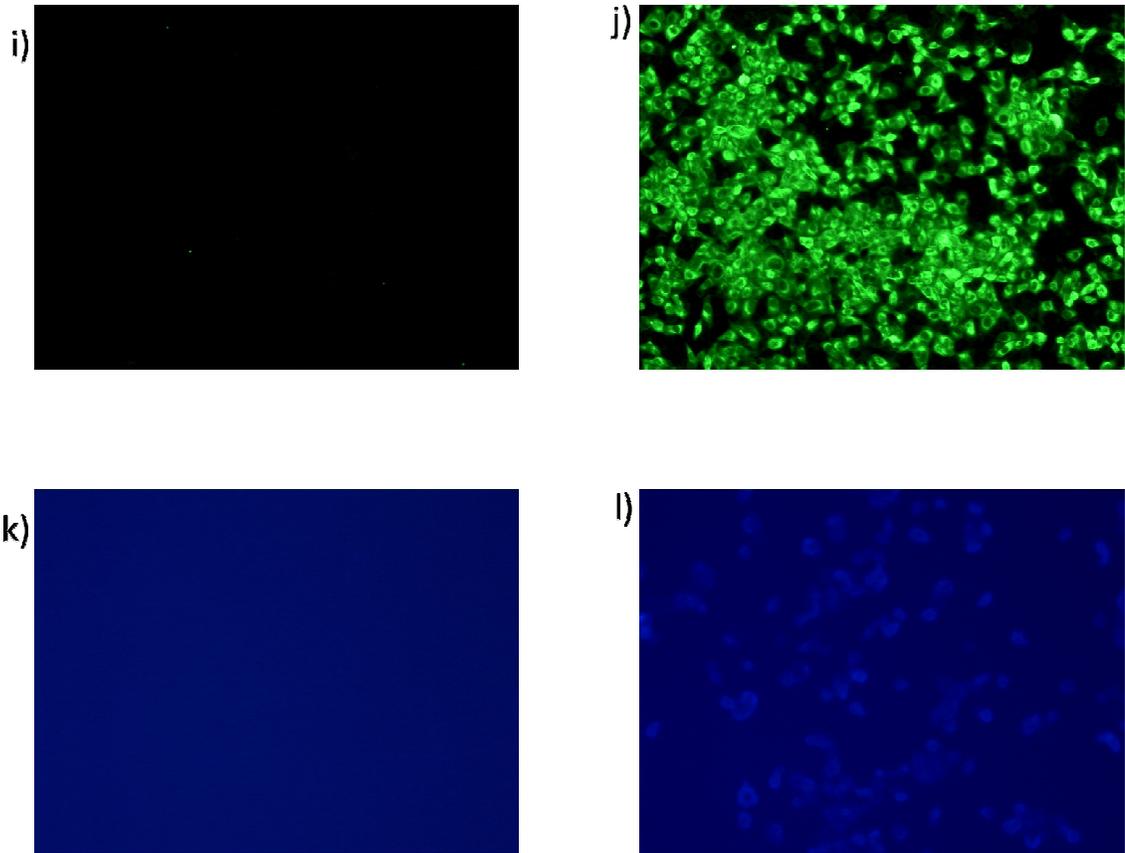
Zhou Y, Barghusen S, Choi C, *et al.* (1992) Effect of SIRS Virus infection in leukocyte populations in the peripheral blood and on cytokine expression in alveolar macrophages of growin pigs. *American Association of Swine Practitioners Newsletter* 4: 28.

Ziebuhr J, Snijder EJ & Gorbalenya AE (2000) Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *Journal of General Virology* 81: 853-879.

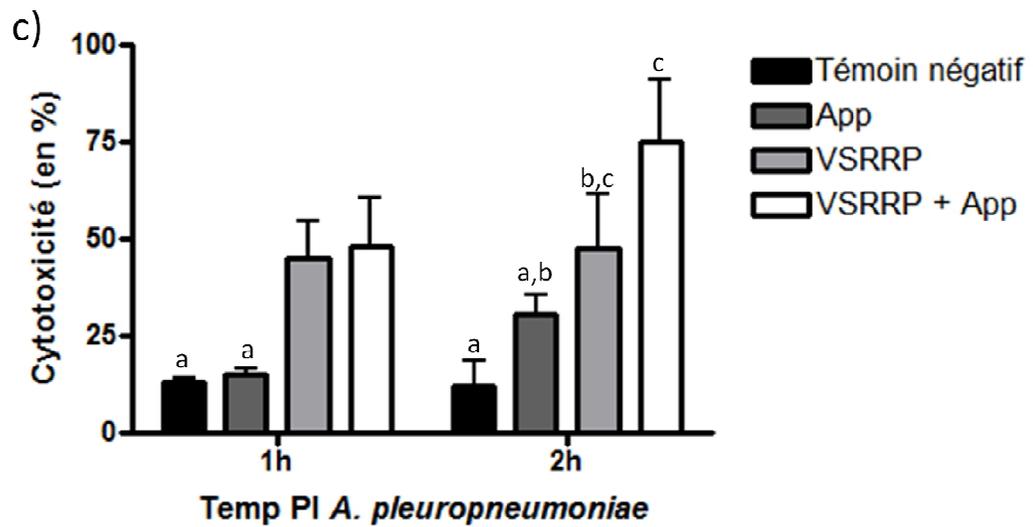
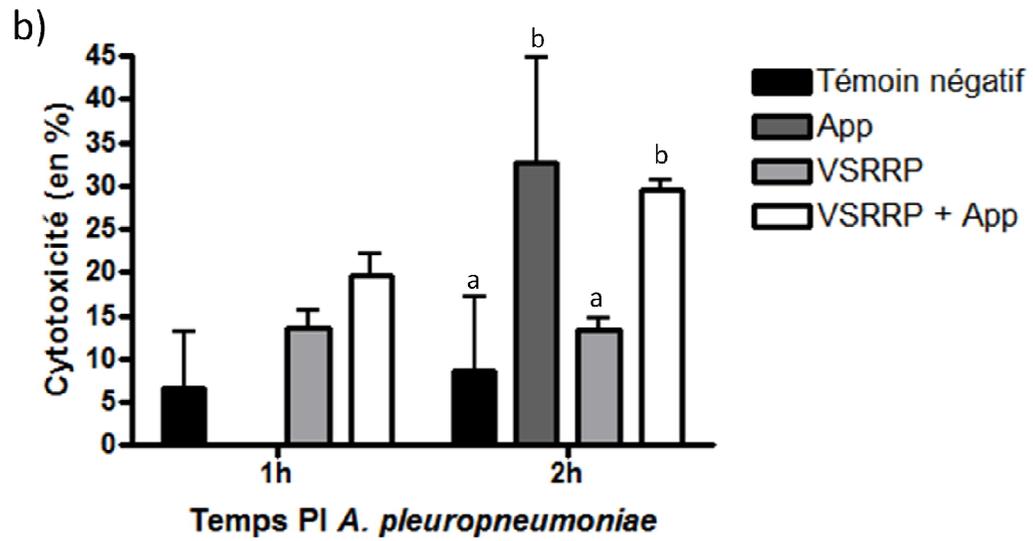
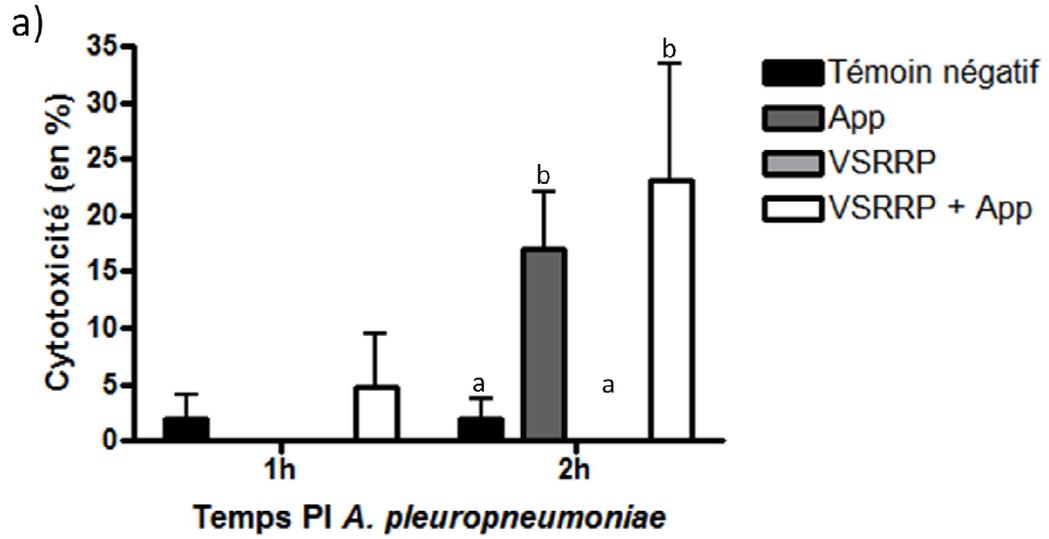
Zuckermann FA, Garcia EA, Luque ID, Christopher-Hennings J, Doster A, Brito M & Osorio F (2007) Assessment of the efficacy of commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccines based on measurement of serologic response, frequency of gamma-IFN-producing cells and virological parameters of protection upon challenge. *Veterinary Microbiology* 123: 69-85.

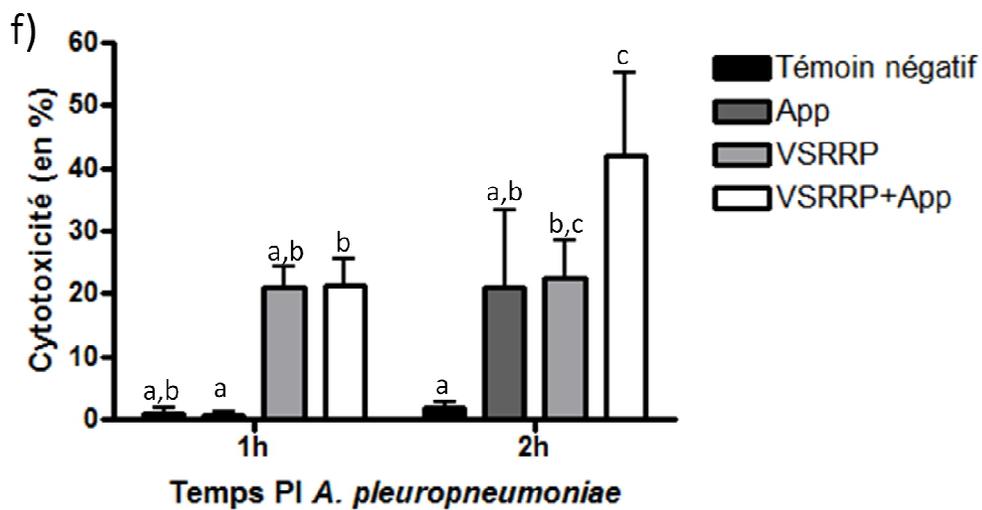
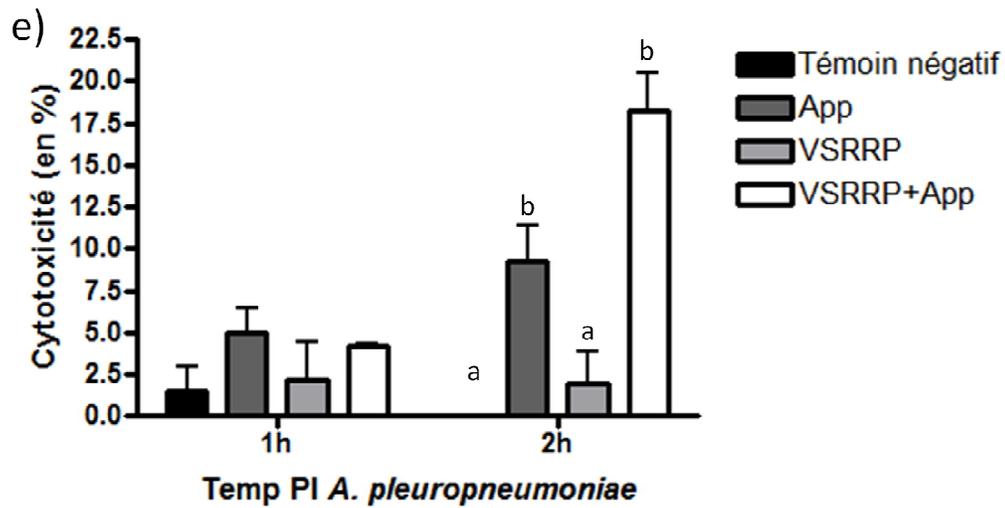
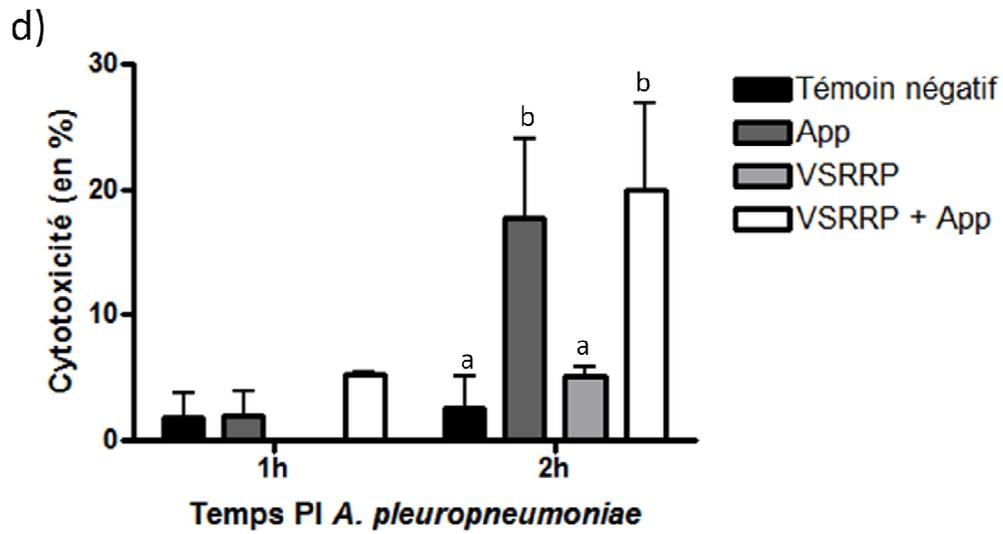
## **ANNEXES**



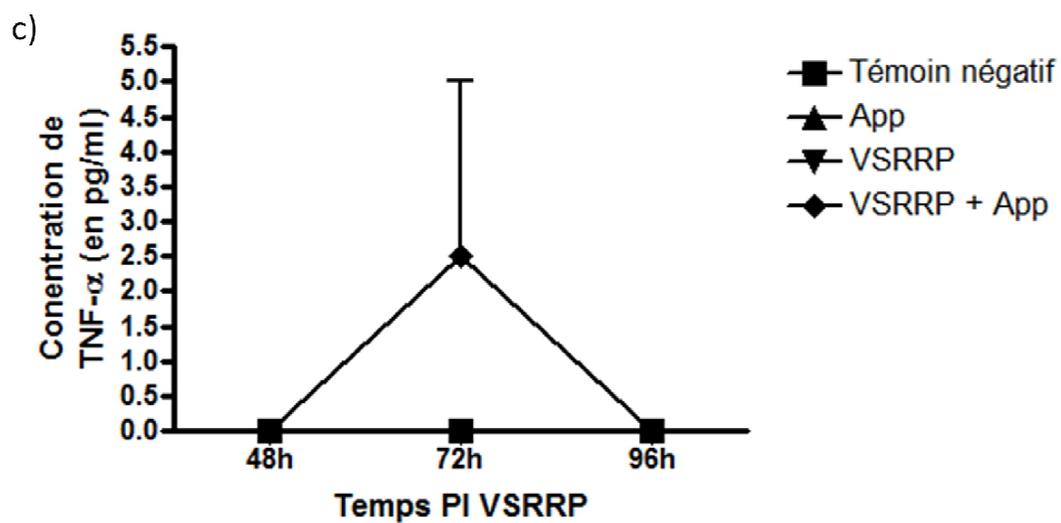
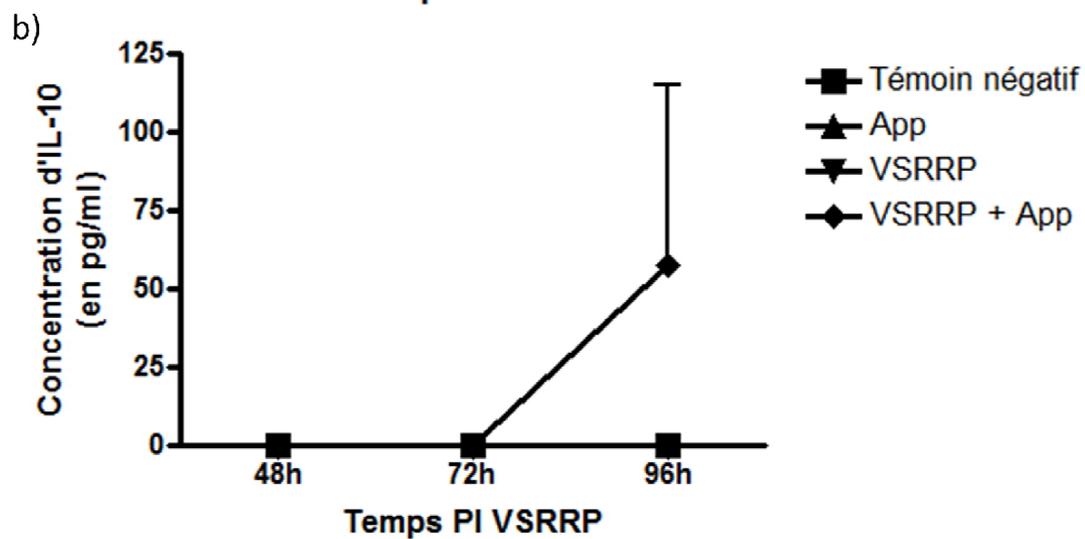
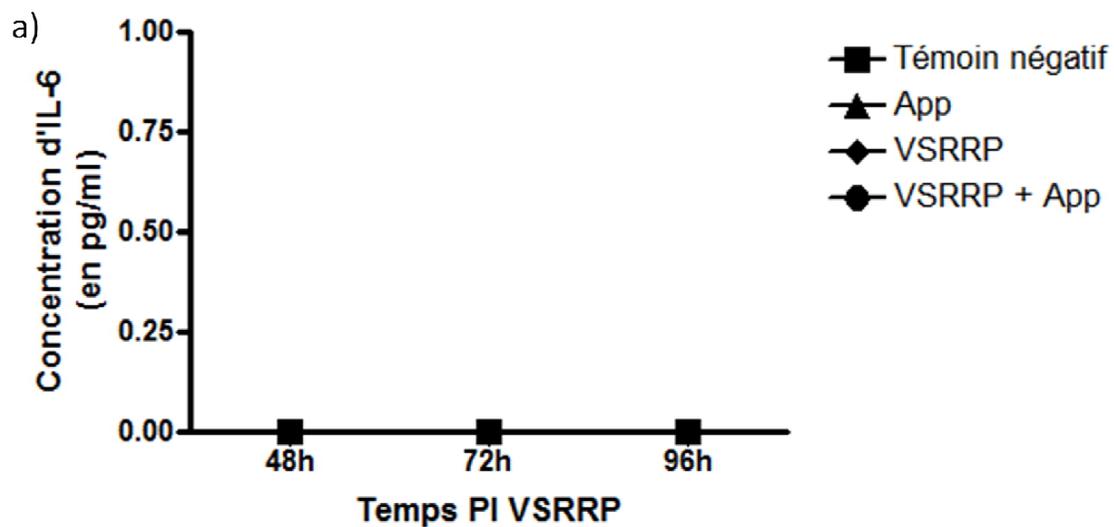


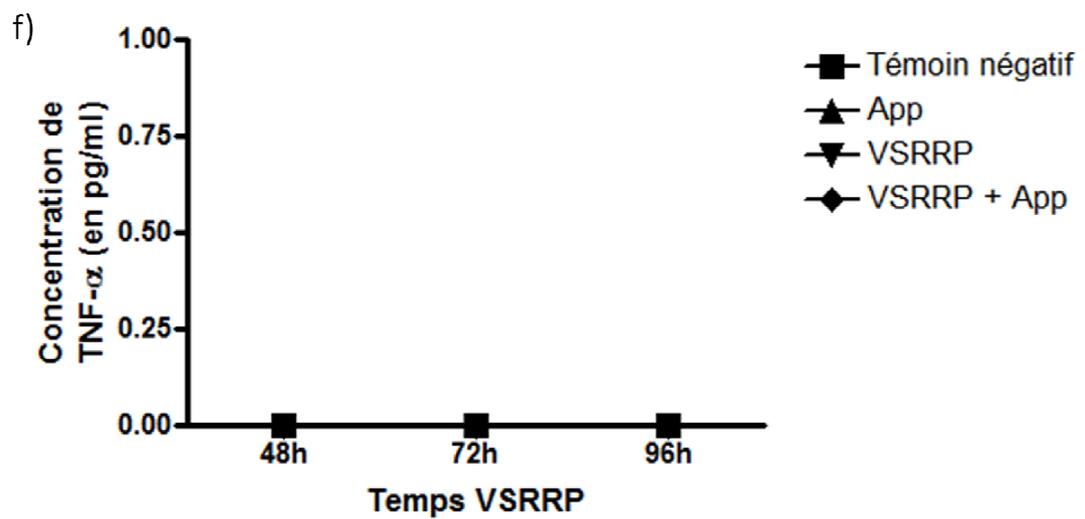
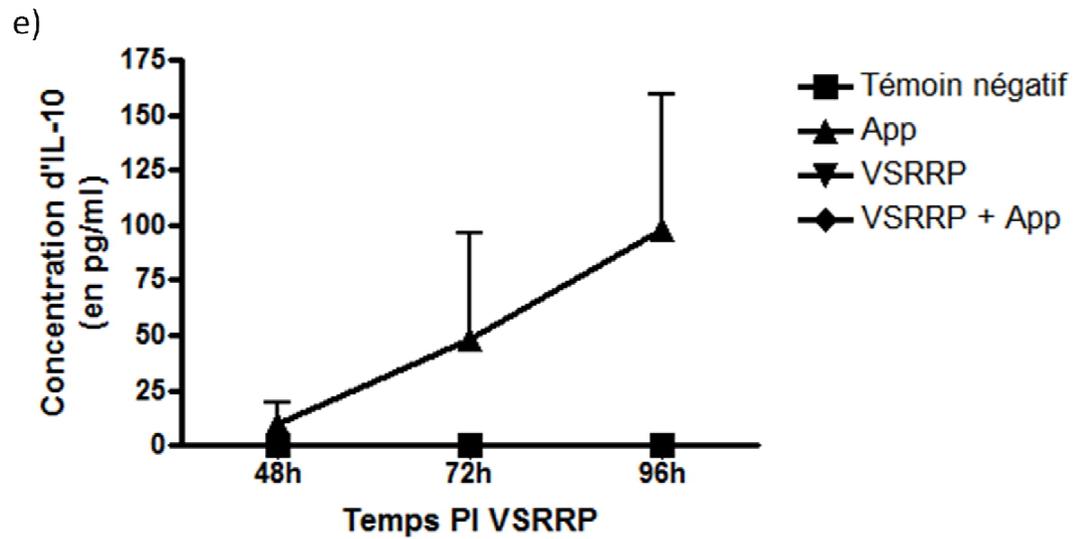
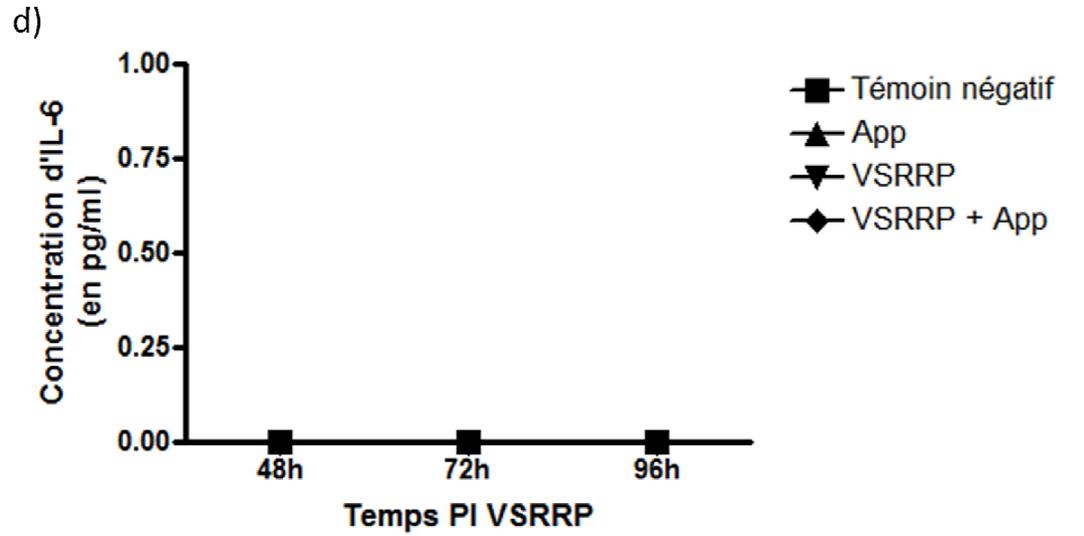
Annexe I : Images des cellules infectées avec le VSRRP (MOI de 0,5). a), c) et e) lignée cellulaire SJPL non-infectée; b) lignée cellulaire SJPL infectée avec le VSRRP pendant 24 heures; d) lignée cellulaire SJPL infectée avec le VSRRP pendant 48 heures; f) lignée cellulaire SJPL infectée avec le VSRRP pendant 96 heures; g), i) et k) lignée cellulaire MARC-145 non-infectée; h) lignée cellulaire MARC-145 infectée avec le VSRRP pendant 24 heures; j) lignée cellulaire MARC-145 infectée avec le VSRRP pendant 48 heures; l) lignée cellulaire MARC-145 infectée avec le VSRRP pendant 96 heures. Grossissement : 100X. Les images avec la coloration verte sont obtenues avec le deuxième anticorps qui est conjugué au FITC (Sigma, dilution 1:160), tandis que les images bleues sont obtenues avec le deuxième anticorps qui est conjugué avec l'Alexafluor 350 (Sigma, dilution 1:200).



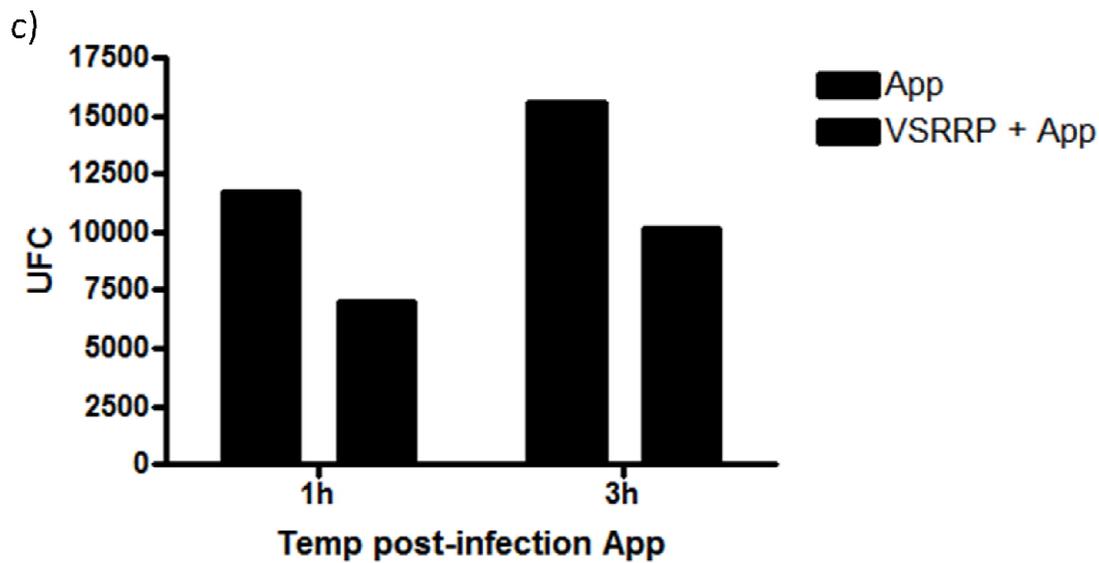
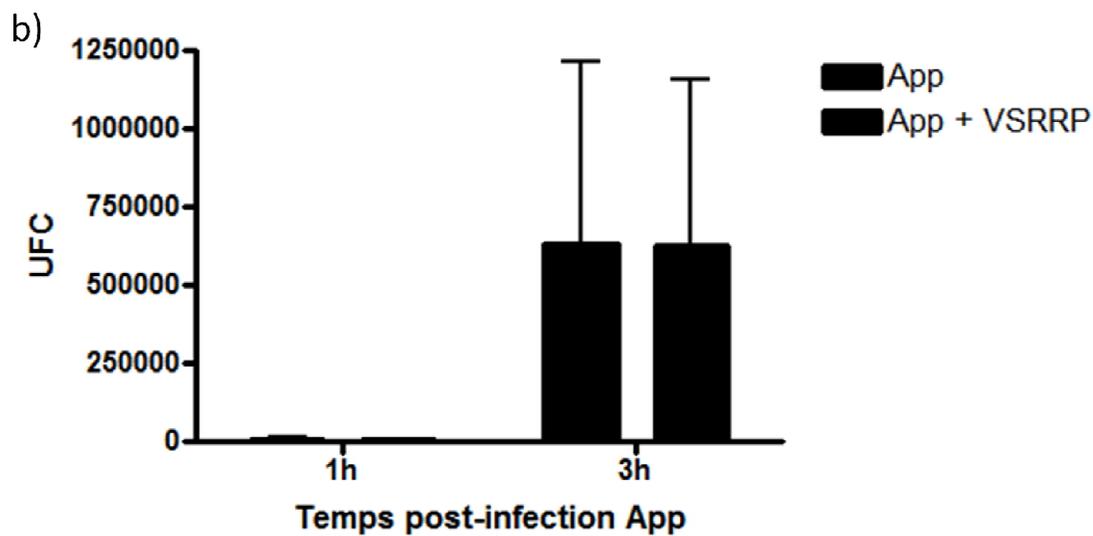
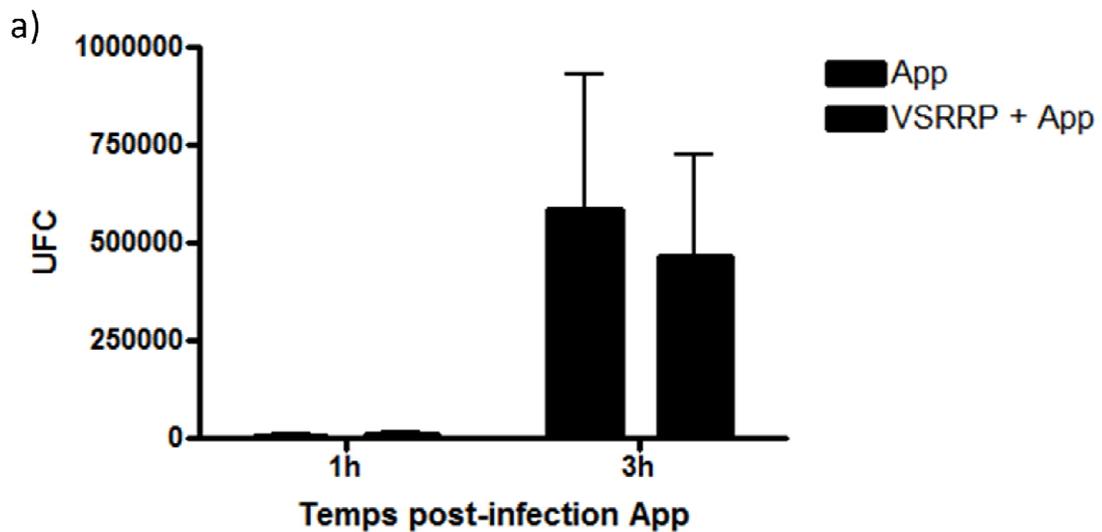


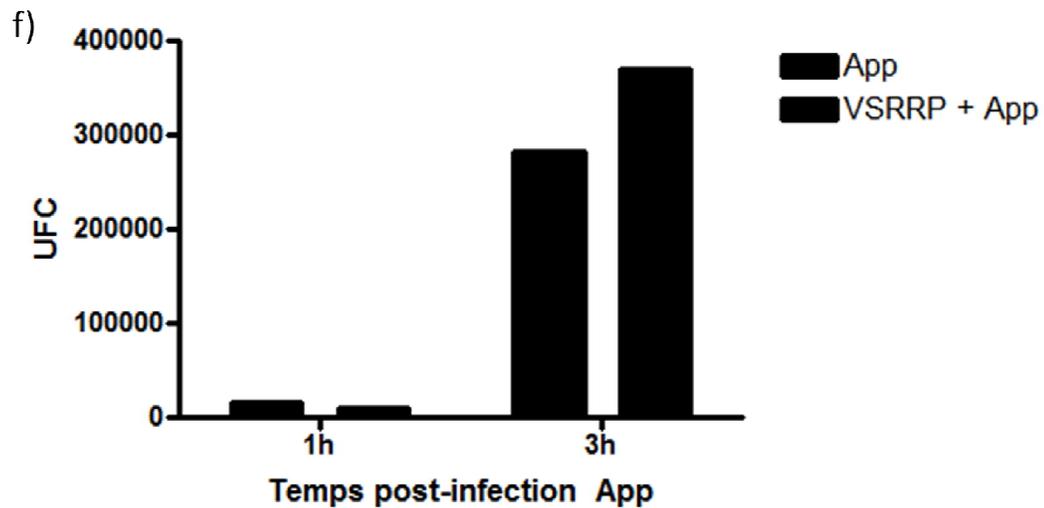
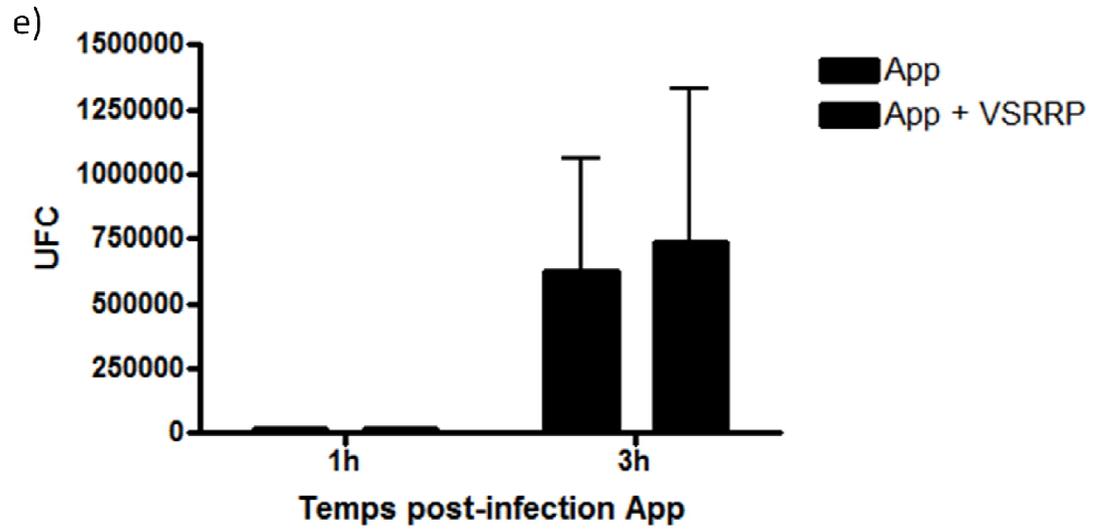
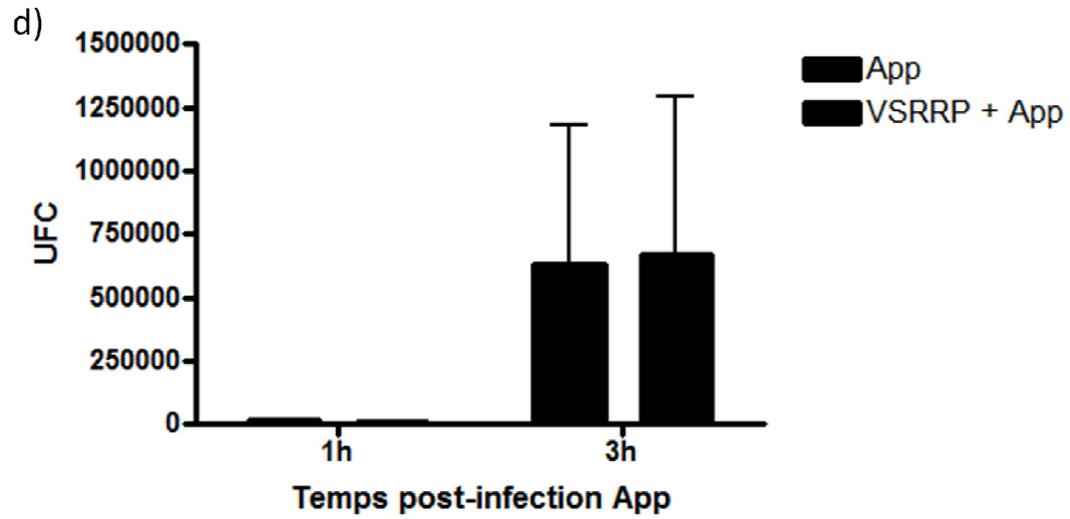
Annexe II : Test de cytotoxicité avec le surnageant des cellules infectées avec le VSRRP et la bactérie *A. pleuropneumoniae* pendant 1 heures et 2 heures. a) lignée cellulaire SJPL infectée avec le VSRRP pendant 24 heures, puis *A. pleuropneumoniae*; b) lignée cellulaire SJPL infectée avec le VSRRP pendant 48 heures, puis *A. pleuropneumoniae*; c) lignée cellulaire SJPL infectée avec le VSRRP pendant 96 heures, puis *A. pleuropneumoniae*; d) lignée cellulaire MARC-145 infectée avec le VSRRP pendant 24 heures, puis *A. pleuropneumoniae*; e) lignée cellulaire MARC-145 infectée avec le VSRRP pendant 48 heures, puis *A. pleuropneumoniae*; f) lignée cellulaire MARC-145 infectée avec le VSRRP pendant 96 heures, puis *A. pleuropneumoniae*. Une lettre identique entre deux groupes indique qu'il n'y a pas de différence significative entre ceux-ci. Par exemple, à la figure a) la lettre « a » sur la colonne témoin négatif et la colonne VSRRP indique qu'il n'y a pas de différence significative entre ces deux groupes. Le témoin négatif correspond à l'incubation de la lignée cellulaire SJPL ou MARC-145 seule. Trois expériences indépendantes ont été réalisées en duplicata.



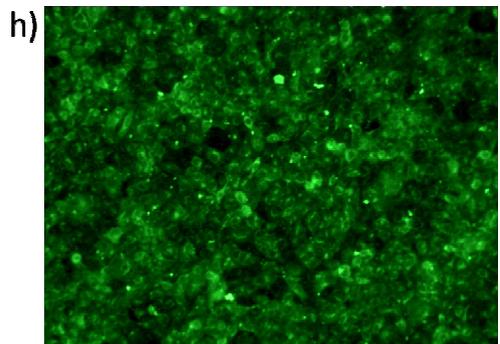
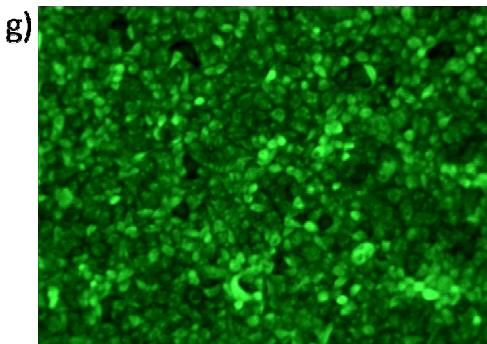
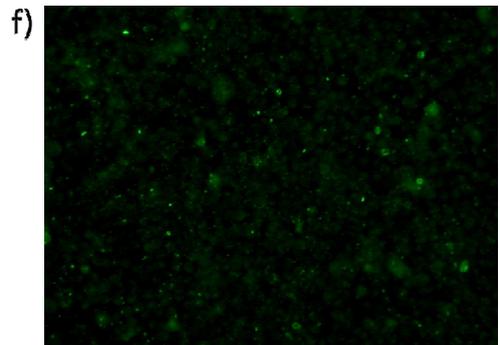
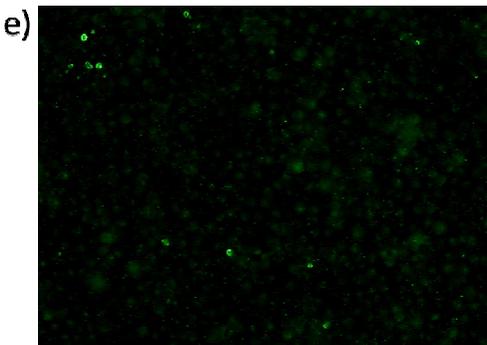
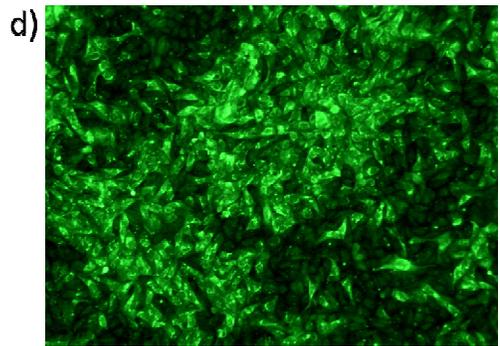
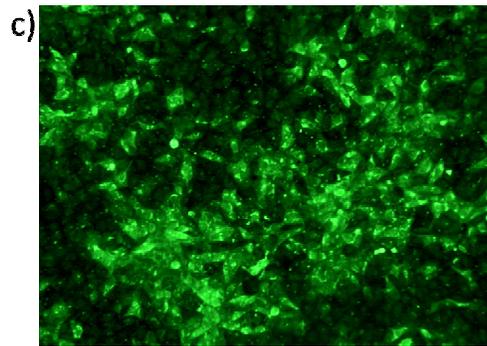
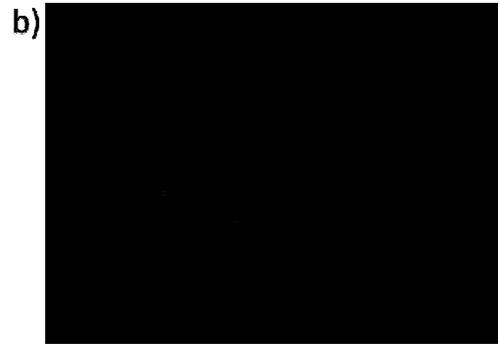
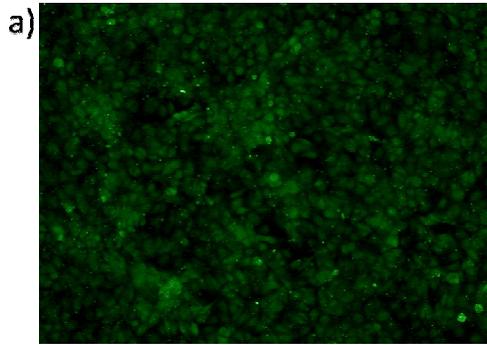


Annexe III : Quantification de la production de cytokines par la lignée cellulaire SJPL et la lignée cellulaire MARC-145 infectées avec le VSRRP pendant 48 heures à 96 heures et une infection de 24 heures avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta apxIC\Delta apxIIC$ . a) production d'IL-6 par la lignée cellulaire SJPL; b) production d'IL-10 par la lignée cellulaire SJPL; c) production de TNF- $\alpha$  par la lignée cellulaire SJPL; d) production d'IL-6 par la lignée cellulaire MARC-145; e) production d'IL-10 par la lignée cellulaire MARC-145; f) production de TNF- $\alpha$  par la lignée cellulaire MARC-145. Le témoin négatif correspond à l'incubation de la lignée cellulaire SJPL ou MARC-145 seule. Trois expériences indépendantes ont été réalisées en duplicata.

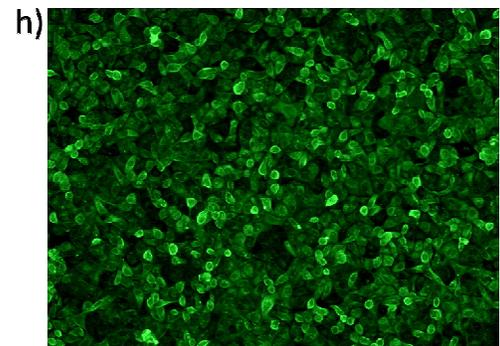
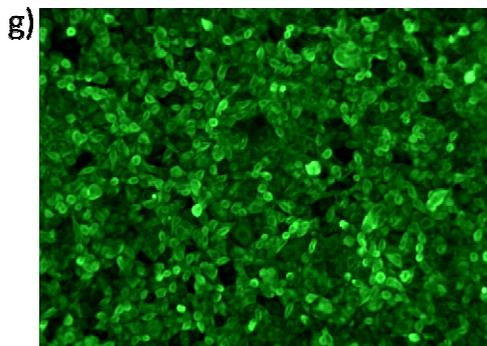
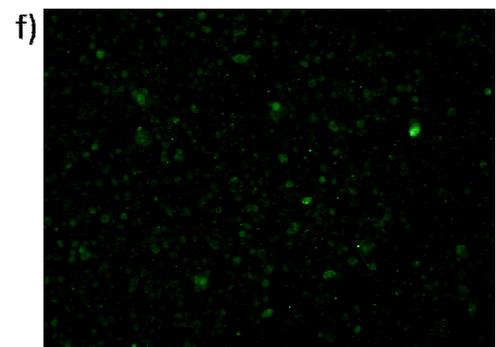
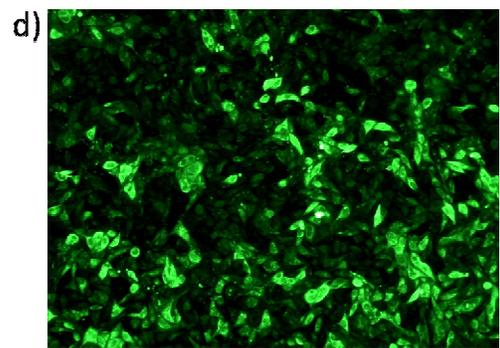
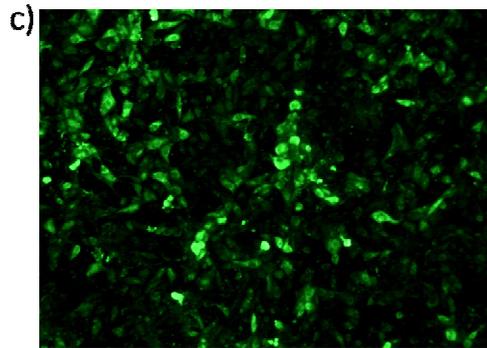
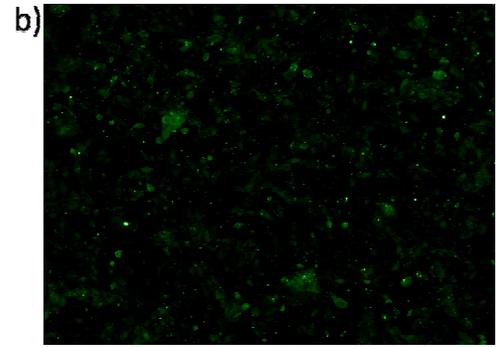
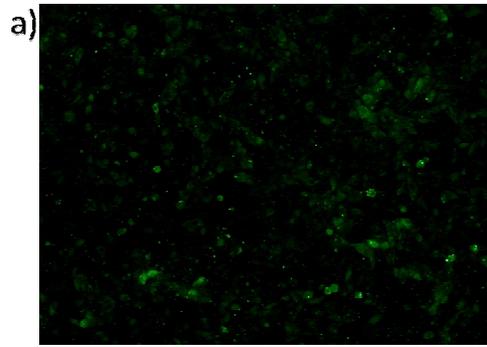




Annexe IV : L'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* ou aux lignées cellulaires pré-infectées avec le VSRRP. a) lignée cellulaire SJPL, pré-infectée avec VSRRP pendant 24 heures (trois expériences indépendantes faites en duplicata); b) lignée cellulaire SJPL, pré-infectée avec VSRRP pendant 48 heures (deux expériences indépendantes faites en duplicata); c) lignée cellulaire SJPL, pré-infectée avec VSRRP pendant 96 heures (une expérience faites en duplicata); d) lignée cellulaire MARC-145, pré-infectée avec VSRRP pendant 24 heures (deux expériences indépendantes faites en duplicata); e) lignée cellulaire MARC-145, pré-infectée avec VSRRP pendant 48 heures (deux expériences indépendantes faites en duplicata); f) lignée cellulaire MARC-145, pré-infectée avec VSRRP pendant 96 heures (une expérience fait en duplicata). Test statistique : two-way ANOVA,  $P < 0,05$ .



Annexe V : Images des cellules incubées avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ *Ap<sub>x</sub>IC* $\Delta$ *Ap<sub>x</sub>IIC* inactivé et infectées avec le VSRRP. Les cellules sont infectées 72 heures. a) lignée cellulaire SJPL; b) lignée cellulaire SJPL incubée avec *A. pleuropneumoniae* inactivée; c) lignée cellulaire SJPL infectées avec le VSRRP; d) lignée cellulaire SJPL incubée avec *A. pleuropneumoniae* inactivée et infectées avec le VSRRP; e) lignée cellulaire MARC-145, f) lignée cellulaire MARC-145 incubée avec *A. pleuropneumoniae* inactivée; g) lignée cellulaire MARC-145 infectée avec le VSRRP; h) lignée cellulaire MARC-145 incubée avec *A. pleuropneumoniae* inactivée et infectée avec le VSRRP. Grossissement : 100 X.



Annexe VI : Images des cellules incubées avec le surnageant d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta ApxIC\Delta ApxIIC$  et infectées avec le VSRRP. Les cellules sont infectées 72 heures. a) lignée cellulaire SJPL; b) lignée cellulaire SJPL incubée avec les LPS d'*A. pleuropneumoniae*; c) lignée cellulaire SJPL infectées avec le VSRRP; d) lignée cellulaire SJPL incubée avec les LPS d'*A. pleuropneumoniae* et infectées avec le VSRRP; e) lignée cellulaire MARC-145; f) lignée cellulaire MARC-145 incubée avec les LPS d'*A. pleuropneumoniae*; g) lignée cellulaire MARC-145 infectée avec le VSRRP; h) lignée cellulaire MARC-145 incubée avec les LPS d'*A. pleuropneumoniae* et infectée avec le VSRRP. Grossissement 100 X.

**Annexe VII : Test de co-infection à différentes MOI d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC avec la lignée cellulaire SJPL**

Le test a été fait dans une plaque 96 puits. Les cellules SJPL ont été infectées avec *A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC à des MOI allant de 10:1 à  $10^{-7}$ :1. Les bactéries ont été ensemencées dans du milieu DMEM complet à raison de 100  $\mu$ l/puits. Le tout a été incubé pendant 3h à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Par la suite, les cellules sont infectées avec le VSRRP. Le virus a été mis dans du milieu DMEM complet sans sérum à une MOI de 0,5 et le volume de milieu par puits est de 100  $\mu$ l. La plaque a été incubée pendant 4 heures à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Puis, le milieu a été changé pour du milieu DMEM complet avec sérum. Les cellules ont un volume de milieu de 100  $\mu$ l. La plaque a été incubée pendant 72 heures à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Les cellules ont été fixées et préparées pour l'immunofluorescence.

Tableau V : Détection de la fluorescence du à la présence du VSRRP dans les cellules de la lignée cellulaire SJPL infectée avec différentes MOI d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC et le VSRRP pendant 72 heures. Pour chaque MOI, quatre puits étaient co-infectés.

<b>MOI (bactéries : cellules)</b>	<b>SJPL+App<math>\Delta</math>apxIC<math>\Delta</math>apxIIC</b>	<b>SJPL+ App<math>\Delta</math>apxIC<math>\Delta</math>apxIIC +VSRRP (nombre de puits)</b>
<b>10:1</b>	B	B (4)
<b>1:1</b>	B	B (4)
<b>1:10</b>	B	B (4)
<b>1:100</b>	B	B (4)
<b>1:1000</b>	B	B (4)
<b>1:10 000</b>	-	B (2)/+ (2)
<b>1:100 000</b>	-	+ (4)
<b>1:1 000 000</b>	-	- (2)/+(2)
<b>1: 10 000 000</b>	-	+ (4)
<b>0 bactéries</b>	-	+ (4)

Légende : + : fluorescence de présents, - : pas de fluorescence, B : présence de bactéries.

## Annexe VIII : Publications scientifiques

J. Létourneau, C. Lévesque, F. Berthiaume, M. Jacques, M. Mourez. *In vitro* assay of bacterial adhesion onto mammalian epithelial cells. Journal of Visualized Experiment. Le papier a été soumis en décembre 2010 et la vidéo enregistrée en janvier 2011.

C. Lévesque, C.A. Gagnon, M. Jacques. Augmentation de la cytotoxicité lors d'une co-infection de lignées cellulaires avec *Actinobacillus pleuropneumoniae* et le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin. 78<sup>ième</sup> congrès de l'Acfas, Université de Montréal, Montréal, Québec. Du 10 au 14 mai 2010. Présentation oral #C118, p.98 et #D206, p. 111.

C. Lévesque, C.A. Gagnon, M. Jacques. Increased cytotoxicity is observed following *in vitro* co-infection of cells with porcine reproductive and respiratory syndrome and *Actinobacillus pleuropneumoniae*. International PRRS symposium, Chicago, IL. Les 4 et 5 décembre 2009. Affiche #28, p39.

90<sup>ième</sup> réunion annuel de Conference of reserach workers in animal diseases, Chicago, IL. Du 6 au 8 décembre 2009. Affiche #88P, p. 109.

C. Lévesque, C.A. Gagnon, M. Jacques. *In vitro* co-infection of cell cultures with *Actinobacillus pleuropneumoniae* and the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. 59<sup>th</sup> Annual Conference of the Canadian Society of Microbiologists, Université Concordia, Montréal, Québec. Du 15 au 18 juin 2009. Affiche # II20, page 107.

C. Lévesque, C.A. Gagnon, M. Jacques. Modèle cellulaire de co-infection avec le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin et *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Journée de la recherche FMV, U de Mtl, St-Hyacinthe, Québec. Le 26 février 2009. Affiche #18, page 54.