



Université de Montréal

**Interaction entre le virus SRRP et *Actinobacillus pleuropneumoniae* dans un modèle  
d'infection en culture cellulaire**

par

Jérémy A. Ferreira Barbosa

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 vétérinaires  
option microbiologie

Août, 2014

© Jérémy A. Ferreira Barbosa, 2014

Université de Montréal  
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

**Interaction entre le virus SRRP et *Actinobacillus pleuropneumoniae* dans un modèle  
d'infection en culture cellulaire**

présenté par  
Jérémy A. Ferreira Barbosa

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr Simon Dufour, président-rapporteur  
Dr Mario Jacques, directeur de recherche  
Dr Carl A. Gagnon, codirecteur  
Dr Francis Beaudry, codirecteur  
Dr Daniel Dubreuil, membre du jury

## RÉSUMÉ

Le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP) est un pathogène d'importance dans l'industrie porcine et est responsable d'importantes pertes économiques. Il n'existe pas d'antiviral efficace contre celui-ci. Il a récemment été mis en évidence que le surnageant de culture d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*, l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine, possédait une activité antivirale *in vitro* contre le VSRRP dans la lignée cellulaire SJPL. Les objectifs de mon projet sont (i) d'étudier les mécanismes cellulaires menant à l'activité antivirale causée par le surnageant de culture d'*A. pleuropneumoniae*, et (ii) de caractériser les molécules actives présentes dans le surnageant de culture d'*A. pleuropneumoniae*. Dans un premier temps, des analyses de protéome ont été effectuées et ont permis d'observer que le surnageant de culture modulait la régulation du cycle cellulaire. Dans le but d'analyser le cycle cellulaire des cellules SJPL, la cytométrie en flux a été utilisée et a permis de démontrer que le surnageant de culture induisait un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M. Deux inhibiteurs de la phase G2/M ont alors été utilisés. Il s'est avéré que ces inhibiteurs avaient la capacité d'inhiber le VSRRP dans les cellules SJPL. Enfin, la spectrométrie de masse a été utilisée dans le but de caractériser les molécules actives présentes dans le surnageant de culture d'*A. pleuropneumoniae* et d'identifier deux molécules. Ce projet a permis de démontrer pour la première fois qu'*A. pleuropneumoniae* est capable de perturber le cycle cellulaire et que ce dernier était un élément important dans l'effet antiviral contre le VSRRP.

**Mots-clés :** Porcin, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, VSRRP, effet antiviral, interaction hôte-pathogène, cycle cellulaire, cytométrie en flux, spectrométrie de masse, analyse du protéome.

## ABSTRACT

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is the most important pathogen in the swine industry and causes important economic losses. No effective antiviral drugs against it exist. It was recently reported that the culture supernatant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, the causative agent of porcine pleuropneumonia, possesses an antiviral activity *in vitro* against PRRSV in SJPL cells. The objectives of this project were (i) to identify the mechanism behind the antiviral activity displayed by *A. pleuropneumoniae*, and (ii) to characterize the active molecules present in the culture supernatant. Proteomic analyses were first conducted and demonstrated the culture supernatant ability to induce modulations of the cell cycle regulation. In order to determine the SJPL cell cycle, flow cytometry analyses were performed and demonstrated that the culture supernatant induced a G2/M-phase cell cycle arrest. Two G2/M-phase cell cycle inhibitors were then used and their ability to inhibit PRRSV infection in SJPL cells was demonstrated. Finally, in order to characterize the active molecules present in the *A. pleuropneumoniae* culture supernatant, mass spectrometry was used and two molecules were identified. This is the first study demonstrating the *A. pleuropneumoniae* ability to disrupt cell cycle and the cell cycle importance to the inhibitory activity against PRRSV.

**Keywords** : Swine, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, PRRSV, antiviral effect, host-pathogen interaction, cell cycle, flow cytometry, mass spectrometry, proteomic analysis.

# TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	I
ABSTRACT.....	II
TABLE DES MATIÈRES .....	III
Liste des tableaux.....	V
Liste des figures.....	VI
Liste des sigles et abréviations.....	VIII
DÉDICACES .....	XIII
REMERCIEMENTS.....	XIV
INTRODUCTION .....	1
RECENSION DES ÉCRITS .....	4
1 LE COMPLEXE RESPIRATOIRE PORCIN .....	5
2 <i>ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE</i> .....	6
2.1 <i>Quelques généralités</i> .....	6
2.2 <i>Les différents facteurs de virulence présents chez Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .....	10
2.3 <i>La pleuropneumonie porcine : maladie, prophylaxie, diagnostic et traitements</i> .....	20
3 LE VIRUS DU SYNDROME REPRODUCTEUR ET RESPIRATOIRE PORCIN .....	23
3.1 <i>Généralités et importance économique</i> .....	23
3.2 <i>Le syndrome reproducteur et respiratoire porcine</i> .....	23
3.3 <i>Le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcine</i> .....	24
3.4 <i>Pathogenèse cellulaire</i> .....	36
3.5 <i>Les réponses immunitaires contre le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcine</i> .....	37
3.6 <i>Prévention et traitement</i> .....	39
4 LES INFECTIONS MIXTES .....	42
4.1 <i>Généralités</i> .....	42
4.2 <i>Divers modèles d'infections mixtes</i> .....	42
4.3 <i>Des coinfections incluant le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcine ou Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .....	43
4.4 <i>Connaissances actuelles des coinfections entre Actinobacillus pleuropneumoniae et le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcine</i> .....	45

5 CONCLUSIONS, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DU PROJET..... 46

**ARTICLE ..... 48**

*ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* INDUCES SJPL CELL CYCLE ARREST IN G2/M PHASE AND INHIBITS  
PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS REPLICATION..... 49

**DISCUSSION GÉNÉRALE ..... 112**

**CONCLUSIONS ..... 120**

**BIBLIOGRAPHIE ..... 123**

**ANNEXES .....XV**

## LISTE DES TABLEAUX

### RECENSION DES ÉCRITS

Tableau I. Regroupement des sérotypes selon le biotype et la virulence des souches chez <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> . .....	7
Tableau II. Répartition des sérotypes d' <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> à travers le monde. ....	9
Tableau III. Répartition des différents génotypes des toxines Apx selon les sérotypes d' <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> . ....	15

### ARTICLE

Table SI. Protein profiling of SJPL cells after infection or not with PRRSV for 4 hours (MOI = 0.5) and/or treatment for 18 hours with the <i>AppΔapxICΔapxIIC</i> culture supernatant using the Kinex™ KAM-850 antibody microarray. ....	91
---	----



## LISTE DES FIGURES

### RECENSION DES ÉCRITS

Figure 1. Représentation schématique de la structure générale des LPS présents chez les bactéries à Gram négatif.....	11
Figure 2. Représentation générale de la structure du noyau du lipopolysaccharide d' <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> . .....	12
Figure 3. Représentation schématique de la structure de base de polysaccharides de capsule d' <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> de sérotype 1. ....	13
Figure 4. Représentation des différents mécanismes d'acquisition du fer retrouvés chez <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> . .....	17
Figure 5. Représentation schématique de la structure du VSRRP.....	26
Figure 6. Représentation de l'organisation génomique du VSRRP.....	27
Figure 7. Représentation schématique de la protéine N du VSRRP. ....	29
Figure 8. Représentation schématique des facteurs de liaisons cellulaires utilisés par le VSRRP. ....	32
Figure 9. Mécanisme d'entrée du VSRRP dans un macrophage alvéolaire porcine.....	35

### ARTICLE

Figure 1. Repartition of the most upregulated proteins of SJPL cells after PRRSV infection followed or not by the App $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC culture supernatant treatment.....	76
Figure 2. App $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC culture supernatant effect on SJPL cell cycle.....	77
Figure 3. The $\leq$ 3 kDa App $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC culture supernatant ultrafiltrate effect on SJPL cell cycle. ....	78
Figure 4. Modulation of SJPL cell cycle by DIM and SBE-13. ....	79
Figure 5. Investigation of treated SJPL cell proliferation using cell counts. ....	80
Figure 6. Detection of PRRSV N antigen in PRRSV SJPL infected and treated cells. ....	81
Figure 7. Differential comparison of ions present in DMEM or App $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC culture supernatant using LC-MS/MS. ....	82

Figure 8. Migration of DMEM and of different strains of <i>A. pleuropneumoniae</i> culture supernatant on TLC plate.....	83
Figure 9. LC-MS/MS analyses of the molecules extracted from the TLC spot observed at Rf 0.52. ....	84
Figure S1. Influence of the <i>AppΔapxICΔapxIIC</i> culture supernatant on MARC-145 cell cycle. ....	85
Figure S2. Influence of the $\leq 3$ kDa <i>AppΔapxICΔapxIIC</i> culture supernatant ultrafiltrate on MARC-145 cell cycle.....	86
Figure S3. Extracted ion chromatogram of the m/z 515.2 ion present in the <i>AppΔapxICΔapxIIC</i> culture supernatant. ....	87
Figure S4. Extracted ion chromatogram of the m/z 663.6 ion present in the <i>AppΔapxICΔapxIIC</i> culture supernatant. ....	88
Figure S5. Fragmentation pattern of the m/z 515.2 present in the <i>AppΔapxICΔapxIIC</i> culture supernatant. ....	89
Figure S6. Fragmentation pattern of the m/z 663.6 present in the <i>AppΔapxICΔapxIIC</i> culture supernatant. ....	90

## ANNEXES

Annexe 1. Analyse de l'impact de différents traitements sur la prolifération cellulaire des cellules MARC-145 .....	xvi
Annexe 2. Modulation du cycle cellulaire des cellules MARC-145 par la DIM et le SBE-13... ..	xvii

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

%CFC :	« Percent of change from control » – pourcentage de variation par rapport au contrôle
Ag-O :	Antigène-O
ANOVA :	« Analysis of variance » – analyse de la variance
ARNsb+ :	ARN simple brin à polarité positive
ASIN(SQRT(x)) :	« Arcsine square root » – fonction : arcsinus de la racine carrée de x
BHI :	« Brain heart infusion » – infusion coeur cerveau
$\beta$ -NAD :	$\beta$ -nicotinamide adénine dinucléotide
CASP :	Caspase
CD :	« Cluster of differentiation » – groupe de différenciation
CDC25c :	« M-phase inducer phosphatase 3 » – phosphatase 3 induisant le passage à la phase M du cycle cellulaire
CDK :	« Cyclin-dependent kinase » – kinase dépendant de la cycline
CDT :	« Cytolethal distending toxin » – toxine cytolétale et distendante
CFU :	« Colony-forming unit » – unité formant une colonie
Chk :	« Check point kinase » – protéine kinase de point de contrôle du cycle cellulaire
CPS :	Polysaccharidique de capsule
cps :	« Counts per second » – compte par seconde
CREB :	« Cyclic AMP-responsive element-binding protein » – protéine de liaison à l'élément de réponse à l'AMP cyclique
CRP :	Complexe respiratoire porcin
DDA :	« Data dependent acquisition » – acquisition dépendante des données
DIM :	3,3'-diindolylméthane (3,3'-méthylènebis-1H-indole)
DMEM :	« Dulbecco's modified Eagle's medium » – milieu de Eagle modifié par Dulbecco
DPBS :	« Dulbecco's phosphate buffered saline » – tampon phosphate salin modifié par Dulbecco
e.g. :	« exempli gratia » – par exemple

ELISA :	« Enzyme-linked immunosorbent assay » – dosage d'immunoabsorption par enzyme liée
ERK :	« Extracellular signal-regulated kinases » – kinases régulées par des signaux extracellulaires
ESI :	« Electrospray ion source » – source d'ionisation par électronébuliseur
FBS :	« Fetal bovine serum » – sérum de veau fœtal
Fhu :	Récepteur du ferrichrome
G1 (phase) :	« Gap-1 phase » – phase G1 du cycle cellulaire
G2/M (phase) :	« Gap-2 and mitotic phase » – phase G2 et de mitose du cycle cellulaire
GP :	Glycoprotéine
Hgb :	Récepteur de l'hémoglobine
HP-PRRSV :	« Highly pathogenic PRRSV » – VSRRP hautement pathogène
i.e. :	« Isto es » – comme
IF :	Immunofluorescence
IFN :	Interféron
IFNAR :	Récepteur des interférons de type I
IFNGR :	Récepteur des interférons de type II
IKK $\beta$ :	« Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta » – inhibiteur du facteur nucléaire kappa-B kinase sous unité beta
IL:	Interleukine
IRAK :	« Interleukin-1 receptor-associated kinase » v kinase associée au récepteur de l'interleukine-1
JNK :	« c-Jun N-terminal kinase » – kinase N-terminale de la protéine cellulaire Jun
kDa :	Kilodalton
LC-MS/MS :	« Liquid chromatography tandem mass spectrometry » – chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem
LPS :	Lipopolysaccharides
MAPK :	« Mitogen-activated protein kinase » – protéine kinase activée par un mitogene

Mpb :	Méga paires de bases
MEM :	« Minimum essential medium » – milieu essentiel minimum
MOI :	« Multiplicity of infection » – multiplicité d'infection
m/z :	Ratio masse sur charge de l'ion d'intérêt
nd :	Non défini
NEAA :	« Non-essential amino acid » – solution d'acides aminés non essentiels
NF-κB :	« Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells » – facteur nucléaire régulant la synthèse de la chaîne légère κ des lymphocytes B
NLS :	« Nuclear localization sequence » – séquence de localisation nucléaire
NMR :	« Nuclear magnetic resonance » – voir RMN
NOD :	« Nucleotide-binding oligomerization domain » – domaine de liaison des nucléotides et d'oligomérisation
NoLS :	« Nucleolar localization signal sequence » – séquence de localisation nucléolaire
nsp :	« Non structural protein » – protéines non structurales
ORF :	« Open reading frame » – cadres ouverts de lecture
PBS :	« Phosphate-buffered saline without potassium chloride » – tampon phosphate salin sans chlorure de potassium
PCR :	« Polymerase chain reaction » – réaction en chaîne par polymérase
PCV2 :	« Porcine circovirus type 2 » – circovirus porcin de type 2
p.ex. :	Par exemple
PGA :	Poly-N-acetylglucosamine
PI :	« Propidium iodide » – iodure de propidium
PLK :	« Polo-like kinase » – protéine kinase ressemblant à la protéine kinase Polo
PRDC :	« Porcine respiratory disease complex » – voir CRP
PRRSV :	« Porcine reproductive and respiratory syndrome virus » – voir VSRRP
Protéine E :	Protéine d'enveloppe
Protéine M :	Protéine de la membrane
Protéine N :	Protéine de la nucléocapside

PST (domaine) :	Proline-sérine-thréonine (domaine)
Raf-A :	« Serine/threonine-protein kinase A-Raf » – protéine kinase sérine/thréonine A-Raf
Rf :	« Retention factor » – facteur de rétention
Rip2 :	« Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2 » – Récepteur interagissant avec des protéines kinase 2 sérine/thréonine
RMN :	Résonance magnétique nucléaire
RNase-A :	Ribonuclease-A
RT-PCR :	« Reverse transcription PCR » – reverse transcriptase PCR
RTX :	« Repeats in toxin » – toxine avec séquence répétée
SALLE :	« Salting-out liquid-liquid extraction » – relargage de sel par extraction liquide-liquide
SBE-13 :	SBE-13 chlorhydrate-(N-[[4-[(6-Chloro-3-pyridinyl)méthoxy]-3-méthoxyphényl]méthyle]-3,4-diméthoxybenzèneéthanamine chlorhydrate)
SEM :	« Standard error of the mean » – erreur standard de la moyenne
SIV :	« Swine influenza virus » – virus de la grippe porcine
SJPL :	« St. Jude porcine lung cells » – cellules de poumon de porc St. Jude
SPF :	« Specific pathogen free » – exempt d'agents pathogènes spécifiques
S (phase) :	« Synthesis phase » – phase de synthèse du cycle cellulaire
SRRP :	Syndrome reproducteur et respiratoire porcin
T25 / T75 (flasque) :	Flasque de culture cellulaire possédant une surface de culture de 25 ou de 75 cm <sup>2</sup>
TBP :	« Transferrin-binding protein » – protéines de liaison à la transferrine
TIC :	« Total ion current chromatogram » – chromatogramme du total d'ion existant
TLC :	« Thin-layer chromatography » – chromatographie sur couche mince
TNF :	« Tumor necrosis factor » – facteur de nécrose tumorale
UVA :	« Ultraviolet A light » – lumière ultraviolette de type A
VIH :	Virus de l'immunodéficience humaine
VSRRP :	Virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin

v/v (%) :	Pourcentage volume/volume
w/v (%) :	« Weight/volume percentage » – pourcentage poids/volume
XIC :	« Extracted ion chromatogram » – chromatogramme de l'ion extrait

## DÉDICACES

À mon épouse,

À mes proches,

À Alain / 30 Décembre 2013



## REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier toutes les personnes qui m'ont encadré, encouragé ou supporté durant ces deux années de maîtrise.

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Dr Mario Jacques, pour son accueil dans le laboratoire, sa confiance, sa patience et pour le temps qu'il m'a consacré. Je le remercie également de m'avoir proposé ce projet de recherche, je n'aurai probablement pas pu espérer meilleur projet pour ma maîtrise; un projet touchant à bien des domaines qui m'étaient alors inconnus. Merci également à mes deux codirecteurs, Dr Carl A. Gagnon et Dr Francis Beaudry, pour leur accueil, leur patience, mais aussi et surtout pour le temps qu'ils m'ont consacré. Merci aux organismes subventionnaires (FRQNT et CRSNG), ainsi qu'au CRIPA pour le soutien financier indispensable et sans lequel le contexte aurait été bien différent...

Merci aux membres des différents laboratoires. À commencer par Josée Labrie, agente de recherche dans le laboratoire de Dr Mario Jacques, pour tout ce qu'elle m'a appris, pour son écoute, pour son aide et finalement pour sa patience. Merci au Dr Yannick Tremblay, pour son aide, pour ses avis critiques et le temps passé à la correction de textes anglais. Aussi, j'aimerais remercier Skander Hathroubi, Yenny Hernandez, Dr Chantale Provost, Isabel Mandeville pour les diverses discussions et solutions apportées. Un merci au laboratoire du Dr Carl A. Gagnon pour le VSRRP.

J'aimerais spécialement remercier mes parents et mes sœurs pour leurs appuis. Un énorme merci à ma belle-famille qui m'a supporté, et qui ont été grandement présent et utile par leurs aides, discussions, appuis et autres. Je m'estime chanceux d'avoir une belle-famille comme vous, alors que la famille est de l'autre côté de l'océan.

Enfin, je veux spécialement remercier ma moitié présente à mes côtés autant dans les moments les plus joyeux que les moments plus difficiles.

# **INTRODUCTION**

Les éleveurs de porc sont confrontés à divers problèmes liés aux pathogènes porcins, responsables de nombreuses maladies et causants d'importantes pertes économiques. L'un des problèmes le plus fréquemment retrouvé chez le porc est le complexe respiratoire porcine (CRP). Ce complexe est associé à un ralentissement de la croissance des porcs et peut mener à la mort de l'animal. Le CRP est une entité clinique qui est multifactorielle; dépendant entre autres de facteurs environnementaux, du système de production et de gestion de l'élevage, de facteurs spécifiques au porc (p.ex. la génétique et l'âge) ou encore de l'interaction entre deux pathogènes. En effet, une infection mixte peut entraîner une exacerbation des symptômes et de la maladie. Parmi les pathogènes porcins pouvant causer le CRP, nous retrouvons: le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcine (VSRRP), *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Streptococcus suis*, le virus de l'influenza porcine (SIV), le circovirus porcine type 2 (PCV2), ou encore *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Opriessnig et al., 2011a). Durant ma maîtrise j'ai étudié l'interaction entre deux de ces pathogènes, le VSRRP et *A. pleuropneumoniae*.

*Actinobacillus pleuropneumoniae* est un coccobacille à Gram négatif, membre de la famille des *Pasteurellaceae*. Cette bactérie est responsable de la pleuropneumonie porcine; une maladie bien contrôlée en Amérique du Nord mais toujours problématique en Amérique Latine et dans certains pays d'Asie et d'Europe. *Actinobacillus pleuropneumoniae* possède de multiples facteurs de virulence permettant à la bactérie d'échapper au système immunitaire et de proliférer. Ces facteurs de virulence sont les lipopolysaccharides, la capsule polysaccharidique, divers systèmes d'acquisition du fer, la capacité à former des biofilms ainsi que la possibilité de produire et de sécréter des toxines Apx (Chiers et al., 2010). En raison de ces toxines, un mutant capable de synthétiser des toxines inactives a été utilisé (Lévesque et al., 2014).

Le VSRRP est un virus appartenant à l'ordre des *Nidovirales*. Il s'agit d'un virus enveloppé possédant un génome sous forme d'un ARN simple brin positif (ARNsb+). Ce virus est responsable d'importants troubles de reproduction chez la truie et de problèmes respiratoires. Des mises bas prématurées ainsi que des avortements tardifs ou des mises bas de mort-nés, sont des manifestations retrouvées chez de nombreuses truies infectées (Thiry,

2004). Chez les verrats, les manifestations de l'infection prennent la forme d'une réduction de la quantité et de la qualité de la semence; diminution du nombre, malformation et réduction de la mobilité des spermatozoïdes (Thiry, 2004). Le VSRRP est le pathogène le plus important dans l'industrie porcine et est responsable d'importantes pertes économiques estimées à plus de 600 millions \$US par année, aux États-Unis uniquement (Holtkamp et al., 2013). La principale problématique liée au VSRRP est qu'il n'existe aucun moyen de contrôle efficace contre ce virus si ce n'est des mesures de biosécurité afin d'éviter l'introduction du virus dans l'élevage.

En vue d'étudier les interactions entre *A. pleuropneumoniae* et le VSRRP, nos laboratoires ont mis en place un modèle de coinfection utilisant la lignée cellulaire « St. Jude porcine lung » (SJPL). Ce modèle a permis la mise en évidence d'un effet antiviral d'*A. pleuropneumoniae* contre le VSRRP. Cette activité antivirale se retrouve dans le surnageant de culture d'*A. pleuropneumoniae*; et plus particulièrement dans l'ultrafiltrat ( $\leq 1$  kDa) (Lévesque et al., 2014).

À la suite de ces découvertes, nous avons émis l'hypothèse que le surnageant de culture d'*A. pleuropneumoniae* pourrait induire une stimulation ou une réponse spécifique au niveau des cellules SJPL, et que celle-ci serait responsable de l'effet antiviral contre le VSRRP. Nos objectifs sont donc d'identifier les voies cellulaires modulées par le surnageant de culture et d'identifier la ou les molécules responsables de l'activité antivirale contre le VSRRP.

## **RECENSION DES ÉCRITS**

## 1 Le complexe respiratoire porcin

Le porc est sujet à différentes maladies dont certaines peuvent être difficiles à diagnostiquer. Elles peuvent provoquer la mort de l'animal ou la perte d'un troupeau et causent donc de nombreuses pertes économiques dans les filières et les productions concernées.

Parmi celles-ci : le complexe respiratoire porcin. Il s'agit d'une entité clinique touchant les porcs en engraissement. Il a été démontré que l'âge des porcs était un facteur important pour le complexe respiratoire porcin, cette entité clinique restant tout de même multifactorielle. Le complexe respiratoire porcin peut être caractérisé grâce à divers symptômes, parmi lesquels nous retrouvons : des troubles respiratoires, de la fièvre et une léthargie. Ces derniers entraînant une perte ou un ralentissement de la croissance et peuvent causer la mort de l'animal (Choi et al., 2003; Opriessnig et al., 2011a).

Le complexe respiratoire porcin peut être provoqué par différents microorganismes. En les classant par ordre d'importance, nous pouvons retrouver des virus tels que le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP), le SIV et le PCV2. Nous pouvons également y retrouver des bactéries comme *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Streptococcus suis* et *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Brockmeier et al., 2001; Choi et al., 2003; Opriessnig et al., 2011a). Opriessnig et collaborateurs ont récemment publié une revue très complète portant sur le complexe respiratoire porcin. Pour plus d'information sur le complexe respiratoire porcin, les pathogènes impliqués et quelques statistiques, il est possible de s'y référer (Opriessnig et al., 2011a).

Durant mon projet de maîtrise, j'ai étudié un mécanisme d'effet antiviral contre le VSRRP qui est causé par *Actinobacillus pleuropneumoniae*, et ce dans un modèle en culture cellulaire. Nous verrons les mécanismes de pathogénèse associés à ces deux microorganismes pathogènes plus loin dans cette revue de littérature. Nous verrons également brièvement les maladies qui leurs sont associées.

## 2 *Actinobacillus pleuropneumoniae*

### 2.1 Quelques généralités

#### 2.1.1 Son historique et sa taxonomie

*Haemophilus pleuropneumoniae* est une bactérie qui fut découverte aux États-Unis dans des lésions pulmonaires d'un porc atteint de pleuropneumonie en 1957 (Pattison et al., 1957). Par la suite, l'industrialisation des élevages a conduit à la dissémination et à la prolifération de celle-ci. Ceci eu pour finalité une augmentation du nombre de cas de pleuropneumonie porcine et donc une augmentation des pertes économiques pour l'industrie porcine.

La taxonomie d'*H. pleuropneumoniae* fut réévaluée en 1983 après qu'un rapprochement phylogénétique entre *H. pleuropneumoniae* et le genre *Actinobacillus* fut mis au jour. Cette bactérie changea ainsi de genre et passa sous celui d'*Actinobacillus* pour devenir *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Pohl et al., 1983). Celui-ci appartient à la famille des *Pasteurellaceae*, une famille comptant différents genres bactériens incluant les genres : *Pasteurella*, *Mannheimia* et *Haemophilus*.

*Actinobacillus pleuropneumoniae* est un coccobacille à Gram négatif qui est capsulé et non sporulant. La taille de son génome est de l'ordre de 2.4 Mpb et il présente une certaine variabilité selon le sérotype de la souche (Chevallier et al., 1998; Oswald et al., 1999).

#### 2.1.2 Différents biotypes et sérotypes

*In vitro*, *A. pleuropneumoniae* est réparti en deux biotypes. Ceux-ci étant définis par la dépendance vis-à-vis du  $\beta$ -nicotinamide adénine dinucléotide ( $\beta$ -NAD). Une souche  $\beta$ -NAD-dépendante sera alors dite de biotype 1 alors qu'une souche de  $\beta$ -NAD-indépendante sera dite de biotype 2 (Niven et Lévesque, 1988). Parmi ces deux biotypes d'*A. pleuropneumoniae*, on retrouve plusieurs sérotypes. Il en existe quinze à l'heure actuelle (Blackall et al., 2002). Leur classification est basée sur la présence de variations au niveau des polysaccharides de surface (Dubreuil et al., 2000).

Le Tableau I regroupe les différentes relations entre biotypes, sérotypes et virulence chez *A. pleuropneumoniae*. Les sérotypes 1 et 5 possèdent deux sous-sérotypes, nommés a et b pour chacun d'eux, soit : 1a/1b et 5a/5b. Ces derniers ainsi que les sérotypes 3, 6, 8, 12, 10, 11 et 15 font partie du biotype 1. Toutes les souches appartenant à ces sérotypes sont donc  $\beta$ -NAD-dépendantes (Blackall et al., 2002). Une des souches de référence la plus utilisée en laboratoire est de sérotype 1. Elle correspond à l'isolat de Shope : S4074 (Shope, 1964). Le sérotype 14 est quant à lui exclusivement du biotype 2. Les autres sérotypes, soient les 2, 4, 7, 9 et 13 appartiennent aux deux biotypes (Schaller et al., 1999). Chez *A. pleuropneumoniae* les souches peuvent être plus ou moins virulentes, mais il est connu que les souches les plus virulentes appartiennent aux sérotypes 1 et 5 (Beck et al., 1994; Gottschalk, 2007).

Tableau I. Regroupement des sérotypes selon le biotype et la virulence des souches chez *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Adapté de Gottschalk (2007).

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

Légende : a : classification basée sur la virulence des souches Nord-Américaines; la virulence étant définie comme la gravité de l'infection. b : les biotypes I et II diffèrent au niveau de la virulence. c : seules les souches de biotype I ont été isolées en Amérique du Nord. d : seulement les souches du biotype II ont été isolées en Amérique du Nord. e : observations non publiées. nd : non défini.

D'un point de vue épidémiologie, *A. pleuropneumoniae* est un microorganisme présent aux quatre coins du globe. En ce qui concerne l'Amérique du Nord, les sérotypes



prédominants sont les sérotypes 1, 5 et 7. Le sérotype 7 n'étant présent qu'au Canada. Une récente étude portant sur le sérotypage de souches d'*A. pleuropneumoniae*, porterait à croire que le sérotype 8 serait prédominant à hauteur de 72% au Canada (Gottschalk et Lacouture, 2014). Ceci indiquant une variation dans les proportions des différents sérotypes au cours du temps. Quant au sérotype 2, il est prédominant en Asie (Corée, Japon, Thaïlande, etc.) ou encore en Europe (Allemagne, Benelux, Espagne, Scandinavie, Suisse, etc.). Des suivis épidémiologiques réalisés confirment le changement de dominance des sérotypes ou l'apparition de certains sérotypes au cours du temps. Voir le Tableau II pour la répartition des différents sérotypes à travers le monde.

Tableau II. Répartition des sérotypes d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* à travers le monde.

Pays	Sérotypes dominants	Références
Allemagne	2, 7, 9	(Kielstein et Wuthe, 1998; Schimmel et Hass, 1983)
Australie	12 (41%), 1 (30%) 7 (24%)	(Blackall et al., 1999)
Belgique	2 (36%), 3 (21%)	(Dom et al., 1994; Maes et al., 2002)
Canada	1 (68%), 5 (23%), 7	(Mittal et al., 1998; Mittal et al., 1992)
Corée	2 (56%), 5 (28%)	(Min et Chae, 1999)
Croatie	2, 9	(Habrun et al., 1998)
Danemark	2 (84%)	(Klausen et al., 2007; Nielsen, 1986; Nielsen et al., 1996)
Espagne	4 (42%), 7 (17%), 2 (24.3%)	(Gutiérrez et al., 1995; Maldonado et al., 2009)
États-Unis	1, 5	(Fales et al., 1989)
France	9	(Dubreuil et al., 2000)
Japon	2, 1, 5	(Ito, 2010; Morioka et al., 2008; Yoshimura et al., 2002)
République tchèque	2 (19%), 9/11 (55%)	(Kucerova et al., 2005)
Hongrie	2, 3, 7	(Fodor et al., 1989; Molnár, 1990)
Irlande	3	(Power et al., 1983)
Norvège	2	(Falk et al., 1991; Nielsen, 1984)
Pays-Bas	2, 9, 11	(Kamp et al., 1987)
Royaume-Uni (incluant Pays de Galles)	6 (10%), 8 (78%)	(O'Neill et al., 2010)
Suède	2	(Nielsen, 1984)
Suisse	2	(Nielsen, 1984)
Thaïlande	11 (29%), 5 (31%)	(Assavacheep et al., 2003)

## 2.2 Les différents facteurs de virulence présents chez *Actinobacillus pleuropneumoniae*

*Actinobacillus pleuropneumoniae* est une bactérie possédant de multiples facteurs de virulence. Comme toutes les bactéries à Gram négatif, *A. pleuropneumoniae* possède des lipopolysaccharides (LPS). Parmi les autres facteurs de virulence, il est aussi possible de retrouver une capsule polysaccharidique (CPS), divers systèmes d'acquisition du fer, sa capacité à former des biofilms et sa possibilité de produire et de sécréter des toxines. Nous verrons dans les prochaines sections, chacun de ces facteurs de virulence.

### 2.2.1 Les lipopolysaccharides

Les LPS sont l'un des composants principaux de la paroi bactérienne des bactéries à Gram négatif. Il s'agit d'une structure polysaccharidique composée de trois parties. En partant de la plus proche du peptidoglycane à la plus éloignée de celui-ci, nous retrouvons le lipide A, suivi du noyau oligosaccharidique et enfin de l'antigène-O (Ag-O) (Miller et al., 2005). La Figure 1 illustre de manière schématique la structure d'un LPS. Dans les prochains paragraphes seront respectivement décrits brièvement le lipide A, le noyau oligosaccharidique et l'Ag-O.

Le lipide A est la structure du LPS qui permet l'ancrage de ce dernier à la membrane externe de la cellule bactérienne. Il se compose de dérivés de glucosamine. Outre cette fonction d'ancrage du LPS à la membrane, le lipide A a une fonction d'endotoxine.

Le noyau oligosaccharidique est composé de sucres, il s'agit de la structure centrale du LPS. Il est possible de retrouver l'appellation du noyau oligosaccharidique sous la forme de *core*. Le noyau est subdivisé en deux parties : le noyau interne et le noyau externe. Le noyau interne, situé aux côtés du lipide A est une structure très conservée au sein des différents sérotypes. À l'inverse le noyau externe, situé à proximité de l'Ag-O, est plus variable. Le noyau externe peut être composé de trisaccharides dans le cas des sérotypes 1, 6, 9 et 11 ou d'un seul résidu de D-glycéro-D-mannoheptose dans le cas des sérotypes 2 – 5, 7, 8, 12 – 15 (MacLean et al., 2004; Perry et MacLean, 2004; Perry et al., 2005; St Michael et al., 2004).

Par exemple, la différence entre les sérotypes 1, 2 et 5 au niveau du noyau est seulement basée au niveau des radicaux présents; la structure générale restant la même (St Michael et al., 2004). Ces différences dans la structure du noyau sont représentées au sein de la Figure 2.

Enfin, l'Ag-O est considéré comme la région la plus variable du LPS, sa composition variant d'un sérotype à l'autre. La longueur de l'Ag-O, qui dépend du nombre d'unités répétées, est très variable. La répétition pouvant être de quelques unités ou de plusieurs centaines d'unités. Les souches de sérotype 1 auront un Ag-O composé d'unités répétées de 2- $\alpha$ -rhamnopyranosyls, de 1- $\alpha$ -D-glycopyranosyl et de 1-2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucose (Altman et al., 1986; Jacques, 2004).

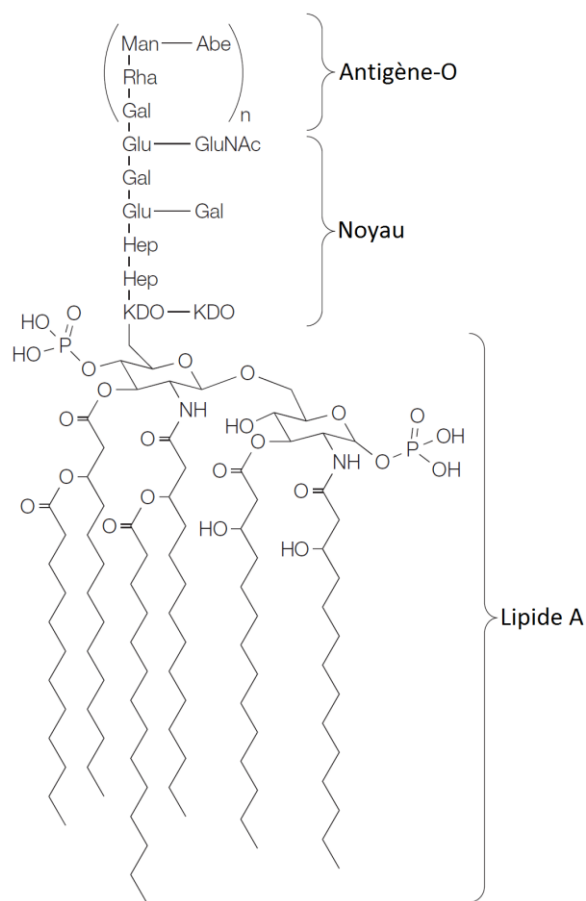


Figure 1. Représentation schématique de la structure générale des LPS présents chez les bactéries à Gram négatif. Figure modifiée provenant de Miller et collaborateurs (2005).

Légende : les LPS sont des molécules composés de trois parties : l'antigène-O, le noyau et le lipide A. Le lipide A est composé d'une longue chaîne polycarbonée qui permet le maintien du LPS ancré à la membrane externe de la paroi des bactéries à Gram négatif, il s'agit donc de

la structure la partie la plus à l'intérieur du LPS. Le noyau est la structure centrale du LPS, il est composé d'oligosaccharide. L'antigène-O est la partie la plus variable du LPS, il est composé d'unité répétée de 2- $\alpha$ -rhamnopyranosyls, de 1- $\alpha$ -D-glycopyranosyl et de 1-2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucose. Il s'agit de l'extrémité extérieure du LPS.

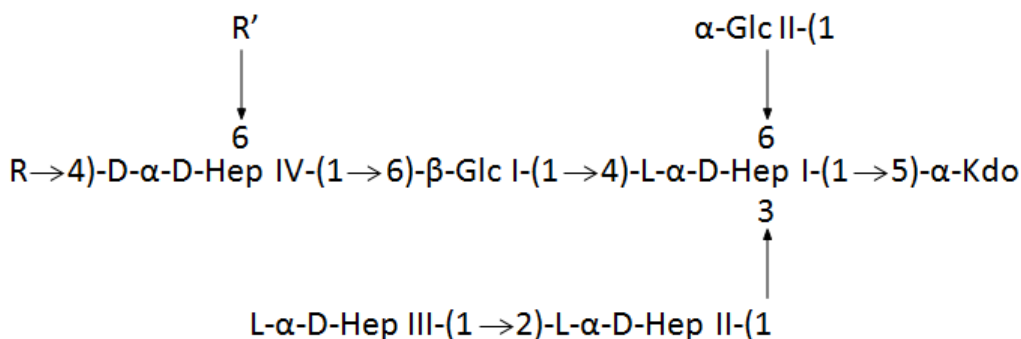


Figure 2. Représentation générale de la structure du noyau du lipopolysaccharide d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*. Figure extraite de St Michael et collaborateurs (2004).

Légende : le noyau du LPS est la structure centrale de celui-ci. La structure générale du noyau reste constante tandis que les radicaux R et R' sont variables en fonction des sérotypes.

Sérototype 1 : R = (1S)-Gal $\alpha$ NAc-(1 $\rightarrow$ 4,6)- $\alpha$ -Gal II-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -Gal I-(1 $\rightarrow$ , R' = H

Sérototype 2 : R =  $\beta$ -Glc III-(1 $\rightarrow$ , R' = D- $\alpha$ -D-Hep V-(1 $\rightarrow$

Sérototype 5a et 5b : R = H, R' = D- $\alpha$ -D-Hep V-(1 $\rightarrow$

Le LPS joue plusieurs rôles lors d'une infection. L'un des principaux est un rôle dans l'immunité et la réponse immunitaire. Chez le porc, une injection intrapéritonéale de LPS induit une augmentation de l'interleukine 6 (IL-6) (Webel et al., 1997). Celle-ci atteint son maximum en 2 h post-inoculation et est également accompagnée d'une augmentation du facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ainsi que du cortisol qui atteignent leur maximum en 4 h (Baarsch et al., 1995; Webel, 1997; Webel et al., 1997). L'augmentation du TNF- $\alpha$  peut entraîner chez le porc des signes de dépression accompagnés d'une perte de poids et de problèmes respiratoires (Harding et al., 1997).

En plus d'être immunogène, le LPS joue un rôle dans l'adhésion des bactéries (Ramjeet et al., 2005). Concernant *A. pleuropneumoniae*, plusieurs études ont démontré sa capacité à se lier au mucus trachéal ou aux voies respiratoires (Auger et al., 2009; Bélanger et al., 1994; Jacques et al., 1991; Paradis et al., 1999). Ces dernières observations ayant été

réalisées *in vitro* sur des sections de trachée de porc en culture, et *ex vivo* sur des sections congelées de trachée et de poumon ou encore sur de l'épithélium buccal (Bélanger et al., 1990; Hamer-Barrera et al., 2004; Jacques et al., 1991; Paradis et al., 1994). L'adhésion d'*A. pleuropneumoniae* à ces différents tissus étant rendue possible grâce à des interactions avec les glycosphingolipides cellulaires ou à l'hémoglobine (Abul-Milh et al., 1999; Archambault et al., 1997; Archambault et al., 1999; Bélanger et al., 1995; Hamer-Barrera et al., 2004). Il a été démontré qu'une souche virulente de sérotype 1 subissant une mutation sur le LPS perdait sa virulence; ceci confirme que l'étape d'adhésion et les LPS sont importants pour la pathogénéicité d'*A. pleuropneumoniae* (Ramjeet et al., 2008a).

### 2.2.2 La capsule

La capsule est une structure organisée qui est composée de polysaccharides (CPS) liés entre eux par des liaisons phosphodiester (Perry et al., 1990). La Figure 3 illustre la structure de base d'un CPS. En réalité cette dernière est répétée  $n$  fois au niveau de la capsule afin de former des CPS d'une longueur variable.

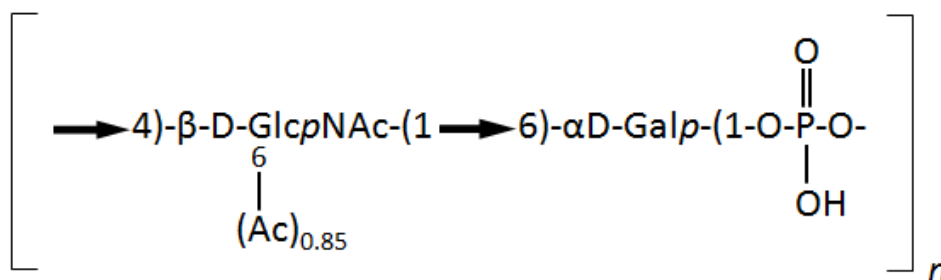


Figure 3. Représentation schématique de la structure de base de polysaccharides de capsule d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* de sérotype 1. Figure provenant de Perry et collaborateurs (1990).

Légende : la capsule est composée d'une même unité de base répétée plusieurs fois ( $n$  fois). Cette unité de base contient de l'acétylglucosamine ( $\beta\text{-D-GlcpNAc}$ ) liée en 1-6 à du galactose-phosphate ( $\alpha\text{-D-Galp-PO}_4^{3-}$ ).

En ce qui concerne les différentes fonctions de la capsule, des études de mutagenèse ont démontré que dans le cas où une souche subirait une mutation sur un gène codant pour la capsule, alors cette souche deviendrait moins virulente (Bandara et al., 2003; Inzana et al., 1988; Inzana et al., 1993; Jensen et Bertram, 1986; Rioux et al., 2000; Rosendal et MacInnes, 1990; Ward et Inzana, 1994). Ceci confirmant l'importance relative à l'épaisseur et à la composition de la capsule (Bandara et al., 2003). Également, il a été démontré que contrairement aux souches acapsulées, les souches possédant une capsule pouvaient résister à l'opsonisation et aux voies du complément. Ceci confère donc un avantage aux bactéries capsulées contre le système immunitaire (Inzana et al., 1988; Rycroft et Cullen, 1990; Thwaites et Kadis, 1993; Ward et Inzana, 1994). Enfin, la dernière fonction que nous mentionnerons est un rôle lors de l'adhésion. La capsule ne semble pas impliquée directement dans l'adhésion; mais elle semble plutôt masquer les facteurs d'adhésion (Rioux et al., 2000; van Overbeke et al., 2002). Il a été démontré *in vitro* que lors de l'étape d'adhésion, il y avait une diminution de l'expression des gènes codants pour les CPS (Auger et al., 2009).

### 2.2.3 Les toxines Apx

L'un des plus importants facteurs de virulence d'*A. pleuropneumoniae* est sa capacité à synthétiser des toxines. En effet, *A. pleuropneumoniae* est capable de produire quatre exotoxines, de ApxI à ApxIV, qui appartiennent à la famille des toxines RTX (*repeats in toxin*). Cette famille de toxine est produite par de nombreuses bactéries à Gram négatif et est majoritairement répandue chez les *Pasteurellaceae*. Elles provoquent la formation de pores dans les membranes cellulaires (Frey, 2011; Frey et Kuhnert, 2002; Lally et al., 1999; Masin et al., 2013). Les toxines Apx sont codées par un opéron et les gènes sont transcrits dans l'ordre suivant : *apxCABD*. Le gène *apxA* code pour la protoxine; les gènes *apxB* et *apxD* codent pour le système de sécrétion de celle-ci. Enfin, le gène *apxC* code pour une protéine qui activera la protoxine en toxine par acylation post-traductionnelle (Frey et al., 1994; Gygi et al., 1990).

La toxine ApxI est une toxine fortement hémolytique et cytotoxique liant très fortement le calcium. Elle a un poids moléculaire de 105 kDa (Frey et al., 1993b). Les

sérotypes 1, 5, 9, 10 et 11 possèdent l'opéron complet *apxICABD* alors que les sérotypes 2, 4, 6, 7, 8, 12 et 15 ne possèdent quant à eux que le système de sécrétion *apxIBD*. Le sérotypes 3 ne possède aucun gène *apxI*. La toxine ApxII a un poids moléculaire d'environ 104 kDa et est produite par toutes les souches, exception faite pour les souches de sérotipe 10. Cette toxine est faiblement hémolytique et est peu cytotoxique. N'ayant pas de système sécrétoire à elle-même, elle utilise le système de sécrétion de la toxine ApxI (Frey et al., 1993b; Frey et Nicolet, 1988; Frey et al., 1992; Kamp et al., 1991). La toxine ApxIII ne possède pas d'activité hémolytique, mais est fortement cytotoxique et peut déclencher l'apoptose des macrophages et des neutrophiles (Kamp et al., 1991; Seah et Kwang, 2004). Cette toxine, qui a un poids moléculaire de 120 kDa, est retrouvée chez les sérotypes 2–4, 6 et 8. Elle n'a jamais été identifiée chez les souches de biotypes II (Beck et al., 1994). Enfin, la toxine ApxIV ne semble être exprimée qu'uniquement *in vivo* (Schaller et al., 1999). Elle est peu hémolytique mais a un rôle important dans le développement de la réponse immunitaire contre *A. pleuropneumoniae*. Seule, elle n'est pas suffisante pour déclencher une réponse immunitaire (Huang et al., 2006). Cependant, elle pourrait être importante en tant qu'adjuvant pour un vaccin contre *A. pleuropneumoniae* (Wang et al., 2009). Le Tableau III récapitule les différentes informations présentées dans la précédente section.

Tableau III. Répartition des différents génotypes des toxines Apx selon les sérotypes d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*. Données regroupées des publications de Blackall et collaborateurs (2002) ainsi que de Frey (1995).

Sérotypes	<i>apxI</i>		<i>apxII</i>		<i>apxIII</i>		<i>apxIV</i>
	CA	BD	CA	BD	CA	BD	A
1, 5, 9, 11	+	+	+	-	-	-	+
2, 4, 6, 8	-	+	+	-	+	+	+
3	-	-	+	-	+	+	+
7, 12	-	+	+	-	-	-	+
10	+	+	-	-	-	-	+
13, 14	-	+	+	-	-	-	+
15	-	+	+	-	+	+	+



En ce qui concerne l'expression des gènes *apx* ainsi que la synthèse des toxines, il a été démontré qu'en cas de contact avec le mucus bronchoalvéolaire, *apxIVA* voyait son expression diminuée (Lone et al., 2009a, b). Au contraire, le gène est surexprimé lorsque la bactérie se trouve dans les lésions pulmonaires (Baltes et Gerlach, 2004). Également, il a été démontré une interaction entre les LPS et la synthèse des toxines ApxI et ApxII. Une mutation du LPS au niveau du noyau externe affectant les interactions entre le LPS et les toxines; rend alors les toxines moins cytotoxiques (Ramjeet et al., 2008a). Une suppression des gènes codants pour la protoxine ou une mutation dans celle-ci (p.ex. ApxIA336) entraîne une perte des activités hémolytique et cytotoxique lors d'une infection de cellules en culture par la bactérie mutante (Chang et al., 2014; Tremblay et al., 2013).

#### 2.2.4 Les systèmes d'acquisition du fer

Le fer est un élément indispensable à de nombreux microorganismes. Au cours de l'infection d'un organisme, les bactéries doivent trouver le moyen d'en obtenir activement, car celui-ci n'est pas présent sous forme de fer libre. *Actinobacillus pleuropneumoniae* a la capacité d'utiliser le fer contenu dans la transferrine porcine, l'hémoglobine ainsi que celui lié aux sidérophores (Archambault et al., 1999; Bélanger et al., 1995; Deneer et Potter, 1989; Gerlach et al., 1992; Gonzalez et al., 1990; Gonzalez et al., 1995; Mikael et al., 2002; Mikael et al., 2003; Niven et al., 1989; Wilke et al., 1997).

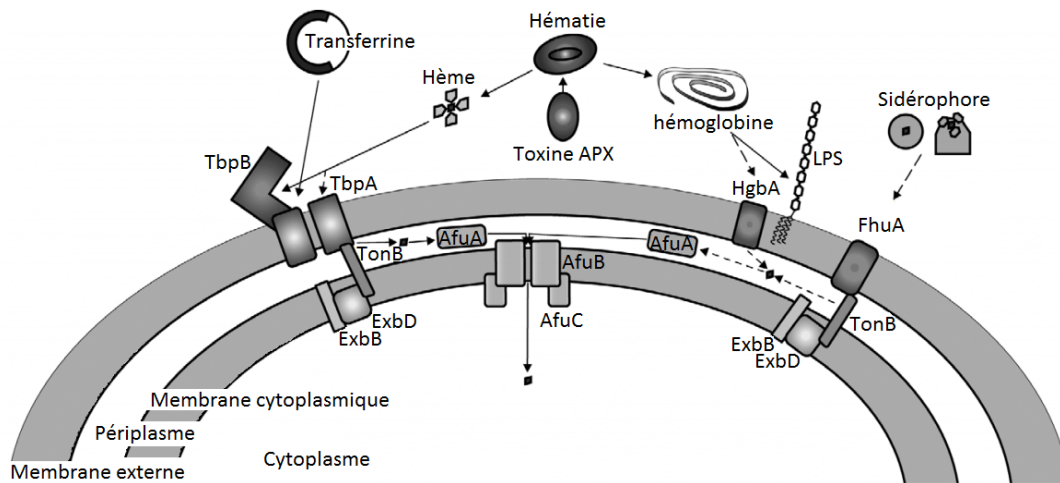


Figure 4. Représentation des différents mécanismes d'acquisition du fer retrouvés chez *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Figure modifiée de l'article de Bossé et collaborateurs (2002).

Légende : le fer est un élément pouvant provenir de différentes sources. Les premières sont les hèmes ou l'hémoglobine, molécules présentes dans les hématies. Afin de récupérer ce fer, la bactérie doit dans un premier temps lyser les cellules afin de libérer les hèmes et l'hémoglobine; puis dans un second temps libérer le fer grâce à des protéases. Les autres sources de fer sont la transferrine ou les sidérophores. Une fois libéré dans le milieu, le fer sera récupéré par la bactérie grâce aux récepteurs TbpA et TbpB, HgbA ou FhuA, avant d'être transporté jusqu'au cytoplasme par les protéines AfuA, AfuB et AfuC.

La transferrine est une protéine de l'hôte permettant le transport du fer. Chez *A. pleuropneumoniae*, il a été retrouvé les gènes codants pour des protéines de liaison à la transferrine (TBP) : *tbpA* et *tbpB*, présents sous forme de l'opéron *tbpAB*. Les deux gènes *tbpA* et *tbpB* sont co-transcrits avec les gènes *exbB* et *exbD*, opéron *exbBD*, sous forme d'ARN polycistroniques (Gonzalez et al., 1995; Tonpitak et al., 2000). Lors d'une diminution de la présence de fer dans le milieu, il y a une induction des gènes précédemment cités dans le but d'obtenir une augmentation de la capacité de la bactérie à capter le fer de la transferrine (Tonpitak et al., 2000). TbpA est une protéine qui a un poids moléculaire de 100 kDa, celui de TbpB est de 60 kDa (Daban et al., 1996; Gerlach et al., 1992; Gonzalez et al., 1995; Kim et Lee, 2006; Medrano et al., 1997; Wilke et al., 1997). Ce complexe protéique se retrouve dans la membrane externe des bactéries (Gonzalez et al., 1990; Ricard et al., 1991). Il a pour

fonction de fixer le fer de la transferrine puis de l'internaliser grâce au canal transmembranaire formé par TbpA (Daban et al., 1996; Fuller et al., 1998; Gerlach et al., 1992; Gonzalez et al., 1995; Wilke et al., 1997). Il a été démontré que la délétion des gènes *AtbpB*, *AtbpA* ou que la double délétion *AtbpBAtbpA* (donc de l'opéron), entraînait une incapacité de la bactérie à induire la maladie après infection par des aérosols chez le porc (Baltes et al., 2002). Les protéines TbpA et TbpB devraient donc se retrouver toutes deux présentes afin d'avoir une efficacité maximale pour la bactérie (Baltes et al., 2002; Fuller et al., 1998; Gonzalez et al., 1995; Litt et al., 2000).

Certaines souches d'*A. pleuropneumoniae* sont capables d'utiliser l'hémoglobine, l'hématine, l'hémine, ou encore l'hème libre comme unique source de fer pour leur croissance (Archambault et al., 2003; Bélanger et al., 1995; Deneer et Potter, 1989). La première étape dans le mécanisme d'acquisition du fer héminique est la lyse des hématies. Ce sont les toxines Apx, qui ont été décrites précédemment dans cette revue de littérature, qui sont responsables de la lyse des hématies (Frey et al., 1993a). *In vitro*, des protéases procèdent alors à la libération du fer héminique qui pourra alors être pris en charge par le système de la transferrine (Negrete-Abascal et al., 1994). L'hème sera alors transporté au travers de la paroi bactérienne grâce au récepteur de l'hémoglobine porcine : HgbA (Chin et al., 1996). Notons l'importance de ce récepteur car en cas d'absence de ce dernier, la souche est incapable d'interagir avec l'hémoglobine (Shakarji et al., 2006). Tout comme dans le cas de la transferrine, lorsque la bactérie est dans un milieu pauvre en fer, le récepteur HgbA est surexprimé (Deslandes et al., 2007; Srikumar et al., 2004).

Les différentes souches d'*A. pleuropneumoniae* possèdent toutes le système de récupération du fer des sidérophores de type hydroxamate : les récepteurs du ferrichrome. FhuA (75 kDa) est la protéine membranaire responsable de la captation du ferrichrome, elle est codée par *fhuA*. Son expression n'est pas augmentée en cas de restriction de fer (Mikael et al., 2002; Mikael et al., 2003). FhuA ne fonctionne pas seule, mais fait partie intégrante d'un groupe de quatre protéines encodées par l'opéron : *fhuCDBA*. Nous retrouvons donc la protéine FhuA qui est le récepteur du ferrichrome. Ferrichrome qui est ensuite transféré sur FhuD (35,6 kDa) qui est une protéine périplasmique responsable de sa translocation dans le périplasme. Les protéines FhuC (28,5 kDa) ainsi que FhuB (69,4 kDa) étant associées à la

membrane, elles seront responsables de l'internalisation de l'hydroxamate ferrique (Mikael et al., 2002).

Le fer étant un élément indispensable pour les bactéries, lors d'une diminution de sa quantité disponible dans l'environnement différents gènes (i.e. *tbpA*, *tbpB*, *hgbA*) seront surexprimés. Cette réaction a pour but d'augmenter la capacité de la bactérie à capter le peu de fer à disposition, et ce quelle qu'en soit la forme (Deslandes et al., 2007).

#### 2.2.5 Deux autres facteurs de virulence : la présence de fimbriae et la formation de biofilm

*Actinobacillus pleuropneumoniae* possède plusieurs autres facteurs de virulence parmi lesquels nous retrouvons, entre autres : la présence de fimbriae, un système d'acquisition du nickel, et la capacité de former des biofilms. Dans cette partie, nous n'aborderons que les aspects fimbriae et biofilm.

Les fimbriae sont connus pour jouer un rôle important dans l'infection. Chez *A. pleuropneumoniae*, un séquençage des protéines des fimbriae retrouvées chez les souches de sérotype 1, 2, 7 et 12 a démontré que les 12 premiers acides aminés retrouvés en position N-terminale étaient identiques à ceux de très nombreuses autres bactéries. Comme il a été démontré que la séquence protéique des fimbriae d'*A. pleuropneumoniae* était identique à celle des fimbriae de type IV de *Moraxella bovis* et que les fimbriae des deux microorganismes possédaient des antigènes communs (réactions immunologiques croisées), les fimbriae d'*A. pleuropneumoniae* ont été classés parmi les fimbriae de type IV (Zhang et al., 2000). Ces fimbriae de type IV sont codés par l'opéron *apfABCD* et semblent être régulés par des promoteurs sensibles à l'environnement et au contact entre bactéries ainsi qu'aux cellules épithéliales (Boekema et al., 2004; Stevenson et al., 2003). La production de ces fimbriae serait directement induite par le contact avec les cellules épithéliales, ceci expliquant leur importance dans la pathogénécité de la bactérie (Boekema et al., 2003; Boekema et al., 2004).

Les biofilms quant à eux sont définis comme étant une structure organisée, composée de bactéries attachées à un support et enveloppées dans une matrice d'exopolysaccharides (Costerton et al., 1978). Il est connu que dans certaines conditions *A. pleuropneumoniae* est capable d'en former que cela soit sur des surfaces abiotiques telles que des plaques de polystyrène ou des lames de verre; ou sur des surfaces biotiques comme des cellules en culture (Labrie et al., 2010; Tremblay et al., 2013). Les biofilms sont par ailleurs connus pour adhérer fermement aux cellules et avoir un rôle important dans la colonisation ainsi que dans la pathogenèse bactérienne (Hall-Stoodley et al., 2004; Kaplan et Mulks, 2005; Kaplan et al., 2004; Sutherland, 2001). En jouant sur différents gènes (i.e. *hns*, *galU*, *rnr1*, *dus*, *potD2*, *rpmF*), il est possible de muter *A. pleuropneumoniae* afin d'obtenir une variation quant à la production de biofilm (Grasteau et al., 2011). Une mutation entraînant une déficience pour la formation de biofilm peut également entraîner une perte de virulence d'*A. pleuropneumoniae* (Buettner et al., 2008).

Dans le but d'inhiber la formation de biofilm d'*A. pleuropneumoniae* ou de les éliminer, il est possible d'utiliser des ions (i.e. le zinc) ou certains traitements enzymatiques qui dégraderont l'acide polyglycolique (PGA) contenu dans la matrice des biofilms (i.e. glycoside hydrolase (également appelée Dispersin B)) (Tremblay et al., 2013; Wu et al., 2013). Le PGA est un polysaccharide de résidus N-acétyl-D-glucosamine liés en  $\beta$ -(1,6) (Izano et al., 2007) codé principalement par le gène *pgaC*. La mutation du gène *pgaC* rend le mutant déficient quant à la production de PGA; ceci ayant un impact direct dans la possibilité de produire des biofilms, le mutant ne pouvant pas produire de biofilm (Izano et al., 2007). Pour plus d'informations sur les biofilms, deux revues récentes sur la formation de biofilm par les bactéries pathogènes d'importance en sciences vétérinaires peuvent être consultées (Jacques et al., 2010; Tremblay et al., 2014).

### 2.3 La pleuropneumonie porcine : maladie, prophylaxie, diagnostic et traitements

La pleuropneumonie porcine peut être retrouvée sous différentes formes : aigüe, suraigüe et chronique (Bossé et al., 2002; Taylor, 1999). La forme suraigüe est la forme la plus

létale. Elle peut entraîner la mort de l'animal en moins de 24h. La forme aigüe quant à elle est une forme également très sévère qui présente de la morbidité et qui peut être fatale en moins de 48 h (Dubreuil et al., 2000). Lors d'une infection par *A. pleuropneumoniae*, les porcs présentent différents symptômes parmi lesquels : de la fièvre, une hyperventilation, une dyspnée et de la toux. Ils sont également sujets à des problèmes digestifs (anorexie, vomissements et diarrhées) ainsi qu'à des troubles neurologiques comme de l'ataxie (Bossé et al., 2002). Les atteintes pulmonaires sont principalement des nécroses associées à de la pleurésie fibrineuse, des hémorragies, de l'œdème et des exsudats (Taylor, 1999). Ceci est causé par les toxines bactériennes ainsi que par les cytokines libérées lors de la réponse immunitaire (Bertram, 1990). Les animaux ayant survécu aux phases suraigüe et aigüe rentrent alors en phase chronique et pourront disséminer la bactérie au sein du troupeau ou dans d'autres troupeaux (Bossé et al., 2002; Sebunya et al., 1983; Taylor, 1999).

La prophylaxie peut être abordée selon différents points. Le premier concerne la qualité de vie des animaux. Propreté, aération des locaux, stress ou encore densité de population sont des paramètres sensibles. La mise en quarantaine des nouveaux porcs et la réalisation de diagnostic sont nécessaires pour prévenir l'introduction de pathogènes. Dans l'éventualité d'une éclosion de maladie, il est également recommandé de séparer les porcs en unités de production afin d'éviter la propagation de l'infection à tous les porcs. Le dernier point au niveau de la prophylaxie contre *A. pleuropneumoniae* reste la vaccination (Ramjeet et al., 2008b). Il existe trois types de vaccins : les vaccins inactivés, les vaccins sous-unitaires et les vaccins vivants atténués. Les vaccins inactivés n'offrent qu'une protection réduite de par le fait que tous les sérotypes ne sont pas inclus dans le vaccin (Tarasiuk et al., 1994). Alors que les vaccins sous-unitaires, principalement fait à base de toxine ou de protéines membranaires sont efficaces (van den Bosch et Frey, 2003). Les vaccins vivants atténués restent cependant les plus efficaces à l'heure actuelle (Chung et al., 2012; Deslandes et al., 2010; Gouré et al., 2009; Liu et al., 2007).

Le diagnostic d'*A. pleuropneumoniae* peut être fait à partir de prélèvements provenant des cavités nasales, des amygdales, de l'oreille moyenne ou des poumons. Il existe une multitude de techniques d'identification pour *A. pleuropneumoniae* (Biberstein et al., 1977; Cho et al., 2002; Choi et al., 2001; Dreyfus et al., 2004; Dubreuil et al., 1996; Eamens et al.,

2012; Frey et al., 1994; Frey et al., 1989; Gagné et al., 1998; Gunnarsson et al., 1977; Inzana et Fenwick, 2001; Jansen et al., 1995; Klausen et al., 2002; Klausen et al., 2007; Mittal et al., 1982, 1983a, b; Mittal et al., 1993; Perfumo et al., 1983; Piffer et al., 1986; Rosendal et al., 1981; Shin et al., 2011). L'utilisation de la réaction en chaîne par polymérase (PCR) reste néanmoins privilégiée, que cela soit sur les gènes *tbpA* et *tbpB*, *apxIVA*, *cps* ou sur ensemble de gènes en utilisant la PCR multiplexe (Angen et al., 2008; da Costa et al., 2004; de la Puente-Redondo et al., 2000; Ito, 2010; Jaglic et al., 2004; Jessing et al., 2003; Klein et al., 2003; Lei et al., 2009; Serrano-Rubio et al., 2008; Tobias et al., 2012; Turni et Blackall, 2007). Le développement de nouvelles techniques de détection d'*A. pleuropneumoniae* par transcription inverse PCR (RT-PCR) en temps réel voit également le jour (Marois-Créhan et al., 2014; Tobias et al., 2012).

À cause de la rapidité de la maladie, le traitement n'est possible qu'en phase initiale. Même s'il est impossible de supprimer le portage, il est nécessaire d'injecter des antibiotiques pour réduire le taux de mortalité (Fittipaldi et al., 2005). Des inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycan ou de la parois (céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (ceftiofur), amoxicilline, pénicilline ou ampicilline), des inhibiteurs de la topoisomérase de type II (danofloxacin ou enrofloxacin), des inhibiteurs des sous-unités ribosomales ou de l'ARN ribosomique (florphénicol, lincomycine, tiamuline, doxycycline, tétracycline ou gentamicine), ou encore des inhibiteurs de la synthèse de l'ADN (triméthoprime), sont couramment utilisés en ce sens (Bousquet et al., 1997; Burton et al., 1996; Chang et al., 2002; Dom et al., 1994; Gutiérrez-Martín et al., 2006; Morioka et al., 2008; Norcia et al., 1999; Salmon et al., 1996; Shin et al., 2005; Stipkovits et al., 2001; Tanigawa et Sawada, 2002; Ueda et al., 1995; Ueda et Suenaga, 1995; Wallgren et al., 1999a, b; Yoshimura et al., 2002). Il faut cependant être prudent car une antibiothérapie en guise de prophylaxie peut provoquer des mutations spontanées chez *A. pleuropneumoniae* et donc empirer la situation car les antibiotiques en question ne pourront plus être utilisés à but curatif ce qui peut mener par exemple à un échec thérapeutique, à la mort de l'animal ou encore à la contamination d'un troupeau (Aarestrup et Jensen, 1999; Blanco et al., 2007; Ito et al., 2004; Matter et al., 2007; Wasteson et al., 1996). Actuellement de plus en plus de souches sont résistantes aux antibiotiques que ce soit au Canada ou ailleurs dans le monde (Archambault et al., 2012; Gutiérrez-Martín et al., 2006; Vanni et al., 2012).

### **3 Le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin**

#### **3.1 Généralités et importance économique**

Tout d'abord décrit aux États-Unis, plus précisément en Caroline du Nord, en 1987 (Keffaber, 1989), le syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP) fut quelques années plus tard observé en Europe (1990) (Wensvoort et al., 1991). L'agent étiologique associé à ce syndrome fut découvert en 1991 en Europe (Wensvoort et al., 1991) et un an plus tard en Amérique du Nord (Collins et al., 1992; Dea et al., 1992; Thiry, 2004). Cet agent fut alors nommé virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP). Historiquement, les deux génotypes de VSRRP trouvés en Amérique du Nord (génotype 2) et en Europe (génotype 1) étaient différents. Le premier ayant par la suite été propagé en Europe dans un vaccin atténué (Bøtner et al., 1997). Depuis les années 1990, la répartition du VSRRP est mondiale et la maladie causée par ce virus entraîne d'importantes pertes économiques au niveau de la production porcine (Neumann et al., 2005). Depuis 2006, une nouvelle souche de VSRRP hautement pathogène est apparue en Asie. Il s'agit de la souche HP-PRRSV (An et al., 2010; Li et al., 2007; Metwally et al., 2010; Tian et al., 2007; Wu et al., 2009).

#### **3.2 Le syndrome reproducteur et respiratoire porcin**

##### **3.2.1 Description des signes cliniques**

Comme l'indique son nom, ce syndrome est caractérisé par d'importants troubles reproducteurs comme des mises bas prématurées ou des avortements et des troubles respiratoires (Christianson et al., 1992; Collins et al., 1992; Halbur et Bush, 1997; Keffaber, 1989; Mousing et al., 1997; Pejsak et al., 1997; Rossow et al., 1994; Young et al., 2010).

La période d'incubation de la maladie est variable et peut être de quelques jours à plus d'un mois. Les symptômes ne sont cependant pas toujours apparents puisqu'ils dépendent essentiellement de la virulence des souches de VSRRP ainsi que de l'âge et du statut immunitaire des porcs infectés (Thiry, 2004). La taille du troupeau ou encore des conditions sanitaires de l'élevage sont également des facteurs importants quant à la dissémination de la souche et de la maladie. Les troubles reproducteurs et respiratoires peuvent entraîner plusieurs



autres complications comme des troubles alimentaires (anorexie) ainsi que de l'agalactie et de la léthargie accompagnée ou non de cyanose (Collins et al., 1992; Mousing et al., 1997; Neumann et al., 2005; Pejsak et al., 1997; Rossow et al., 1994; Thiry, 2004).

### 3.2.2 Aspect épidémiologie

Il a été démontré à plusieurs reprises que le virus pouvait induire la maladie en cas d'infection par les voies orales; ou en cas d'innoculations : intranasale, intramusculaire, intrapéritonéale, intravaginale ou intrautérine (Christianson et al., 1993; Magar et al., 1995; Yoon et al., 1999). La dose infectieuse serait très faible et ne nécessiterait que quelques particules virales (moins de dix) pour déclencher une infection par voie intramusculaire et par voie intranasale (Yoon et al., 1999). Les infections suivant un contact par voie orale ou par voie nasale sont les plus répandues, ceci étant due au fait de la proximité des porcs et des contacts directs entre leur groin ou avec des supports inertes tels que les barrières (Albina, 1997). L'infection d'un porc ou d'un porcelet peut également se faire lors de l'alimentation en cas de présence de particules virales dans la nourriture ou sur les mamelles de la truie. Le pH de l'estomac étant trop acide pour permettre la survie du virus (demi-vie de 50 h dans un milieu à 4°C et à pH 6.25 alors qu'elle est de 6.5 h à 37°C et à pH 6.0; pH de l'estomac entre 2 et 5), ce dernier entre alors par contact avec la muqueuse buccale ou les amygdales (Bloemraad et al., 1994; Magar et al., 1995; van der Linden et al., 2003). Comme le virus peut être retrouvé dans la semence des porcs, il y a de grandes probabilités de transfert si un verrat n'a pas été détecté porteur et mis en quarantaine (Thiry, 2004). Une truie porteuse de VSRRP ou une contamination de la semence du verrat peut mener à une contamination du placenta et à l'infection des embryons, ceci pouvant entraîner leur mort (Christianson et al., 1992; Prieto et al., 1997).

## 3.3 Le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin

### 3.3.1 La taxonomie du virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin

Le VSRRP est un virus classé dans l'ordre des *Nidovirales*, dans la famille des *Arteriviridae* et qui appartient au genre des *Arterivirus*. Dans ce genre on retrouve différents

virus comme le virus de l'artérite viral équine, le virus du déséquilibre de la lactate déshydrogénase ou encore le virus de la fièvre hémorragique du singe (Benfield et al., 1992; Cavanagh, 1997).

### 3.3.2 La structure générale du virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin

Le VSRRP est un virus enveloppé à ARN simple brin à polarité positive, pléomorphe et qui mesure de 50 à 65 nm de diamètre. Les protéines N qui le composent forment une capsidie hélicoïdale de 20 à 30 nm de diamètre (Benfield et al., 1992; Dea et al., 2000; Doan et Dokland, 2003; Spilman et al., 2009).

La nucléocapsidie est majoritairement composée de protéines N. Elle est entourée d'une enveloppe virale contenant diverses protéines structurales comme les GP<sub>2</sub>, E, GP<sub>3</sub> et GP<sub>4</sub>. Cette enveloppe présente également d'autres protéines comme les GP<sub>5</sub> et M. La Figure 5 représente la structure générale du VSRRP. Nous pouvons y observer la répartition des différentes protéines précédemment citées. De plus, nous pouvons également remarquer que certaines protéines se trouvent sous forme complexée en homodimère ou multimère.

L'enveloppe du VSRRP ne lui permet pas de résister à des conditions environnementales exigeantes. Il est grandement affecté et est inactivé par des traitements à 56°C pendant 20 min, à 37°C pendant 24 h ou à 21°C pendant une durée de 6 jours. Le VSRRP est stable à des pH de 6,5 à 7,5 mais son infectiosité est cependant réduite quand le pH est inférieur à 6,0 ou supérieur à 7,65 (Bloemraad et al., 1994). Les détergents réduisent également l'infectiosité du virus alors que le chloroforme et l'éther détruisent totalement son enveloppe virale (Benfield et al., 1992). Malgré toutes les caractéristiques précédemment citées, le VSRRP possède un grand avantage : celui de pouvoir parcourir de grandes distances lorsqu'il est sous forme d'aérosol. Lorsque les conditions météorologiques (i.e. le vent) sont favorables et qu'il est aérosolisé, il peut parcourir jusqu'à 4,7 km (Dee et al., 2009).

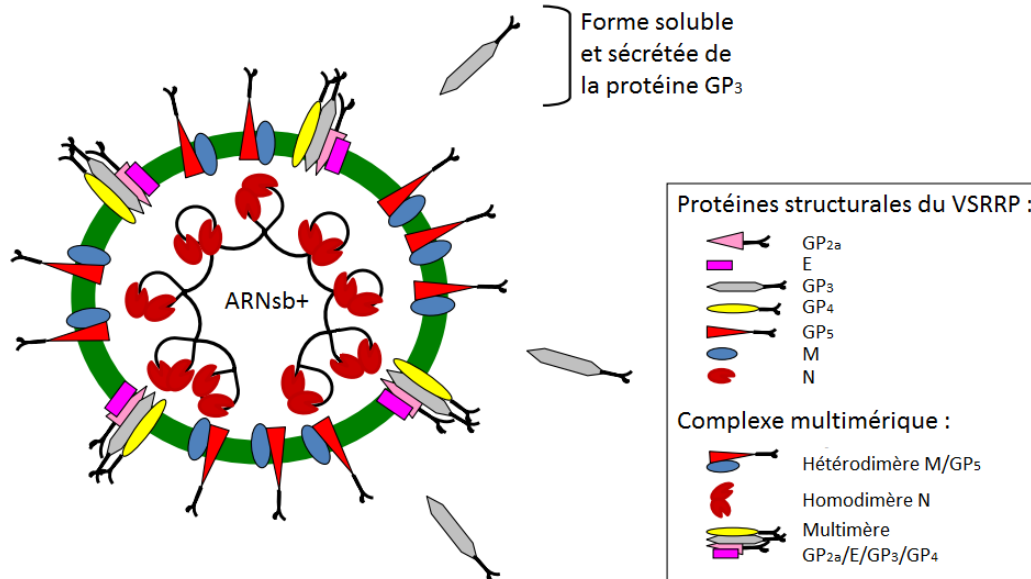


Figure 5. Représentation schématique de la structure du VSRRP. Figure modifiée de Music et Gagnon (2010).

Légende : le VSRRP présente diverses protéines au niveau de son enveloppe. Ces protéines peuvent être retrouvées sous forme d'hétérodimère (M/GP<sub>5</sub>) ou de multidimère (GP<sub>2a</sub>/E/GP<sub>3</sub>/GP<sub>4</sub>) et ont des fonctions importantes pour le virus car elles sont responsables de l'assemblage, du bourgeonnement du virus ainsi que de l'entrée du virion dans la cellule. GP<sub>3</sub> est une protéine qui a la particularité de pouvoir être retrouvée soit au niveau de la membrane (pour les souches européennes), soit dans le milieu extracellulaire (pour les souches nord-américaines). En plus des protéines d'enveloppe, le VSRRP présente des protéines de la nucléocapside qui sont sous forme de dimère; leur fonction principale est de protéger le génome viral.

### 3.3.3 L'aspect génomique du virus

Nous n'entrerons pas dans les détails de la génomique du VSRRP, seuls les points d'une relative importance seront présentés dans les prochains paragraphes. En ce qui concerne les protéines qu'elles soient structurales ou non, des sections leurs seront dédiées dans la suite de cette revue de littérature.

Le génome du VSRRP a une taille approximative de 15 kb. Il s'agit d'un ARN simple brin à polarité positive muni à l'extrémité 5' d'une coiffe et qui est polyadénylé à l'extrémité 3'. Il code pour 10 cadres ouverts de lecture (ORF) (Dea et al., 2000; Firth et al., 2011).

Cependant, une étude laisse à penser qu'il se trouverait un 11e ORF présent au milieu de l'ORF 1a. Celui-ci, serait appelé TF, provoquerait un décalage du cadre de lecture (Fang et al., 2012).

L'ORF majoritaire est l'ORF 1. Il constitue les deux tiers du génome viral et regroupe les ORFs 1a et 1b. Il est impliqué dans la synthèse de protéines non structurales (nsp) comme l'ARN polymérase qui est indispensable pour la réplication du VSRRP (Andreyev et al., 1997). Les ORFs 2a, 3 et 4 codent pour les protéines N-glycosylées : GP<sub>2a</sub>, GP<sub>3</sub> et GP<sub>4</sub> (Wissink et al., 2005). L'ORF 2 possède une séquence codant pour une protéine non glycosylée : la protéine E (Wu et al., 2001). La glycoprotéine GP<sub>5</sub> et la protéine non glycosylée M sont retrouvées sous forme d'hétérodimère. Elles sont codées respectivement par l'ORF 5 et l'ORF 6 (Mardassi et al., 1996). L'ORF 7 quant à lui, encode la nucléocapside : la protéine N (Dea et al., 2000).

La Figure 6 est une représentation schématique de la structure et de l'organisation du génome du VSRRP. Elle présente aussi les différents ARN sous génomique formés lors de la réplication virale. Nous n'aborderons pas l'aspect de la réplication virale du VSRRP, il est tout de même possible de consulter la revue récente de Yun et Lee (2013).

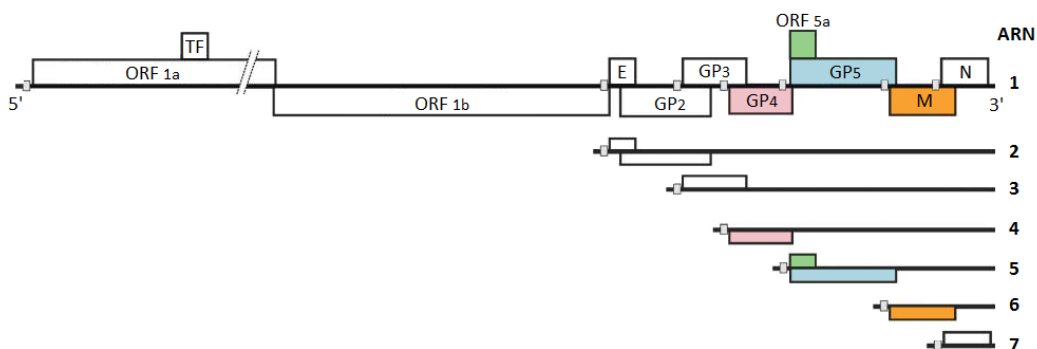


Figure 6. Représentation de l'organisation génomique du VSRRP. Figure modifiée de Firth et collaborateurs (2011).

Légende : le génome viral du VSRRP est composé d'un ARN simple brin à polarité positive (1). Lors de la réplication du virus différents ARNm seront synthétisés (1-7) et ils seront munis d'une coiffe et polyadénylés; permettant ainsi l'utilisation de la machinerie cellulaire pour la traduction. La réplication de ce virus fait en sorte que l'on retrouvera plusieurs ORFs

sur un même ARNm; en effet, tous les ORFs en aval de l'ORF d'intérêt se retrouveront sur l'ARNm de ce dernier. C'est pourquoi, l'ORF N (7) se retrouvera sur les ARNm de tous les ARNm produits (1-7); tandis que l'ORF1 ne se retrouvera que sur son ARNm (1).

#### 3.3.4 Les protéines structurales

Parmi la multitude de protéines structurales du VSRRP, la protéine GP<sub>5</sub> semble être l'une des plus importantes. C'est elle qui est présente en plus grande quantité sur l'enveloppe. Il existe deux types d'épitopes sur la protéine GP<sub>5</sub>; des épitopes neutralisants et d'autres non neutralisants. Les premiers sont la cible des anticorps développés par le porc, alors que les seconds seraient des mécanismes d'évasion immunitaire du VSRRP (Ansari et al., 2006; Ostrowski et al., 2002; Pirzadeh et Dea, 1997, 1998; Plagemann, 2004). Les protéines GP<sub>5</sub> et M (protéines de membrane) sont retrouvées sous forme de dimères maintenus grâce à des ponts disulfures. Ces dimères sont responsables de l'assemblage, du bourgeonnement du virus et sont importants dans l'entrée du virus dans la cellule (Delputte et al., 2002; Mardassi et al., 1996; Verheije et al., 2002).

La protéine de nucléocapside N est une protéine non glycosylée composée d'une centaine d'acides aminés et qui a un poids moléculaire de 15 kDa. Cette protéine est hautement immunogénique chez le porc (Loemba et al., 1996; Meulenberg et al., 1995a, b). La protéine N étant la protéine de la capsid, l'un de ses principaux rôles sera la protection du génome viral pendant la phase extracellulaire du virus (Wootton et Yoo, 2003). En cas d'inhibition de celle-ci par des ARN-interférents, il y aura inhibition de la réplication du VSRRP (Yang et al., 2014). Après traduction dans le cytoplasme de la cellule hôte, la protéine N se dimérise au niveau d'un site situé entre les acides aminés 30 et 37. Le dimère est alors transporté jusqu'à l'appareil de Golgi (Snijder et Meulenberg, 1998; Wootton et Yoo, 2003). La Figure 7 présente la structure de la protéine N, nous pouvons entre autres y observer les séquences de localisation nucléaire permettant à la protéine N de conduire la capsid au noyau, évitant ainsi la détection de l'ARN viral et l'activation de l'immunité innée cellulaire (Rowland et al., 1999; Rowland et al., 2003; Goubau et al., 2013).

La protéine d'enveloppe (protéine E) est hydrophobe. Elle a un poids moléculaire de 10 kDa et est essentielle pour l'infectiosité du virus (Lee et Yoo, 2006; Snijder et al., 1999;

Wu et al., 2001). Cette protéine est associée à trois autres protéines virales (GP<sub>2a</sub>, GP<sub>3</sub> et GP<sub>4</sub>) avec lesquelles elle forme un complexe important (Wissink et al., 2005).

Les protéines GP<sub>2a</sub>, GP<sub>3</sub> et GP<sub>4</sub> sont codées respectivement par les ORF 2a, 3 et 4. Elles sont composées d'environ 250 aa pour GP<sub>2a</sub>, 260 aa pour GP<sub>3</sub> et de 180 aa pour GP<sub>4</sub> (Meulenberg et al., 1995a; Murtaugh et al., 1995). La protéine GP<sub>2a</sub> ne semble pas avoir d'importance pour la formation des virions mais elle est immunogénique et antigénique (de Lima et al., 2006; Ostrowski et al., 2002). GP<sub>3</sub> est une protéine glycosylée qui est retrouvée au niveau de l'enveloppe virale chez les souches européennes ou sécrétée dans l'environnement par les cellules infectées par une souche nord-américaine (Mardassi et al., 1998; Meulenberg et al., 1995b). Cette protéine qui est hautement antigénique semble avoir un rôle dans la neutralisation du virus (Cancel-Tirado et al., 2004; Faaberg et Plagemann, 1997; Hedges et al., 1999). Enfin, la protéine membranaire GP<sub>4</sub> est impliquée dans l'interférence de la synthèse de l'ARNm cellulaire (Lee et al., 2004; van Nieuwstadt et al., 1996).

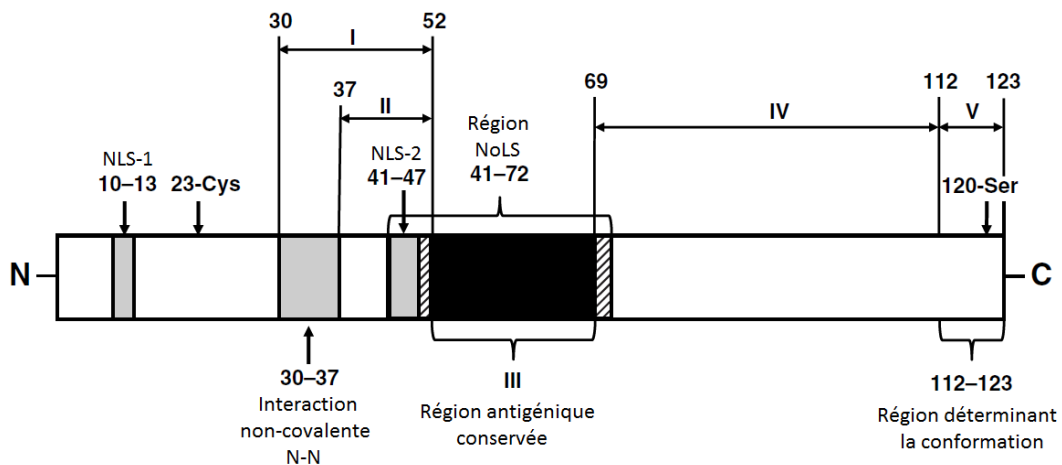


Figure 7. Représentation schématique de la protéine N du VSRRP. Figure modifiée de Music et Gagnon (2010).

Légende : cette représentation schématique de la protéine N du VSRRP montre la présence de séquence de localisation nucléaire (NLS) ou des séquences de localisation nucléolaire (NoLS). Ces séquences situées entre les acides aminés 10-13, 41-47 et 41-72 permettent l'adressage de la protéine au noyau. Ceci permettra le transport de la nucléocapside virale jusqu'au noyau

cellulaire, lieu de réplication virale. Entre les acides aminés 30 et 37 se trouve la région permettant la dimérisation des protéines N.

### 3.3.5 Les protéines non structurales

Les protéines non structurales (nsp) sont des protéines indispensables au cycle viral. Elles sont codées par les ORF 1a et 1b et sont donc les premières protéines virales à être traduites ; ce qui permet ainsi d'amorcer le cycle de réplication viral. La protéine nsp1 est une protéine multifonctionnelle ayant une concentration intracellulaire bien plus élevée que les autres nsp, ceci est dû à la traduction hétéroclite des ARNs (Kroese et al., 2008; Yuan et al., 2000). L'extrémité C-terminale de la protéine nsp2 s'associe de manière covalente avec nsp3 pour jouer un rôle dans la modification de la membrane de la cellule hôte ou dans la réplication du virus et dans la maturation des protéines virales (Johnson et al., 2007; Snijder et al., 2001; Snijder et al., 1994). La protéine nsp9 est codée par l'ORF1b, il s'agit d'une ARN polymérase ARN-dépendante. Quant à la protéine nsp10, il s'agit d'une NTPase (Bautista et al., 2002).

### 3.3.6 Tropisme cellulaire et facteurs d'adhésion du virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin

Le VSRRP est un virus ayant un tropisme envers les cellules immunitaires (macrophages et monocytes particulièrement) et leurs précurseurs ou encore les tissus lymphoïdes ou du placenta (Duan et al., 1997a, b). Dans certaines conditions *in vitro*, il est possible qu'il infecte des cellules comme des macrophages alvéolaires porcins, des cellules de singe comme les cellules de rein de singe vert d'Afrique ainsi que des lignées cellulaires apparentées comme les MARC-145, les CL2621 ou encore les cellules pulmonaires de porc St. Jude (SJPL) (Kim et al., 1993; Mengeling et al., 1995; Provost et al., 2012). Cette dernière lignée cellulaire est en réalité une lignée d'origine simienne et non porcine comme décrite initialement (Silversides et al., 2010).

Si l'ARN génomique du virus est transfecté dans une cellule qui est normalement non permissive, il y aura alors réplication du virus (Meulenbergh et al., 1998). Ainsi, le paramètre

limitant l'entrée des virus dans les cellules est la présence de récepteurs membranaires (Kreutz, 1998). L'inhibition de l'un ou de plusieurs de ces récepteurs entraîne une inhibition du VSRRP (Chen et al., 2014). Ces facteurs sont le sulfate d'héparane, la sialoadhésine (également appelée CD169) et le *cluster* de différenciation 163 (CD163). La Figure 8 représente les structures des trois récepteurs membranaires précédemment cités. Dans les prochains paragraphes, de succinctes descriptions de ceux-ci seront effectuées.

#### 3.3.6.1 Les sulfates d'héparane

Les sulfates d'héparane sont des polysaccharides de liaison présents à la surface des cellules MARC-145 (Jusa et al., 1997). Ils ont été mis en évidence par la diminution de l'infectiosité du VSRRP lors de traitement des cellules permissives à l'héparinase I (Jusa et al., 1997). Il en est de même avec une préincubation du virus avec des sulfates d'héparane glycoaminoglycane, ce dernier étant un protéoglycane (Delputte et al., 2002; Prydz et Dalen, 2000). Lors de l'entrée du virus dans la cellule, les sulfates d'héparane interagissent avec le complexe de protéines virales M/GP<sub>5</sub> et permettent ainsi l'entrée du virus (Delputte et al., 2002).



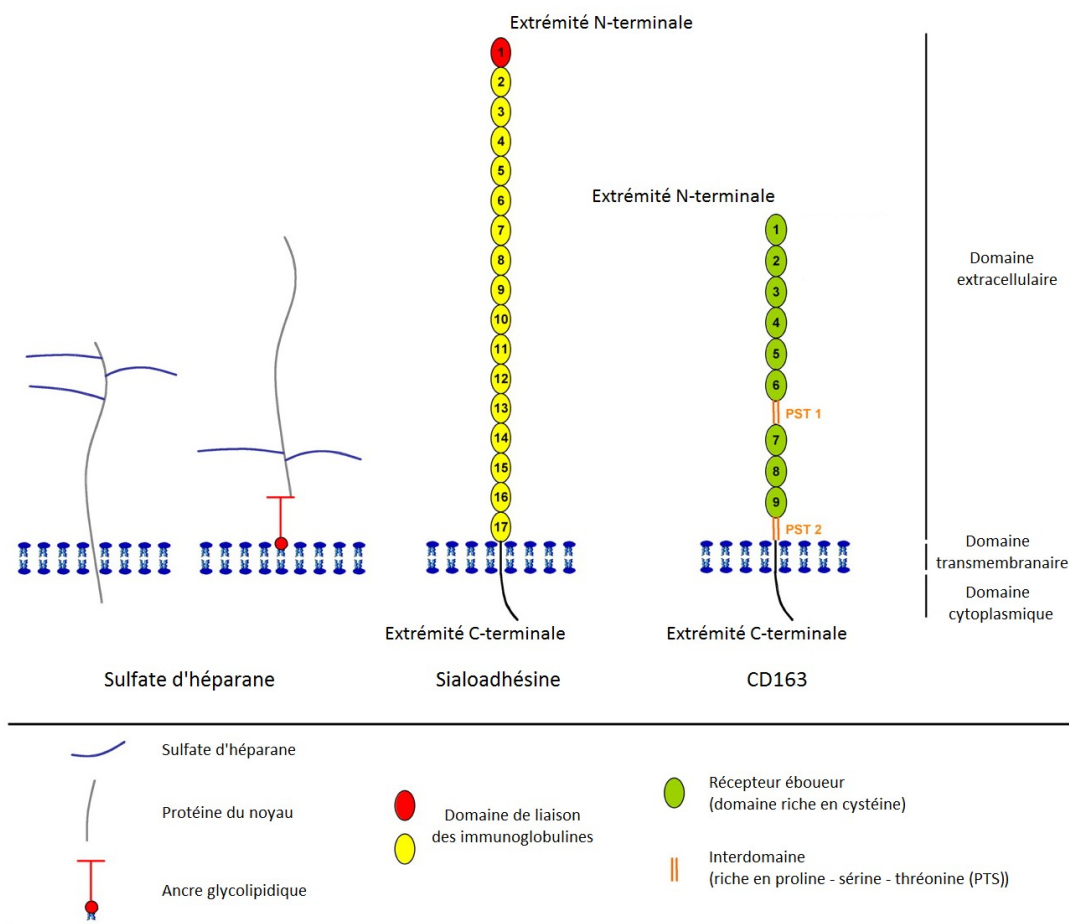


Figure 8. Représentation schématique des facteurs de liaisons cellulaires utilisés par le VSRRP. Figure modifiée de van Breedam et collaborateurs (2010a).

Légende : différents types de facteurs de liaisons cellulaires peuvent être utilisés par le VSRRP afin d'adhérer à la cellule cible et de l'infecter. Les premiers à intervenir sont les sulfates d'héparane. Ils sont composés d'une protéine centrale sur laquelle des sulfates d'héparane sont greffés et ces facteurs peuvent posséder ou non une ancre glycolipidique. Les seconds facteurs impliqués dans l'adhésion du VSRRP sont les sialoadhésines. Également appelées CD169, ces facteurs sont composés de différents domaines de liaison des immunoglobulines. Les sialoadhésines interagissent avec le complexe viral M/GP<sub>5</sub>. Enfin, le CD163 est le troisième facteur de liaison intervenant dans l'entrée du VSRRP. Celui-ci est composé de différents domaines riches en cystéine et de deux interdomaines riches en proline, sérine et thréonine. Une fois le virus dans l'endosome, les CD163 sont responsables de la liaison avec GP<sub>2</sub> et GP<sub>4</sub> et de la fusion des membranes permettant la relâche de la nucléocapside.

### 3.3.6.2 Les sialoadhésines

Les sialoadhésines sont des facteurs d'attachement qui ont été découverts à la fin des années 1990 (Duan et al., 1998a; Duan et al., 1998b). Des expériences de blocage de ces facteurs par des anticorps spécifiques ainsi que le blocage des sulfates d'héparane par l'héparine ont démontré une perte de l'attachement du VSRRP aux macrophages alvéolaires porcins (Delputte et al., 2005). L'attachement provoqué par les sialoadhésines est plus stable que celui provoqué par les sulfates d'héparane et il implique la formation d'une liaison entre le complexe protéique M/GP<sub>5</sub> et la partie N-terminale de la sialoadhésine (Jiang et al., 2013; van Breedam et al., 2010b).

### 3.3.6.3 Le facteur CD163

Le facteur CD163 est une glycoprotéine transmembranaire exprimée chez les lignées de monocytes/macrophages (Sanchez et al., 1999). *In vivo*, CD163 est responsable de l'internalisation de complexe haptoglobine-hémoglobine et ainsi de la protection des cellules contre l'oxydation de ce complexe (Schaer et al., 2006). Le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcins serait capable de contourner le système et d'utiliser les CD163 pour infecter les macrophages alvéolaires porcins. L'ajout d'anticorps anti-CD163 réduirait fortement l'infectiosité du VSRRP (van Gorp et al., 2008). Le facteur CD163 est composé de plusieurs domaines riche en cystéine, il présente également deux domaines particuliers appelés domaine PST. Ces domaines PST sont riches en proline-sérine-thréonine (PST) et ont une grande importance pour l'infectiosité du virus car il semblerait qu'ils jouent un rôle lors du relâchement du génome viral (Das et al., 2010; van Gorp et al., 2010).

### 3.3.7 Le cycle viral du virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcins

Lors du contact entre le VSRRP et la cellule hôte, les polysaccharides de surface (sulfate d'héparane) sont les premiers à interagir (Delputte et al., 2002). L'interaction est faible mais permet par la suite l'adhésion aux sialoadhésines. Cette interaction avec les sialoadhésines permet alors au virus d'adhérer fermement à la membrane cellulaire, et ce,

grâce aux protéines M et GP<sub>5</sub> qui agiront comme un récepteur pour l'extrémité N-terminale des sialoadhésines (Delputte et al., 2005; van Breedam et al., 2010b; Vanderheijden et al., 2003). L'utilité des sialoadhésines pour l'attachement et l'internalisation du VSRRP reste quelque peu controversée (Prather et al., 2013). Une fois l'attachement à la membrane effectué, il y aura internalisation du virus par le processus d'endocytose par puits de clathrines (Kreutz et Ackermann, 1996; Nauwynck et al., 1999; Vanderheijden et al., 2003). À 6 h postinfection, la vésicule à doubles membranes est formée. Le virus passera alors dans les endosomes précoces où le pH est compris entre 6.0 et 6.5 (Calvert et al., 2007; Nauwynck et al., 1999; van Gorp et al., 2009). C'est là que le CD163 interagira alors avec les protéines GP<sub>2</sub> et GP<sub>4</sub> pour permettre la libération de la nucléocapside par des protéases cellulaires ainsi que sa libération dans le cytosol (Das et al., 2010; van Gorp et al., 2010). Après avoir rejoint le noyau (Rowland et al., 1999), l'ARN positif simple brin du virus sera en partie traduit afin de produire les protéines non structurales importantes au VSRRP. Par la suite, il servira de matrice pour la synthèse de l'ARN simple brin négatif complémentaire. Ce dernier servant à son tour de matrice pour la synthèse des ARNm ou d'ARN génomique. Les messagers seront alors traduits et une fois les protéines synthétisées, la nucléocapside sera préformée et entrera dans le réticulum endoplasmique puis le système de Golgi. Les virions s'accumulent alors dans les vésicules Golgiennes qui iront fusionner avec la membrane externe permettant ainsi le relâchement des virions (van Breedam et al., 2010b). Pour plus d'information, une revue concernant la réplication du VSRRP a récemment été publiée (Yun et Lee, 2013).

La Figure 9 représente le mécanisme d'entrée d'une particule virale du VSRRP dans un macrophage alvéolaire porcine. Il est possible d'y voir les interactions entre les différentes protéines virales et les facteurs d'adhésion présents sur la cellule. Pour plus d'informations ou pour des informations complémentaires, il est possible de consulter la revue de Van Breedam et collaborateurs (2010a).

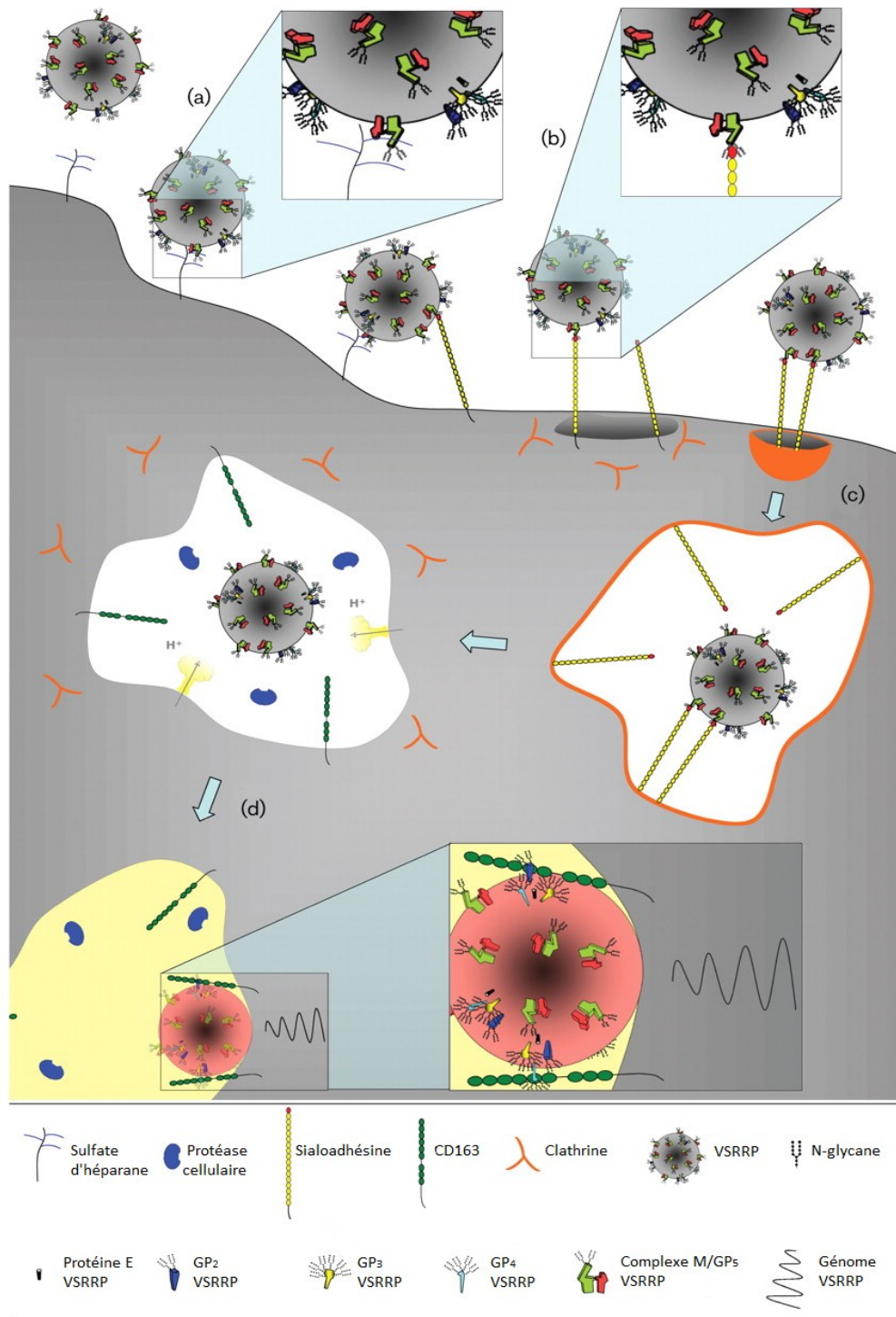


Figure 9. Mécanisme d'entrée du VSRPP dans un macrophage alvéolaire porcine. Figure modifiée de van Breedam et collaborateurs (2010a).

Légende : l'étape d'entrée dans la cellule est une étape d'importance lors du cycle viral. Lors de cette étape d'entrée, il y aura tout d'abord une adhésion de la particule virale aux sulfates d'héparane cellulaires grâce aux protéines virales M/GP5 (a). Cette adhésion permettra par la suite une interaction des protéines virales M/GP5 avec les sialoadhésines (b) puis l'endocytose du VSRRP grâce à la formation de puits de clathrines (c). Le virus passera alors dans l'endosome précoce puis dans l'endosome tardif. C'est dans ce dernier endosome que la nucléocapside sera libérée, lui permettant alors de rejoindre le noyau cellulaire.

### 3.4 Pathogenèse cellulaire

*In vivo*, le VSRRP est un virus capable d'infecter différentes lignées cellulaires comme les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques (certaines études sèment la controverse sur ce modèle (Chang et al., 2008; Flores-Mendoza et al., 2008; Park et al., 2008; Silva-Campa et al., 2009; Wang et al., 2007)) et il peut être retrouvé dans le thymus, la rate, les plaques de Peyer, les cellules hépatiques, les cellules rénales, les glandes surrénales, les cellules de l'endothélium du cœur ou encore les cellules des voies respiratoires pour ne citer qu'elles (Duan et al., 1997a, b; Silva-Campa et al., 2009). *In vitro*, il possède un tropisme très fort pour des cellules comme les macrophages alvéolaires porcins ou les cellules de rein de singe vert africain (MARC-145). Pour cette raison ces deux lignées sont très utilisées pour la recherche sur le VSRRP. Aussi, la lignée cellulaire SJPL a été récemment démontrée permissive au VSRRP (Provost et al., 2012).

L'étape clef pour l'infectiosité du VSRRP reste sa capacité à entrer dans la cellule. Ceci implique la présence de facteurs membranaires permettant cette étape (voir la Figure 9) (Duan et al., 1997b; Halbur et al., 1995; Halbur et al., 1996; Kreutz, 1998; Meulenberg et al., 1998). Tout ce qui a trait à ces facteurs membranaires a déjà été décrit dans les paragraphes précédents, voir la section 3.3.6.

Que cela soit *in vitro* ou *in vivo* le VSRRP est connu pour induire l'apoptose. Chez les MARC-145 et les macrophages alvéolaires porcins, les premières étapes de l'apoptose sont une déformation des cellules puis une fragmentation de l'ADN. La voie apoptotique activée est la voie des caspases. Il a été prouvé que les protéines GP<sub>5</sub> intervenaient dans le déclenchement de l'apoptose, mais il se pourrait qu'un relâchement de TNF- $\alpha$  par les cellules infectées intervienne aussi dans ce processus d'apoptose (Choi et Chae, 2002; Kim et al.,

2002; Labarque et al., 2003; Miller et Fox, 2004; Sirinarumitr et al., 1998; Suárez et al., 1996; Sur et al., 1997). Il a également été démontré qu'en coculture avec des lymphocytes spléniques, l'infection par le VSRRP induisait une augmentation de l'expression de FasL dans les macrophages infectés; le système Fas/FasL est un mécanisme d'entrée en apoptose (Chang et al., 2007). La nécrose est un phénomène important lors de l'infection au VSRRP. Chez certaines lignées cellulaires comme les MARC-145, le taux de nécrose est plus important que le taux d'apoptose (Miller et Fox, 2004).

*In vivo*, à 12 h post-inoculation le VSRRP se trouve dans la circulation sanguine. Il atteint ainsi la rate et les ganglions lymphatiques qui sont les principaux lieux de production du virus (Thiry, 2004). Après 48 h postinfection, le nombre des macrophages alvéolaires infectés est diminué à 40% et quelques heures plus tard (72 h postinfection), les cellules entrent alors en apoptose ( Oleksiewicz et Nielsen, 1999). L'apparition des premiers anticorps a été relevée à 7 jours postinfection. À ce moment, les virions et les cellules infectées sont éliminés de la plupart des sites d'infection à l'exception des poumons, des amygdales et de certains ganglions lymphatiques. Le virus restera présent à ces sites de 5 à 10 semaines, mais l'infection peut être plus longue et atteindre plus de 2 mois, car le virus est capable de se multiplier dans les monocytes/macrophages (Thiry, 2004).

### 3.5 Les réponses immunitaires contre le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin

Au niveau de l'immunité innée, il a été montré que le VSRRP n'induisait quasiment pas de réponse en interférons (IFN) que cela soit *in vivo* ou *in vitro* par exemple sur les cellules MARC-145 et les cellules macrophages alvéolaires porcins (Patel et al., 2010; Thanawongnuwech et al., 2001; van Reeth et al., 1999). Parmi les différents interférons induits par le VSRRP, nous retrouvons les interférons de type I (IFN $\alpha$  et IFN $\beta$ ) ainsi que de type II (IFN $\gamma$ ). Une fois relâchés par les cellules, ces interférons iront se lier à leur récepteur (IFNAR pour les interférons de type I ou IFNGR pour ceux de type II) et induire des cascades de signalisation (voie de signalisation JAK/STAT) permettant aux cellules stimulées d'activer des gènes de réponse aux interférons (Platanias, 2005). Concernant le VSRRP, il a été démontré

que l'IFN $\alpha$  était un inhibiteur de la réplication virale, que l'IFN $\beta$  protégeait les macrophages contre le virus (Albina et al., 1998; Loving et al., 2007) et que l'IFN $\gamma$  induisait une inhibition du VSRRP chez les macrophages alvéolaires porcins ou dans des modèles *in vivo* (Bautista et Molitor, 1999). Peu d'interleukine 1 (IL-1) et de TNF- $\alpha$  seraient induits lors de l'infection (Thanawongnuwech et al., 2001; van Reeth et al., 1999). Au niveau des différentes protéines du VSRRP, il est connu que certains épitopes des protéines GP4 et GP5 sont responsables du déclenchement de la réponse en interférons (Díaz et al., 2009; Vashisht et al., 2008). Les protéines virales nsp1, nsp2, nsp4 et nsp11 du VSRRP, diminuent la réponse immunitaire. En effet, certaines protéines comme les nsp1 et 11 inhibent la voie de signalisation de réponse à l'ARN double brin (Beura et al., 2010). En plus d'être une protéine inhibitrice de la voie de signalisation de réponse à l'ARN double brin, nsp1 inhibe également l'expression de l'IFN $\beta$  (Chen et al., 2010). Il semblerait y avoir eu une adaptation du virus à cet environnement cellulaire répressif.

*In vivo*, le VSRRP entraîne une diminution du nombre de leucocytes entre 3 jours et une semaine postinfection (Christianson et al., 1993; Rossow et al., 1994). Cette diminution est principalement due à une baisse du nombre de cellules CD2<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD2<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, ainsi que des monocytes/macrophages (Christianson et al., 1993; Shimizu et al., 1996; Shimizu et al., 1994). *In vivo*, entre 1 et 2 semaines postinfection, la formule leucocytaire redevient normale et ce avant d'observer une augmentation du nombre des cellules CD8<sup>+</sup>. Cette augmentation atteindra son maximum entre 28 et 35 jours postinfection (Shimizu et al., 1996). En ce qui concerne les cellules T, il a été démontré *in vivo* une prolifération et une réponse contre les protéines M, GP<sub>2</sub> et GP<sub>5</sub> (Bautista et al., 1999).

L'immunité à médiation humorale est principalement dirigée contre différents épitopes de la protéine N du VSRRP et les premiers anticorps produits sont contre cette protéine (Loemba et al., 1996; Meulenberg et al., 1995b; Rodriguez et al., 1997; Wootton et al., 1998). Cette réponse ne semble pas avoir d'effets pour la protection du porc et diminue rapidement (Yoon et al., 1995). La protéine nsp2 présente des épitopes capables d'induire une réponse de type anticorps neutralisants; nsp2 serait l'une des protéines les plus immunogénique du VSRRP (de Lima et al., 2006; Oleksiewicz et al., 2001).

En plus de nsp2, *in vivo*, les anticorps neutralisants seraient dirigés principalement contre la GP<sub>5</sub> (Cancel-Tirado et al., 2004; Gonin et al., 1999). La GP<sub>5</sub> est tout comme la protéine N, une des cibles des premiers anticorps non-neutralisants synthétisés (Cancel-Tirado, 2004). Comme ces derniers induiraient la réplication du virus dans les macrophages, tout ce système favorise le virus (Cancel-Tirado et al., 2004; Yoon et al., 1997). La présence d'anticorps neutralisants serait la clef permettant la résolution de la virémie (Díaz et al., 2006). Sur ce principe, il a été démontré que la présence d'anticorps neutralisants bloquait *in vitro* la capacité du virus à infecter les macrophages (Delputte et al., 2004). Un transfert de ces anticorps à des truies gestantes préviendrait des risques de troubles reproductifs ainsi que le passage transplacentaire des virions et pourrait même prévenir la virémie chez les porcelets (Lopez et al., 2007). Il ne faut cependant pas oublier qu'une fois dans la cellule, le virus n'est pas détectable par les anticorps et que les cellules infectées sont réfractaires autant aux anticorps qu'au système du complément (Costers et al., 2006).

### 3.6 Prévention et traitement

#### 3.6.1 La prophylaxie

La biosécurité (ou la prophylaxie) est définie comme étant l'ensemble des procédures et des programmes mis en place pour réduire le risque de transmission d'agents pathogènes et d'apparition de maladies (Lambert et al., 2012). Au fil du temps, différentes techniques de prophylaxie ont été mises en place par les vétérinaires et les éleveurs. L'interdiction de stationner les véhicules à proximité des bâtiments et l'implantation de barrières à l'entrée des élevages sont deux pratiques permettant de limiter l'introduction de visiteurs non désirés. Il a été démontré à plusieurs reprises que l'augmentation des contacts entre les animaux et les employés ou visiteurs ne fait qu'accroître le risque de transfert de pathogènes (Bates et al., 2001; Boklund et al., 2004; Ribbens et al., 2009). Dans ce même but, des procédures simples comme un lavage efficace des mains, un changement de vêtements, une séparation entre zone sale et zone propre peuvent être mises en place, tout comme une quarantaine qui est un bon moyen de cibler des animaux malades et d'éviter leur introduction dans un troupeau sain.



Le VSRRP peut être transmis par des insectes comme les moustiques ou les mouches, i.e. par pique ou morsure (Otake et al., 2003a; Otake et al., 2002; Otake et al., 2003b; Schurrer et al., 2005). Le contrôle des populations d'insectes par la pose de système de filtration d'air ou l'utilisation d'insecticides est donc essentiel (Alonso et al., 2013; Schurrer et al., 2006).

Des méthodes de tests et de retraits ou de dépopulation et repopulation se sont montrées efficaces contre le VSRRP. Ces méthodes consistent à déterminer la présence ou non du virus par des tests effectués de manière régulière et selon un échantillonnage aléatoire des porcs. Les porcs détectés positifs sont alors retirés et le groupe d'où ils proviennent est placé en quarantaine (Dee et Molitor, 1998). Cette méthode reste très coûteuse, car les animaux retirés sont euthanasiés.

### 3.6.2 Diagnostic

La détection du VSRRP peut être effectuée par différentes méthodes. L'une des premières fut l'isolement du virus dans les cellules MARC-145 (Kim et al., 1993). L'utilisation de macrophages alvéolaires porcins peut également être faite dans un laboratoire de diagnostic, mais présente certaines limites, puisque l'obtention de ces cellules se fait par prélèvement *in vivo* et qu'il est impossible de les faire se diviser. De plus, il est nécessaire de tester chacun des lots, car les cellules ne sont pas toutes égales pour la permissivité au virus (Wensvoort, 1993). Dans les faits, la méthode de diagnostic privilégiée est l'utilisation de la PCR en temps réel afin de quantifier la présence du génome du VSRRP. Cette technique est rapide et de pointe. Elle ne nécessite pas de culture et peut être effectuée sur différents échantillons comme du sérum ou des tissus; elle peut également être utilisée pour distinguer différentes souches de VSRRP (Chai et al., 2013; Kleiboeker et al., 2005; Larochelle et Magar, 1997; Mardassi et al., 1994; Wasilk et al., 2004; Wernike et al., 2012; Yang et al., 2013). Il est également possible d'utiliser des techniques de diagnostic sérologique par ELISA afin de détecter les anticorps anti-VSRRP potentiellement présents chez l'animal. Ces techniques sont efficaces et commercialisées (Albina et al., 1992; Cho et al., 1997; Denac et al., 1997; Díaz et al., 2012; Gerber et al., 2014; Wensvoort, 1993).

### 3.6.3 Vers un traitement contre le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin ?

À l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement efficace contre le VSRRP. Afin de prévenir la transmission horizontale ou verticale du VSRRP, il est possible de réaliser une immunisation protectrice chez les porcs (Dee et Philips, 1999). Pour cela, différents vaccins inactivés ou atténués ont été créés. Les vaccins atténués ou inactivés ne sont pas très efficaces et ne réussissent, en général, qu'à induire une réponse immunitaire partielle (Karniychuk et al., 2012; Kim et al., 2011; Kimman et al., 2009; Leng et al., 2012; Ni et al., 2013; Vanhee et al., 2009). Il a également été démontré que l'immunisation passive est un moyen de protéger les porcs. L'immunisation passive consiste en des injections régulières d'anticorps porcins anti-VSRRP (Fano et al., 2005).

L'identification de composants naturels capables de bloquer ou d'interférer avec la réplication du VSRRP est une avenue de recherche très prometteuse. En effet, des travaux récents ont montré que des molécules comme l'ouabaine ou la valinomycine étaient capables d'inhiber la réplication du virus *in vitro* (Karuppanan et al., 2012). Il a également été montré que certains peptides étaient capables d'interférer avec le VSRRP et d'avoir un effet antiviral contre celui-ci *in vitro* (Liu et al., 2012). Récemment, un groupe a mis en évidence une activité anti-VSRRP d'un composant du champignon *Cryptoporus volvatus* (Gao et al., 2013; Ma et al., 2013). Ce composé semblerait actif autant *in vitro* qu'*in vivo*. Si l'un de ces composants peut être actif tout autant *in vitro* qu'*in vivo*, il pourrait alors permettre de contrôler le VSRRP.

## 4 Les infections mixtes

### 4.1 Généralités

Les modèles d'infections mixtes (également appelées coinfections) sont des modèles de plus en plus présents dans la littérature. Il s'agit d'étudier les interactions entre les microorganismes et leurs impacts les uns sur les autres chez un hôte commun. Ces études peuvent être réalisées selon des modèles *in vitro* et *in vivo*.

### 4.2 Divers modèles d'infections mixtes

L'une des premières études qualifiées de coinfection a été réalisée en 1947. Elle avait alors pour objectif principal de déterminer le rôle de l'immunité humorale et cellulaire chez le singe dans le cas d'une infection mixte à *Streptococcus hemolyticus* et à influenza. Les auteurs avaient alors conclu à l'importance de l'immunité cellulaire dans le processus de résistance du singe aux deux pathogènes (Wilson et al., 1947).

Les interactions entre le virus, la bactérie et l'organisme restaient encore très vagues. Lors d'une coinfection, les microorganismes présents peuvent agir en synergie et avoir une pathogenèse plus forte que s'il était seul. Mais dans les mêmes conditions, si l'on prend deux autres microorganismes alors il peut y avoir blocage de l'un des deux protagonistes afin de favoriser le second. Cette dernière condition a été observée en 1975 dans un modèle de culture cellulaire impliquant deux virus : l'adénovirus de type 2 et le virus vacuolant simien. Le modèle avait été réalisé avec des cellules d'origines simiennes et le blocage de l'adénovirus avait été observé (Klessig et Anderson, 1975). Actuellement, les modèles de coinfection impliquent souvent le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) avec par exemple le virus spumeux simien afin de caractériser une cotransmission, avec les virus des hépatites B et C afin d'étudier la prévalence de coinfection, ou d'identifier des molécules ayant des effets antiviraux contre le VIH (Andreoni et al., 2012; Balogun et al., 2012; Switzer et al., 2008).

Le complexe respiratoire porcine (CRP) est une entité clinique souvent associée à des coinfections. L'une des plus importantes coinfections causant le CRP est une coinfection à *Mycoplasma hyopneumoniae* et à *Pasteurella multocida*. Dans ce cas le second pathogène

augmente la pneumonie initialement induite par le premier (Amass et al., 1994; Ciprián et al., 1988). *Pasteurella multocida* est également retrouvé lors de coinfections avec *Bordetella bronchiseptica*. Dans ce dernier cas *Bordetella* prédispose le porc à une colonisation de *Pasteurella*; ce en augmentant la capacité de *Pasteurella* à adhérer au tractus respiratoire (Brockmeier et Register, 2007). Il en est de même pour les coinfections de *Bordetella* avec *Haemophilus parasuis* (Brockmeier, 2004). Il peut aussi y avoir des coinfections virales causant, dans le cas d'une infection mixte au SIV et au PCV2, une augmentation de la gravité de la maladie (van Reeth et Pensaert, 1994).

Dans certaines conditions, la coinfection peut être provoquée par un virus et une bactérie. C'est le cas des coinfections avec le virus de la pseudo-rage et *P. multocida* ou *M. hyopneumoniae* qui cause dans les deux cas une augmentation de la virulence des bactéries et qui provoque donc une augmentation de la pneumonie (Fuentes et Pijoan, 1987; Shibata et al., 1998). *Mycoplasma hyopneumoniae* peut provoquer une augmentation de la maladie et déclencher une grande détresse respiratoire lorsqu'il est en coinfection avec le PCV2 ou le SIV (Opriessnig et al., 2011b; Opriessnig et al., 2004). Un autre exemple de coinfection virus/bactérie et celle entre le SIV et *B. bronchiseptica*. Dans ce dernier exemple, le virus de l'influenza est capable d'augmenter la colonisation de *B. bronchiseptica* ainsi que d'augmenter la production de médiateurs proinflammatoires causant ainsi une aggravation des lésions pulmonaires (Loving et al., 2010).

#### 4.3 Des coinfections incluant le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin ou *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Le VSRRP ainsi qu'*A. pleuropneumoniae* ne sont pas en reste concernant les coinfections, ils sont tous deux d'importants pathogènes. Il a été démontré qu'*A. pleuropneumoniae* était capable de coinfecter des porcs avec *M. hyopneumoniae*, causant ainsi une augmentation des dommages respiratoires causés par *A. pleuropneumoniae* ainsi qu'une diminution de la capacité de phagocytose des macrophages alvéolaires porcins (Caruso et Ross, 1990; Marois et al., 2009; Yagihashi et al., 1984). L'herpèsvirus porcin de

type 1 est également capable d'augmenter la pathogénécité d'*A. pleuropneumoniae* lors d'une coinfection (Sakano et al., 1993).

Le VSRRP quant à lui, peut être retrouvé avec le virus de la pseudo-rage et cause alors une aggravation et une prolongation des signes cliniques. L'infection est accompagnée de l'induction d'une immunosuppression altérant les lymphocytes (Shibata et al., 2003). En cas d'infection avec le PCV2, il y a une augmentation des symptômes et des lésions pulmonaires. Ces deux virus ayant pour cibles les monocytes et macrophages pulmonaires porcins, ils induisent une diminution de la phagocytose, une augmentation de l'effet cytopathique et une diminution de la réponse en interféron (Allan et al., 2000; Chang et al., 2005; Harms et al., 2001; Rovira et al., 2002). Dans le cas d'une coinfection VSRRP et SIV, il y a une augmentation de la pathologie observée. Un fait particulièrement intéressant est la légère diminution de la réplication du SIV, diminution provoquée par l'infection du VSRRP (van Reeth et al., 1996). Cette caractéristique n'est pas retrouvée lors d'une infection mixte à VSRRP et coronavirus respiratoire porcin. Il y a cependant une augmentation des lésions et comme chacun des deux virus veut moduler les réponses immunitaires innées et adaptatives de l'hôte. Ceci provoque l'apparition d'une importante réaction inflammatoire et de lésions qui lui sont associées. La combinaison d'IFN $\alpha$  et d'IL-1 est un marqueur de cette coinfection (Jung et al., 2009; Renukaradhya et al., 2010; van Reeth et Nauwynck, 2000; van Reeth et al., 1996). Il est aussi possible de retrouver le VSRRP en coinfection avec différentes bactéries, que ce soit *Streptococcus suis*, *B. bronchiseptica*, *P. multocida* ou encore *M. hyopneumoniae*. Dans la majorité des cas, il y a une première infection par le VSRRP. Cette infection va déstabiliser le système immunitaire et une fois les macrophages alvéolaires infectés, il y aura mise en place de l'infection bactérienne. Dans ces coinfections, les lésions et la maladie seront plus sévères et de plus longue durée (Brockmeier et al., 2000; Brockmeier et al., 2001; Carvalho et al., 1997; Cho et al., 2006; Thacker et al., 1999; Thanawongnuwech et al., 2000; Thanawongnuwech et al., 2004; Thanawongnuwech et al., 2001; Xu et al., 2010). Une nouvelle étude a récemment mis en évidence qu'une vaccination contre *M. hyopneumoniae* avait un effet protecteur contre les coinfections *M. hyopneumoniae* et VSRRP (Park et al., 2014).

#### 4.4 Connaissances actuelles des coinfections entre *Actinobacillus pleuropneumoniae* et le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin

*Actinobacillus pleuropneumoniae* et le VSRRP sont deux pathogènes pouvant être retrouvés en coinfections chez le porc. En 2000, une étude épidémiologique espagnole a mis en évidence la présence d'anticorps anti-*A. pleuropneumoniae* et anti-VSRRP chez des porcs. Sur la totalité des cas, le pourcentage d'animaux séropositifs pour le VSRRP et pour *A. pleuropneumoniae* était d'environ 12%. La limite de ces études reste la mesure des taux d'anticorps par ELISA, la présence des pathogènes n'a pas été confirmée d'autre manière (Enøe et al., 2002; Fraile et al., 2010; Gutiérrez-Martín et al., 2000; Meyns et al., 2011).

La seule étude expérimentale portant sur la coinfection entre le VSRRP et *A. pleuropneumoniae* est une étude datant de 1997. Les auteurs avaient alors infectés des porcs exempts d'agents pathogènes spécifiques (SPF) avec le VSRRP pendant une semaine avant d'infecter les groupes concernés avec une souche *moyennement* virulente d'*A. pleuropneumoniae* de sérotype 3 pour une durée de 2 ou 14 jours. À 2 jours postinfection, les auteurs avaient alors observé une augmentation des lésions causées par *A. pleuropneumoniae* et une augmentation de la taille et du poids des poumons. À 14 jours postinfection, il n'y avait aucune différence entre les groupes contrôles et le groupe coinfecté. Une coinfection entre ces deux pathogènes n'est donc pas obligatoirement synonyme d'une augmentation de la pathogénécité (Pol et al., 1997). Pour faire le lien avec mon projet, au cours de cette étude de coinfection par Pol et collaborateurs, aucun suivi concernant le VSRRP n'a malheureusement été effectué. Il est donc impossible de conclure sur l'action d'*A. pleuropneumoniae* sur le VSRRP, et donc impossible de déduire une quelconque forme d'effet antiviral *in vivo*.

## 5 Conclusions, hypothèses et objectifs du projet

Les problématiques associées au virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin ainsi qu'à *A. pleuropneumoniae* sont multiples. Ces deux pathogènes font partie des pathogènes associés au complexe respiratoire porcin et sont associés à de nombreuses pertes économiques dans l'industrie porcine. Ils sont encore aujourd'hui très prévalents; le VSRRP étant un des pathogènes les plus importants dans l'industrie porcine.

Dans les quelques lignes qui suivront, je voudrais maintenant aborder nos connaissances actuelles sur mon projet de recherche et notre modèle. Les cellules SJPL sont des cellules permissives à différents virus comme les virus de l'influenza humain, porcin, aviaire et équin (Seo et al., 2001). En plus de ces virus, il a été démontré dans nos laboratoires que cette lignée cellulaire était permissive au VSRRP et qu'elle soutenait la réplication du virus (Provost et al., 2012). Les cellules SJPL ont été utilisées dans des modèles d'infections bactériennes *in vitro* avec *A. pleuropneumoniae* (Auger et al., 2009; Tremblay et al., 2013). Cette lignée cellulaire était alors considérée comme une lignée porcine, d'où le nom : St-Jude *porcine lung*, mais nos laboratoires ont mis en évidence qu'elles étaient en réalité des cellules apparentées à des cellules de singe (Silversides et al., 2010).

Il a été mis en place dans notre laboratoire un modèle de coinfection entre *A. pleuropneumoniae* et le VSRRP dans la lignée cellulaire SJPL (Lévesque, 2010; Lévesque et al., 2014). Il a été observé que l'infection des cellules SJPL par le VSRRP ne diminuait ni n'augmentait l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* aux cellules. Ce modèle de coinfection a permis de démontrer un effet antiviral d'*A. pleuropneumoniae* (et de son surnageant de culture) envers le VSRRP. (Lévesque, 2010; Lévesque et al., 2014). Au niveau des cytokines, la coinfection n'induit pas la libération d'IL-6, d'IL-10 ou de TNF- $\alpha$ . Il y a néanmoins une augmentation de la libération d'IL-8 et d'IFN $\gamma$  dans le cas de la coinfection (Lévesque, 2010; Lévesque et al., 2014). Les molécules retrouvées dans le surnageant d'*A. pleuropneumoniae* et qui possèderaient une activité antivirale seraient des molécules de faible poids moléculaire (inférieur à 1 kDa) et seraient résistantes à la chaleur (Lévesque, 2010; Lévesque et al., 2014).

Mes travaux se baseront donc sur les travaux décrits brièvement dans le précédent paragraphe (Lévesque, 2010; Lévesque et al., 2014). L'hypothèse principale de mon projet sera : le surnageant de culture d'*A. pleuropneumoniae* présente une ou plusieurs molécule(s) ayant une action sur les cellules de la lignée SJPL ayant pour finalité un effet antiviral contre le VSRRP. Mes objectifs seront dans un premier temps d'étudier les interactions entre le VSRRP et *A. pleuropneumoniae* dans la lignée cellulaire SJPL. Pour cela j'étudierai l'effet du surnageant d'*A. pleuropneumoniae* sur la lignée cellulaire SJPL afin d'identifier les voies métaboliques ou de signalisation cellulaire qui provoquent l'effet antiviral. Une fois les voies identifiées, mon but sera de mettre en évidence le ou les mécanisme(s) de blocage du VSRRP dans les cellules SJPL. En parallèle de cela, j'identifierai la ou les molécule(s) présente(s) dans le surnageant d'une culture d'*A. pleuropneumoniae* et qui possède(nt) une activité anti-VSRRP. Pour cela, j'utiliserai des techniques de fractionnement de milieu et d'analyse de spectrométrie de masse.

Ce projet s'inclut dans un but général de développer un nouvel outil thérapeutique et/ou prophylactique pour maîtriser les infections causées par le VSRRP.



**ARTICLE**

Article en préparation pour une soumission à :

Journal of Virology (American Society for Microbiology journals)

***Actinobacillus pleuropneumoniae* induces SJPL cell cycle arrest in G2/M phase and inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication**

Jérémy A. Ferreira Barbosa<sup>1,2</sup>, Josée Labrie<sup>1,2</sup>, Francis Beaudry<sup>3</sup>, Carl A. Gagnon<sup>1,2</sup>,  
and Mario Jacques<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Centre de recherche en infectiologie porcine et avicole (CRIPA)

<sup>2</sup> Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc (GREMIP)

<sup>3</sup> Groupe de recherche en pharmacologie animal du Québec (GREPAQ)

Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal

3200 Sicotte, St-Hyacinthe, Québec, J2S 2M2, Canada

\* Corresponding author : Mario Jacques, Ph.D.

Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal,

3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, Québec, J2S 2M2, Canada

Tel.: (450) 773-8521 ext. 8348; Fax (450) 778-8108

## **Abstract**

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is the most important pathogen in the swine industry and causes important economic losses. No effective antiviral drugs against it exist. We recently reported that the culture supernatant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, the causative agent of porcine pleuropneumonia, possesses an antiviral activity *in vitro* against PRRSV in SJPL cells. The objectives of this study were (i) to identify the mechanism behind the antiviral activity displayed by *A. pleuropneumoniae*; (ii) to characterize the active molecule(s) present in the bacterial culture supernatant. We first used proteomic analysis and observed that a modulation of the cell cycle regulation was induced by the culture supernatant. We then used flow cytometry to perform cell cycle analyses and observed a G2/M-phase cell cycle arrest induced by the culture supernatant. Two G2/M-phase cell cycle inhibitors were then used and we demonstrated their ability to inhibit PRRSV infection in SJPL cells. Finally, in order to characterize the active molecule(s) present in the culture supernatant we used mass spectrometry and identified two molecules present only in the bacterial culture supernatant. We demonstrated for the first time that *A. pleuropneumoniae* is able to disrupt the cell cycle. We also demonstrated the importance of cell cycle in the inhibitory activity against PRRSV. Furthermore, two putative molecules were identified from the culture supernatant. This study may allow the development of new antiviral drugs against PRRSV.

## **Introduction**

Coinfections are likely more frequent in the farm environment than reported and it is well established that a primary infection with a pathogen, viral or bacterial, may enhance the infectious potential of a secondary pathogen (1-4). The porcine respiratory disease complex (PRDC) is a multifactorial disease affecting fattening pigs that is caused by coinfections with viral and/or bacterial pathogens including the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), the swine influenza virus, the porcine circovirus type 2, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus*

*pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* and *Bordetella bronchiseptica* (2, 5, 6). The PRDC is the most common disease in swine industry resulting in significant economic losses. This complex is characterized by several symptoms including respiratory distress, fever, lethargy, stunted growth and death (2, 5, 6).

Coinfections are often studied by observing clinical symptoms in model animals; however, the basic mechanisms involved in these pathogen-pathogen interactions are often overlooked. *In vitro* investigations can provide insights for understanding coinfections. Our laboratory recently developed a model to study co-infections by *A. pleuropneumoniae* and PRRSV using St. Jude porcine lung (SJPL) cells (7).

PRRSV is a member of the *Arteriviridae* family and *Nidovirales* order. It is an enveloped, single-stranded positive sense RNA virus (8, 9). The genome is approximately 15 kb in length and contains 11 open reading frames (ORF) (10-12). PRRSV can infect pigs and trigger several symptoms (fever, inappetence, cyanosis), reproductive disorders (abortion, stillborn piglets, mummified fetuses) and respiratory disorders (cough, hyperpnea, dyspnea) (13-15). Furthermore, PRRSV is the most important pathogen in swine industry and causes important economic losses and no effective antiviral drugs against it exist (16).

*Actinobacillus pleuropneumoniae* is the causative agent of porcine pleuropneumonia, an important disease in swine industry. The disease is relatively well controlled in the USA and Canada, but still a significant problem in Latin America, and some Asian and European countries (17). *Actinobacillus pleuropneumoniae* is a Gram-negative rod and member of the *Pasteurellaceae* family. This bacteria is known to possess many virulence factors including lipopolysaccharides, capsular polysaccharides, outer membrane proteins involved in the acquisition of essential nutrients, surface molecules involved in adherence to the respiratory tract and the Apx toxins (18). For a recent review about the virulence factors of *A. pleuropneumoniae* see Chiers and collaborators (18).

We recently reported that the  $\leq 1$  kDa ultrafiltrate of *A. pleuropneumoniae* culture supernatant possesses an antiviral activity against PRRSV *in vitro* in SJPL infected cells (7). This antiviral activity did not seem to be due to *A. pleuropneumoniae* lipopolysaccharides or by peptidoglycan fragments (i.e. NOD1 and NOD2 ligands) (7). The identity of the

molecule(s) responsible for the antiviral activity is unknown. The identification and characterization of these molecule(s) could provide the basis for the development of new therapeutics, prophylactics with suitable biopharmaceutical properties against PRRSV infection.

We hypothesize that the culture supernatant of *A. pleuropneumoniae* induces a specific SJPL cell response which have an antiviral activity against PRRSV. The first objective of the present study was to identify the mechanism behind the antiviral activity displayed by *A. pleuropneumoniae*. The second objective was to identify the molecule(s) present in *A. pleuropneumoniae* culture supernatant that are responsible for the antiviral activity against PRRSV. Therefore, we first used an antibody microarray to identify the virus host cell pathways modulated by the *A. pleuropneumoniae* culture supernatant and observed modulations of the cell cycle regulation. Thereafter, modulations of the cell cycle regulation have been confirmed by cell cycle analysis using flow cytometry. We also demonstrated the ability of two known cell cycle inhibitors to inhibit PRRSV. Finally, mass spectrometry was used to detect and identify two molecules present only in the culture supernatant of *A. pleuropneumoniae*.

## **Materials and Methods**

### **Cell lines**

All cell culture products were purchased from Gibco® (Life Technologies™, Grand Island, NY, USA). SJPL cell line (19) and MARC-145 cell line (20) are known to support PRRSV replication (21, 22). SJPL cells were provided by R.G. Webster (St. Jude Children's Hospital, Memphis, TN, USA) and were historically defined as porcine lung cells (19) but were later found to be of monkey origin (23). SJPL cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 1% (v/v) MEM non-essential amino acid (NEAA) solution, 100 µg/mL streptomycin, 100 U/mL penicillin, 50 mg/L gentamicin and 2.5 mg/L amphotericin B. MARC-145 cell line is a subclone of African green monkey kidney cell line

MA104 (21). MARC-145 cells were grown in minimum essential medium (MEM) supplemented with 10% (v/v) FBS, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES, 10 µg/mL streptomycin, 10 U/mL penicillin and 2.5 mg/L amphotericin B. Cells were cultured and infected at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

### **Bacterial and viral strains**

*Actinobacillus pleuropneumoniae* non-hemolytic and non-cytotoxic MBHPP147 strain used in this study was a mutant of the serotype 1 reference strain S4074 producing non-active ApxI and ApxII toxins (*AppΔapxICΔapxIIC*) (24), kindly provided by Ruud P.A.M. Segers (MSD Animal Health, Boxmeer, The Netherlands). *AppΔapxICΔapxIIC* was grown at 37°C in brain heart infusion broth (BHI; Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) or in BHI agar (Oxoid Ltd.) supplemented with 5 µg/mL or 15 µg/mL of β-nicotinamide adenine dinucleotide (β-NAD; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), respectively.

The PRRSV North American reference strain IAF-Klop was used in this study. This strain is a genotype II strain (25, 26).

### **Bacterial culture supernatant**

*Actinobacillus pleuropneumoniae* culture supernatant was prepared as recently described by Lévesque and collaborators (7). Briefly, an overnight culture of *AppΔapxICΔapxIIC* was diluted into fresh BHI broth and grown to an OD<sub>600</sub> of 0.6. This culture was then diluted into supplemented DMEM medium to 1 × 10<sup>6</sup> CFU/mL and incubated overnight at 37°C. Bacterial cells were centrifuged at 4,000 g for 20 minutes and the supernatant was harvested and filtered using a 0.22 µm membrane (Sarstedt Inc., Newton, NC, USA). The filter-sterilized supernatant was ultrafiltrated through a 3 kDa membrane (Merck Millipore Ltd., Carrigtohill, Cork, Ireland). The resulting culture supernatant ultrafiltrate and the filter-sterilized supernatant were stored at -20°C for a maximum of 6 months. DMEM was also ultrafiltrated through a 3 kDa membrane and used as a control.

## Protein profiling of SJPL cells

Samples preparation was performed as described by Auger and collaborators (27). Briefly, using a T25 flask (Sarstedt Inc.), confluent SJPL cells ( $0.5 \times 10^6$  cells) were infected or not with the IAF-Klop PRRSV strain for 4 hours (multiplicity of infection (MOI) : 0.5) and then treated or not using *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant for 18 hours. These conditions are known to block PRRSV replication (7). Cells were washed twice with Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS; Life Technologies™) and 500 μL of lysis buffer was added (20 mM MOPS (pH 7.0; Sigma-Aldrich), 2 mM EGTA (Sigma-Aldrich), 5 mM EDTA (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA), 30 mM sodium fluoride, 60 mM β-glycerophosphate (pH 7.2), 20 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1% (v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich) and one protease inhibitor cocktail tablet Complete Mini EDTA-free (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), pH 7.2). Cells were removed using a cell scraper (Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA) and transferred into a microcentrifuge tube on ice. Sonication was performed at 180 J using an ultrasonic processor (Cole-Parmer, Vernin Hills, IL, USA) in order to lyse the cells. Samples were then ultracentrifuged at 90,000 *g* for 30 minutes in a Sorvall RC M100 ultracentrifuge (Beckman Coulter, Mississauga, ON, Canada). The supernatant was kept and protein concentration was determined using Pierce® BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA). The protein concentration was adjusted to 2 mg/mL and samples were frozen at -80°C. Samples were then analyzed using Kinex™ KAM-850 antibody microarray (Kinexus Bioinformatics Corporation, Vancouver, BC, Canada). Kinex™ KAM-850 antibody microarray includes 854 antibodies which target different cell signaling pathways and included 517 pan-specific antibodies and 337 phosphosite-specific antibodies. These include 466 protein kinase antibodies, 44 protein phosphatase antibodies, 46 stress antibodies, 75 transcription antibodies and 223 others. Data were expressed in a chemiluminescence signal ratio versus the untreated cells.

## Cell cycle analysis

Cell cycle analysis was done using a modified protocol from Sazer and Sherwood (28). Briefly,  $0.5 \times 10^6$  SJPL cells were cultured overnight in T75 flask (Sarstedt Inc.) with DMEM. Cells were treated for 18 hours at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere with either DMEM, the  $\leq 3$  kDa DMEM ultrafiltrate, App $\Delta$ *apxIC* $\Delta$ *apxIIC* culture supernatant, the  $\leq 3$  kDa culture supernatant ultrafiltrate, 0.4  $\mu$ M nocodazole (Sigma-Aldrich), 7.4  $\mu$ M aphidicolin (Sigma-Aldrich), 100  $\mu$ M 3,3'-diindolylmethane (DIM; R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) or 50  $\mu$ M SBE-13 hydrochloride (SBE-13; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA). Cells were washed twice using DPBS and then trypsinized at 37°C for 10 minutes. Trypsin (Life Technologies™) was inhibited using complete medium and the cells centrifuged (4°C) at 380 g for 15 minutes. Cells were washed one more time with DPBS and then fixed and permeabilized using 70% (v/v) cold ethanol for 2 hours at room temperature followed by an overnight incubation at 4°C. Cells were washed twice with DPBS then treated for 2 hours at 37°C with 2 mg of ribonuclease-A (RNase-A; Sigma-Aldrich) in 900  $\mu$ L of DPBS. Cells were finally stained with 100  $\mu$ L of propidium iodide (PI) 0.2 mg/mL (Sigma-Aldrich). The stained cells were analyzed using a BD FACS Calibur™ (Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada), measuring fluorescence emission at 585 nm after excitation at 488 nm. For each analysis, 10,000 events were evaluated. The DNA content was determined by ModFit LT v3.0 (Verity software house Inc., Topsham, ME, USA), which provided histograms to evaluate cell cycle distribution.

## Cell counting

To compare cell proliferation and cell viability during treatments, we used a Countess™ automated cell counter (Invitrogen™, Eugene, OR, USA). After the trypsinization step in the cell cycle analysis protocol, cells were washed twice in DPBS and centrifuged at 380 g for 15 minutes at 4°C. Cells were resuspended into 1 mL DPBS and gently vortexed. A volume of 100  $\mu$ L of this cell suspension was added to 100  $\mu$ L of trypan blue (Life Technologies™). Finally, 10  $\mu$ L of this dilution was added to a Countess™ cell counting



chamber slide (Invitrogen™) to perform cells count and viability measurement. Data were automatically expressed as number of viable cells per mL.

### **Immunofluorescence assay**

To detect PRRSV infected cells, a modified immunofluorescence assay (IF) protocol from Provost and collaborators, which detects PRRSV antigens was used (22). Briefly, confluent cells ( $1 \times 10^4$  cells per well in 96-well plates (Corning Inc., Corning, NY, USA)) were infected or not with PRRSV (MOI : 0.5) for 4 hours and treated for up to 44 hours with either DMEM, the  $\leq 3$  kDa DMEM ultrafiltrate, App $\Delta$ *apxIC* $\Delta$ *apxIIC* culture supernatant, the  $\leq 3$  kDa culture supernatant ultrafiltrate, 100  $\mu$ M DIM, 0.25% (v/v) ethanol (DIM solvent), 50  $\mu$ M SBE-13 or 0.5% (v/v) H<sub>2</sub>O (SBE-13 solvent). Following infection and/or treatment, cells were washed and then fixed for 15 minutes at room temperature using a solution containing 50% (v/v) methanol (Fisher Scientific) and 50% (v/v) acetone (J.T. Baker Inc., Phillipsburg, NJ, USA). Cells were washed three times using phosphate-buffered saline without KCl (PBS) : 0.1 M NaCl (Sigma-Aldrich), 4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Fisher Scientific), 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Biopharm Inc., Laval, QC, Canada) and then incubated for 90 minutes at 37°C with a rabbit monospecific antisera (anti-PRRSV N protein) (26), diluted 1/150 in PBS. Cells were washed three other times with PBS and incubated at 37°C for 60 minutes with an anti-rabbit antiserum FITC-conjugated (Invitrogen™, Frederick, MD, USA) diluted 1/75 in PBS. Finally, cells were washed three times with PBS and visualized using a Leica DMI 4000 inverted widefield fluorescence microscope (Leica Microsystems Inc., Richmond Hill, Canada). Pictures were acquired using DFC 490 digital camera (Leica Microsystems Inc.) and images were analyzed using the Leica Application Suite Software, version 2.4.0 (Leica Microsystems Inc.).

### **Sample preparation for biochemical analysis**

In order to eliminate salts and remove inorganic contaminants, a salting-out liquid-liquid extraction (SALLE) was performed. Briefly, 2 mL of ultrafiltrate samples

( $\leq 3$  kDa) were mixed vigorously for 60 sec with 2 g of NaCl (Sigma-Aldrich) and 2 mL of acetonitrile (Fisher Scientific). After decantation, the organic layer was kept for analysis.

### **Thin-layer chromatography**

Thin-layer chromatography (TLC) plates were used to analyze samples and preparative TLC plates were used to isolate molecules of interest. For samples analysis, 40  $\mu$ L of the  $\leq 3$  kDa ultrafiltrate were applied on a 5 cm  $\times$  10 cm (length  $\times$  weight) silica gel plate (Sigma-Aldrich). For preparative TLC plates, 1 mL of the  $\leq 3$  kDa ultrafiltrates were applied on a 20 cm  $\times$  20 cm (length  $\times$  weight) silica gel plate (Sigma-Aldrich). Samples were separated using a mobile phase composed of 75% (v/v) chloroform (BDH Inc., Toronto, Ontario, Canada) and 25% (v/v) methanol (Fisher Scientific) in a saturated-closed glass chamber. Migration was performed at ambient temperature. After migration, plates were air-dried for 5 minutes and then observed under an ultraviolet A (UVA) light (Ultra-Lum Inc., Claremont, CA). Further analyses were performed by a liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Areas that correspond to the spots of interest were scraped from the silica gel plate and transferred into a microcentrifuge tube. The extracted silica was weighted and molecules were extracted with acetonitrile at a ratio of 1:3 (w/v) for 2 hours at room temperature. The samples were then centrifuged at 18,000 g for 5 minutes and supernatant was kept for LC-MS/MS analysis.

### **Instrumentation and bioanalytical methods**

The LC-MS/MS system included a Thermo Surveyor autosampler, a Thermo Surveyor MS pump and a Thermo LCQ Advantage Ion Trap Mass Spectrometer (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA). Data was acquired and analyzed with Xcalibur 1.4 (Thermo Scientific).

Samples were analyzed by LC-MS/MS in full scan positive ion mode. Briefly, 2  $\mu$ L of sample was injected and the separation was achieved using a gradient mobile phase along with a microbore column Thermo Biobasic C8 (100  $\times$  1 mm) (Thermo Scientific), with a particle size of 5  $\mu$ m. The initial mobile phase condition consisted of acetonitrile and water (both fortified with 0.4% (v/v) of formic acid) at a ratio of 5:95. From 0 to 1 minute, the ratio was maintained at 5:95. From 1 to 21 minute, a linear gradient was applied up to a ratio of 90:10 and maintained for 5 minutes. The mobile phase composition ratio was then reverted to the initial conditions and the column was allowed to re-equilibrate for 14 minutes for a total run time of 40 minutes. The flow rate was fixed at 75  $\mu$ L/minutes. The mass spectrometer was coupled with the LC system using a pneumatically assisted electrospray ion source (ESI). The sheath nitrogen gas was set to 10 units and the ESI electrode was set to 4000 V in positive mode. The capillary temperature was set at 300°C and the capillary voltage to 34 V. The instrument was operating in full scan MS mode (m/z 200-1000) and MS/MS data was collected on the most abundant peaks in a data dependent acquisition (DDA) mode using a peak intensity threshold of  $1 \times 10^5$  counts per second (cps). The  $\leq 3$  kDa ultrafiltrate of DMEM was used as a negative control and spectra were compared with the  $\leq 3$  kDa ultrafiltrate of the *A. pleuropneumoniae* culture supernatant or the TLC extracted molecules.

### **Statistical analyses**

For cell cycle data analyses, an arcsine square root  $\text{ASIN}(\text{SQRT}(x))$  transformation was performed before statistical analysis (29, 30). When “n” was equal or above eight, a d’Agostino and Pearson omnibus normality test was then realized, followed by a one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett post-test or a paired t-test to determine if significant differences exists between the different cell cycle phases or the cell-counting results of untreated and treated cells. All statistical analyses were realized using GraphPad PRISM<sup>®</sup> v4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Significant differences were considered when  $P < 0.05$ .

## Results

### Protein profiling of SJPL cells

Lévesque and collaborators recently demonstrated that both *A. pleuropneumoniae* culture supernatant and its  $\leq 3$  kDa ultrafiltrate possess an antiviral activity *in vitro* against PRRSV (7). Therefore, protein profiling of SJPL cells infected or not with PRRSV (MOI 0.5) and/or treated or not with the App $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC culture supernatant was performed using Kinex™ KAM-850 antibody microarray. Eight hundred and fifty four cell signaling proteins were targeted, using 337 phosphosite-specific antibodies and 517 pan-specific antibodies. Pan-specific antibodies targeted both phosphorylated and unphosphorylated forms of the targeted proteins. Proteins were classified into nine groups according to their cellular functions : (1) transcription and translation factors; (2) proteins implicated in signal transduction pathway; (3) proteins implicated in host-pathogen interaction or in immunity response; (4) proteins implicated in stress response; (5) proteins implicated in cell spreading, cell migration, cell survival, cell growth, cell cycle and cell proliferation; (6) apoptosis signaling pathway; (7) cytoskeleton-associated proteins; (8) proteins implicated in cell biosynthesis and metabolism; (9) proteins implicated in other biological process or unclassifiable proteins. Data are expressed in %CFC which is the percent of change from control (mock-infected, untreated SJPL cells) and are presented in the Figure 1 and in the Table S1. The App $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC culture supernatant has upregulated inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta (IKK $\beta$ ), receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2 (Rip2) and caspase-9 (CASP9). In cells infected or not with PRRSV and treated with App $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC culture supernatant, cell cycle regulation proteins (M-phase inducer phosphatase 3 inactive form (CDC25c (ser216)) and cyclin-dependent kinase 1/2 active forms (CDK1/2 (tyr161))) and caspase-3 (CASP3) were modulated by the culture supernatant. Also, PRRSV seems to be able to upregulate mitogen-activated protein kinase (MAPK) / mitogen-activated protein kinase ERK pathway and NF- $\kappa$ B pathway. Indeed, serine/threonine-protein kinase A-Raf (Raf-A), ERK1/2, interleukin-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4) and cyclic AMP-responsive element-binding protein 1 (CREB1) were differentially modulated in presence or absence of the culture supernatant. Thus, PRRSV has upregulated MAPK/ERK and NF- $\kappa$ B pathways.

The culture supernatant seems to decrease the PRRSV induced upregulation for MAPK/ERK and NF- $\kappa$ B pathways. Overall, the antibodies microarray data suggest that *A. pleuropneumoniae* seems to be able to modulate the SJPL cell cycle and the SJPL apoptosis.

### **Effect of the App $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC culture supernatant on the SJPL cell cycle**

We analyzed the SJPL cell cycle after an 18 hours treatment with the App $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC culture supernatant, using flow cytometry. To determine the unmodulated SJPL cell cycle, we used untreated cells incubated in DMEM alone. With this control, we obtained 51.6% of cells in Gap-1 phase (G1-phase); 36.3% of cells in synthesis phase (S-phase); and 12.1% of cells in Gap-2 and mitotic phase (G2/M-phase) (Figure 2A). It is important to note the impossibility to separate the G2-phase from the M-phase on the cell cycle histograms. We then used two molecules known to modulate the cell cycle at different phases : nocodazole and aphidicolin. The first one is known to interfere with the polymerization of microtubules, to block treated cells in G2/M-phase and to induce cell death by apoptosis. The second one is a DNA polymerase inhibitor and can induce a cell cycle arrest in S-phase. When SJPL cells were treated with nocodazole or aphidicolin, we observed differences between the controls (Figure 2A). For nocodazole, cell number in G2/M-phase increased to 52.3% and an additional apoptotic peak before the G1-phase peak was seen as expected (Figure 2A). For aphidicolin, proportion of cell in S-phase increased to 43.9% (Figure 2A). Following validation with cell cycle controls, SJPL cells were treated with the App $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC culture supernatant. After treatment we observed significant variations in the cell cycle proportions (n = 15;  $P \leq 0.0001$ ). Proportion of cells in G1-phase stayed the same than the control (51.8%). However, proportion of cells in S-phase and in G2/M-phase significantly (n = 15;  $P \leq 0.0001$ ) decreased to 17.9% and increased to 30.3%, respectively (Figure 2) indicating that the bacterial culture supernatant had an effect on the SJPL cell cycle.

### **Effect of the $\leq 3$ kDa App $\Delta$ *apxIC* $\Delta$ *apxIIC* culture supernatant ultrafiltrate on the SJPL cell cycle**

SJPL cells were treated with the  $\leq 3$  kDa DMEM ultrafiltrate (as control) or with the  $\leq 3$  kDa App $\Delta$ *apxIC* $\Delta$ *apxIIC* culture supernatant ultrafiltrate. As shown in Figure 3, the  $\leq 3$  kDa App $\Delta$ *apxIC* $\Delta$ *apxIIC* culture supernatant ultrafiltrate significantly ( $n = 4$ ;  $P = 0.0054$ ) increased the number of cells in G2/M-phase to 24.0%. Thus, the  $\leq 3$  kDa App $\Delta$ *apxIC* $\Delta$ *apxIIC* culture supernatant ultrafiltrate which possesses the antiviral activity against PRRSV also modulates the SJPL cell cycle.

### **Effect of DIM and of SBE-13 on SJPL cell cycle**

As we previously shown using the protein profiling, the App $\Delta$ *apxIC* $\Delta$ *apxIIC* culture supernatant upregulated CDC25c (ser216) and CDK1/2 (tyr161), both implicated in G2/M cell cycle regulation pathway. Two specific cell cycle inhibitors were used to verify whether the cell cycle modulation induced by the culture supernatant is due to CDC25c and/or CDK1/2. First, DIM which is a specific activator of the cell cycle inhibitor serine/threonine-protein kinase (Chk2) and which promotes proteasomal degradation of the two cell cycle activators CDC25c and CDK1 was used (31). Then, we used SBE-13 which is a selective inhibitor of the three cell cycle activator polo-kinase isoforms : PLK1, PLK2, PLK3 (32). These proteins are implicated in the G2/M-phase transition pathway; PLK1 is a CDC25c activator and CDC25c promotes the G2/M-phase transition using the cyclin-B/CDK1 complex. Chk2 is an inhibitor of CDC25 and leads to a cell cycle arrest in G2/M-phase. Both DIM and SBE-13 treatments induced a SJPL cell cycle modulation (Figure 4). The G1-phase of SJPL cells was not modulated by DIM or SBE-13 (Figure 4A and 4B). Number of cells in S-phase was significantly ( $n \geq 6$ ;  $P \leq 0.0001$ ) decreased from 36.3% to 9.7% and to 4.4% by DIM and SBE-13 treatments, respectively (Figure 4A and 4C). Proportions of cells in G2/M-phase were significantly ( $n \geq 6$ ;  $P \leq 0.0001$ ) increased from 12.1% to 35.8% and to 52.5% by DIM and

SBE-13 treatments, respectively (figure 4A and 4D) as previously observed with the bacterial culture supernatant.

### **Evaluation of the SJPL cell proliferation**

Cell counts are an insight of cell proliferation. Cells were counted before and after treatment and the ratio between the second and the first counts were determined. These ratios were compared to the untreated cells ratio (DMEM) or to the  $\leq 3$  kDa DMEM ultrafiltrate ratio (Figure 5A). We previously showed that nocodazole and aphidicolin were able to block the SJPL cell cycle (Figure 2A). These cell cycle arrests impact the SJPL proliferation and we observed a reduction of the proliferation; from a fold change of 2.43 for a DMEM treatment to 1.10 for the nocodazole treatment (significant;  $n = 8$ ;  $P \leq 0.0001$ ) and from a fold change of 2.43 for DMEM treatment to 1.64 for the aphidicolin treatment (Figure 5A). Furthermore, cells treated with the *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant, DIM or SBE-13 showed significantly ( $n = 8$ ;  $P \leq 0.05$ ) less proliferation than cells treated with DMEM; from a fold change of 2.43 to 1.62, 1.46 or 1.56 respectively. The same effect was observed between cells treated with the  $\leq 3$  kDa DMEM ultrafiltrate and cells treated with the  $\leq 3$  kDa *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant ultrafiltrate; from a fold change of 2.44 to 1.28 (significant;  $n = 8$ ;  $P = 0.0013$ ). Thus, the *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant or the  $\leq 3$  kDa *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant ultrafiltrate significantly decreased SJPL cells proliferation.

### **Detection of PRRSV in SJPL infected and treated cells**

Knowing that the culture supernatant can disrupt the SJPL cell cycle and decrease the SJPL cell proliferation we were interested to see whether the two cell cycle inhibitors, DIM and SBE-13 can also block PRRSV infection in SJPL cells. When SJPL cells were infected with PRRSV and treated with the *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant, an antiviral activity was observed as previously reported by Lévesque and collaborators (7) (Figure 6). When infected cells were treated with DIM, an absence of PRRSV N antigens was observed

(Figure 6). This absence of PRRSV N antigens was not shown for the DIM solvent control (Figure 6). Similar observations were realized for cells treated with SBE-13 and the SBE-13 solvent control (Figure 6). The absence of PRRSV N antigens in SJPL infected cells treated with DIM and SBE-13 suggests an antiviral effect of these two cell cycle inhibitors against PRRSV.

### **Effect of the *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant on MARC-145 cell cycle**

Lévesque and collaborators reported that the antiviral effect of *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant against PRRSV was not observed in MARC-145 infected cells (7). To provide supplemental insight of the impact of cell cycle arrests caused by the *A. pleuropneumoniae* culture supernatant on SJPL infected cells and on PRRSV infection, we treated MARC-145 cells with the *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant and analyzed their cell cycle. The normal cell cycle of untreated and uninfected MARC-145 cell was similar to the SJPL cell cycle. Proportion of cells in the three phases was: 52.4% (G1-phase), 39.9% (S-phase) and 7.7% (G2/M-phase) (Figure S1A). When cells were treated with nocodazole or aphidicolin, an increase of the proportion of cells in G2/M-phase for nocodazole or in S-phase and G2/M-phase for aphidicolin was observed (Figure S1A). When MARC-145 cells were treated with the culture supernatant, no differences were observed between the treated and the control cells (Figures S1). A similar observation was also made with the  $\leq 3$  kDa ultrafiltrates (Figure S2). This seems to support a putative link between cell cycle arrest in G2/M-phase and antiviral activity against PRRSV in SJPL cells.

### **Mass spectrometry analysis**

The determination of the molecular structure(s) is essential, especially with the likelihood of developing a new therapeutic with suitable biopharmaceutical properties against PRRSV infection. Interestingly, mass spectrometry and collision-induced dissociation can provide comprehensive spectra allowing structural information to be derived with the assistance of bioinformatics. Thus, mass spectrometry was used to analyze the



*AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant with the objective to detect, identify and characterize the active molecules. The complex biological samples were fractionated using a simple salting-out liquid-liquid extraction in order to remove undesired inorganic molecules. Supernatant were then analyzed in full scan positive ion mode by LC-MS/MS and results are presented with a total ion current chromatogram (TIC) (Figure 7A). DMEM and *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant were then compared and two unique peaks were observed in the *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant (Figure 7A, the two black arrows). The full scan spectra and extracted ion chromatograms show the presence of two individual peaks at  $m/z$  515.2 (Figures 7B, S3) and  $m/z$  of 663.6 (Figures 7C, S4). These two peaks at specific  $m/z$  were present in the *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant but absent from the DMEM. Product ion spectra for the peaks observed at  $m/z$  515.2 and  $m/z$  663.6 were acquired. At  $m/z$  515.2, four ions were observed at  $m/z$  160.6; 239.6; 328.6; 347.6 (Figure S5), and six ions were observed for  $m/z$  663.6 at  $m/z$  495.0; 496.11; 551.0; 552.0; 606.9; and 607.9 (Figure S6). However, using *in silico* fragmentation predictor and database search (e.g. METLIN) we did not succeed to unequivocally identify these two molecules present in *A. pleuropneumoniae* culture supernatant.

### **Separation of the *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant using thin-layer chromatography**

In order to improve the fractionation of the *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant and test the molecule activity, we separated the suspected active ingredient(s) using thin-layer chromatography and compare the results with standards run on the same chromatogram. Migrations were carried out using a chloroform / methanol mixture and were then read using UV light. We observed a distinctive spot (retention factor ( $R_f$ ) = 0.52) present in the *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant (Figure 8). Interestingly, this distinctive spot was also present for two reference strains of *A. pleuropneumoniae* : L20 (serotype 5b) and S4074 (serotype 1) (Figure 8). The TLC spot was excised and molecules were extracted with acetonitrile and then analyzed by LC-MS/MS. TIC and XIC ion chromatograms of the *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant TLC spot possesses both unique peaks observed at

m/z 515.2 and m/z of 663.6, which as mention before, were not present in the DMEM extract (Figure 9A, 9B, 9C and 9D). Thus, the two peaks present in the TLC spots were identical as those present in the *A. pleuropneumoniae* culture supernatant.

## Discussion

SJPL cells are permissive to PRRSV (22). Lévesque and collaborators recently reported an *in vitro* antiviral activity of the  $\leq 1$  kDa *A. pleuropneumoniae* culture supernatant ultrafiltrate against PRRSV in SJPL infected cells (7). The objectives of this study were to identify the mechanism behind the antiviral activity displayed by *A. pleuropneumoniae* and to identify the active molecule(s) present in *A. pleuropneumoniae* culture supernatant.

In PRRSV infected cells, we demonstrated that PRRSV strongly upregulated the mitogen-activated protein kinase (MAPK) / ERK pathway using ERK1/2, RAF-A and CREB. Our results are in agreement with Lee and Lee which demonstrated an activation of ERK1/2 (33) and with Han and collaborators which highlighted that PRRSV induces degradation of CREB-binding protein (CBP) (34). In contrast, the culture supernatant decreased the upregulation of CREB1 and ERK1/2 induced by PRRSV; this demonstrated that the culture supernatant decreased the MAPK/ERK and NF- $\kappa$ B pathways upregulation induced by PRRSV. This previous observation is interesting as it can be a part of response of the antiviral activity of the culture supernatant against PRRSV and should be further investigated.

Peptidoglycan fragments can stimulate nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) pathway (35, 36). Following activation, NOD1 or NOD2 recruits RIP2 and nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha (I $\kappa$ B $\alpha$ ); leading to NF- $\kappa$ B activation (37). Protein profiling indicated that only RIP2 was upregulated by the culture supernatant in absence of PRRSV. RIP2 is a specific NF- $\kappa$ B activator; the absence of NF- $\kappa$ B activation due to *A. pleuropneumoniae* culture supernatant is certainly puzzling. Lévesque and collaborators demonstrated that NOD pathway induction using peptidoglycan fragments did not lead to an antiviral effect (7). Our results seem to confirm their observation.

Auger and collaborators demonstrated a differential expression of NF- $\kappa$ B pathway in SJPL cells after 3 hours of infection with *A. pleuropneumoniae* serotype 1 (S4074) (27). In SJPL treated with the culture supernatant, we only observed a weak upregulation of the IKK $\beta$ . Auger and collaborators concluded of the implication of the *A. pleuropneumoniae* lipopolysaccharides in the NF- $\kappa$ B pathway activation (27). Absence of activation of NF- $\kappa$ B by the culture supernatant cannot be explained because the *A. pleuropneumoniae* lipopolysaccharides were not removed from the culture supernatant. Contrariwise, PRRSV seems to be able to activate the NF- $\kappa$ B pathway in SJPL cells, this was already observed in MARC-145 and alveolar macrophages (38).

Apoptosis is an important cell process which can be regulate by caspases proteins (39). The culture supernatant weakly regulated CASP3 and CASP9. The *A. pleuropneumoniae* Apx toxins are known to induce apoptosis through activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) / MAPK pathway and CASP3 (40, 41). Using an Apx mutant, induction of JNK/MAPK pathway was not observed. In our model and considering our protein profiling results, the culture supernatant probably did not (or weakly) induced apoptosis. In addition, we did not observed a peak corresponding to apoptosis during our cell cycle analysis (Figure 2A and 3A). These results were in agreement with Auger and collaborator, who carried out Western blot to detect CASP3 activation and concluded that *A. pleuropneumoniae* was not inducing apoptosis (27).

The cell cycle is an essential process occurring during cell proliferation. Many cell cycle checkpoints can be modulated and provoke cell cycle arrest. The G2/M-phase checkpoint is activated after damages to DNA and provides opportunity to stop and repair the damaged cells. To the best of our knowledge, the impact of *A. pleuropneumoniae* on cell cycle has never been reported before. However, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (formerly *Actinobacillus actinomycetemcomitans*) was able to stop growth and induce cell cycle arrest in G2/M-phase of HeLa cells, by cytolethal distending toxin (CDT) production (42, 43). Concerning PRRSV, Sun and collaborators demonstrated the ability of the PRRSV non structural protein 11 to control the cell cycle and to induce a cell cycle arrest in S-phase (44). We demonstrated the *A. pleuropneumoniae* culture supernatant ability to induce a G2/M-phase cell cycle arrest in SJPL cells. The G2/M-phase cell cycle arrest was also confirmed by the

decreased proliferation. Using CDC25c, CDK1/2 and PLK inhibitors, we confirmed the protein profiling results. DIM and SBE-13 induced a cell cycle arrest in G2/M-phase and decreased proliferation of SJPL cell. The cell cycle arrest induced by *A. pleuropneumoniae* is probably due to a CDC25c and CDK1/2 inhibition. In order to confirm the responsible protein in SJPL cells, we need to further investigate this pathway using Western-blot analysis and detection of regulation proteins.

We also studied the effect of the culture supernatant on MARC-145 cell line. Lévesque and collaborators had shown that the culture supernatant has no antiviral effect in MARC-145 cells (7). Our cell cycle observations demonstrated different effect of the culture supernatant on SJPL and on MARC-145 cells. In SJPL cells, the culture supernatant induced a cell cycle arrest in G2/M-phase, whereas the same culture supernatant has no antiviral and cell cycle effects on MARC-145 cells. Same observations were available for cell proliferation and for the cell cycle arrest induce by DIM and SBE-13 (data not shown). These differences between SJPL and MARC-145 cells support our results indicating that the culture supernatant inhibited PRRSV by inducing a G2/M-phase cell cycle arrest.

In this study, we have isolated and identified two unique peaks (m/z 515 and m/z 663) from the culture supernatant using mass spectrometry. We were able to separate and purify the culture supernatant using TLC plates, and more interestingly, to recover the two peaks after TLC spots extraction. Unfortunately, the fragmentation pattern has not provided sufficient information to lead to molecular identification. In order to obtain more information and to definitely identify the active molecules, we need to refine extraction protocols in order to obtain significantly higher purity products in amounts compatible with nuclear magnetic resonance (NMR).

In conclusion, we have demonstrated for the first time that *A. pleuropneumoniae* was able to disrupt the SJPL cell cycle and cell proliferation. We have demonstrated the importance of cell cycle in the *A. pleuropneumoniae* inhibiting effect against PRRSV. Furthermore, two putative molecules were identified from the culture supernatant. We need to further investigate these molecules which seem responsible for the antiviral activity of

*A. pleuropneumoniae* against PRRSV. This study may allow for the development of new antiviral drugs against PRRSV.

## **Conflict of interests**

The authors declare no conflict of interest.

## **Acknowledgments**

This study was supported by a discovery grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) to MJ and CAG and by a team grant from the “Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies” (FRQ-NT) to CAG and MJ. JAFB received a scholarship from the “Centre de recherche en infectiologie porcine et avicole” (CRIPA). Thanks to M. Segura, A. Letellier and S. Sénéchal for the flow cytometry.

## **Authors’ contributions**

JAFB carried out experiments and analyses data. JL carried out the protein profiling. FB carried out and analysed mass spectrometry. MJ, CAG and FB conceived the study and supervised trainee. All authors wrote, read and approved the final manuscript.

## **References**

1. **Loving CL, Brockmeier SL, Vincent AL, Palmer MV, Sacco RE, Nicholson TL.** 2010. Influenza virus coinfection with *Bordetella bronchiseptica* enhances bacterial colonization and host responses exacerbating pulmonary lesions. *Microb Pathog* **49**:237-245.

2. **Opriessnig T, Giménez-Lirola LG, Halbur PG.** 2011. Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Anim Health Res Rev* **12**:133-148.
3. **Opriessnig T, Madson DM, Schalk S, Brockmeier S, Shen HG, Beach NM, Meng XJ, Baker RB, Zanella EL, Halbur PG.** 2011. Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination is effective in reducing disease and PCV2 shedding in semen of boars concurrently infected with PCV2 and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Theriogenology* **76**:351-360.
4. **van Reeth K, Pensaert MB.** 1994. Porcine respiratory coronavirus-mediated interference against influenza virus replication in the respiratory tract of feeder pigs. *Am J Vet Res* **55**:1275-1281.
5. **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. *Am J Vet Res* **62**:521-525.
6. **Choi YK, Goyal SM, Joo HS.** 2003. Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs. *Can Vet J* **44**:735-737.
7. **Lévesque C, Provost C, Labrie J, Hernandez Reyes Y, Burciaga Nava JA, Gagnon CA, Jacques M.** 2014. *Actinobacillus pleuropneumoniae* possesses an antiviral activity against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *PLoS One* **9**:e98434.

8. **Benfield DA, Nelson E, Collins JE, Harris L, Goyal SM, Robison D, Christianson WT, Morrison RB, Gorcyca D, Chladek D.** 1992. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *J Vet Diagn Invest* **4**:127-133.
9. **Cavanagh D.** 1997. Nidovirales: a new order comprising *Coronaviridae* and *Arteriviridae*. *Arch Virol* **142**:629-633.
10. **Firth AE, Zevenhoven-Dobbe JC, Wills NM, Go YY, Balasuriya UB, Atkins JF, Snijder EJ, Posthuma CC.** 2011. Discovery of a small arterivirus gene that overlaps the GP5 coding sequence and is important for virus production. *J Gen Virol* **92**:1097-1106.
11. **Music N, Gagnon CA.** 2010. The role of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus structural and non-structural proteins in virus pathogenesis. *Anim Health Res Rev* **11**:135-163.
12. **Fang Y, Treffers EE, Li Y, Tas A, Sun Z, van der Meer Y, de Ru AH, van Veelen PA, Atkins JF, Snijder EJ, Firth AE.** 2012. Efficient -2 frameshifting by mammalian ribosomes to synthesize an additional arterivirus protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**:E2920-2928.

13. **Collins JE, Benfield DA, Christianson WT, Harris L, Hennings JC, Shaw DP, Goyal SM, McCullough S, Morrison RB, Joo HS, Gorcyca D, Chladek D.** 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. *J Vet Diagn Invest* **4**:117-126.
14. **Pejsak Z, Stadejek T, Markowska-Daniel I.** 1997. Clinical signs and economic losses caused by porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a large breeding farm. *Vet Microbiol* **55**:317-322.
15. **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. *Vet Pathol* **35**:398-406.
16. **Neumann EJ, Kliebenstein JB, Johnson CD, Mabry JW, Bush EJ, Seitzinger AH, Green AL, Zimmerman JJ.** 2005. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *J Am Vet Med Assoc* **227**:385-392.
17. **Gottschalk M, Lacouture S.** 2014. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 3, 6, 8 and 15 isolated from diseased pigs in North America. *Vet Rec* **174**:452.
18. **Chiers K, de Waele T, Pasmans F, Ducatelle R, Haesebrouck F.** 2010. Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. *Vet Res* **41**:65.

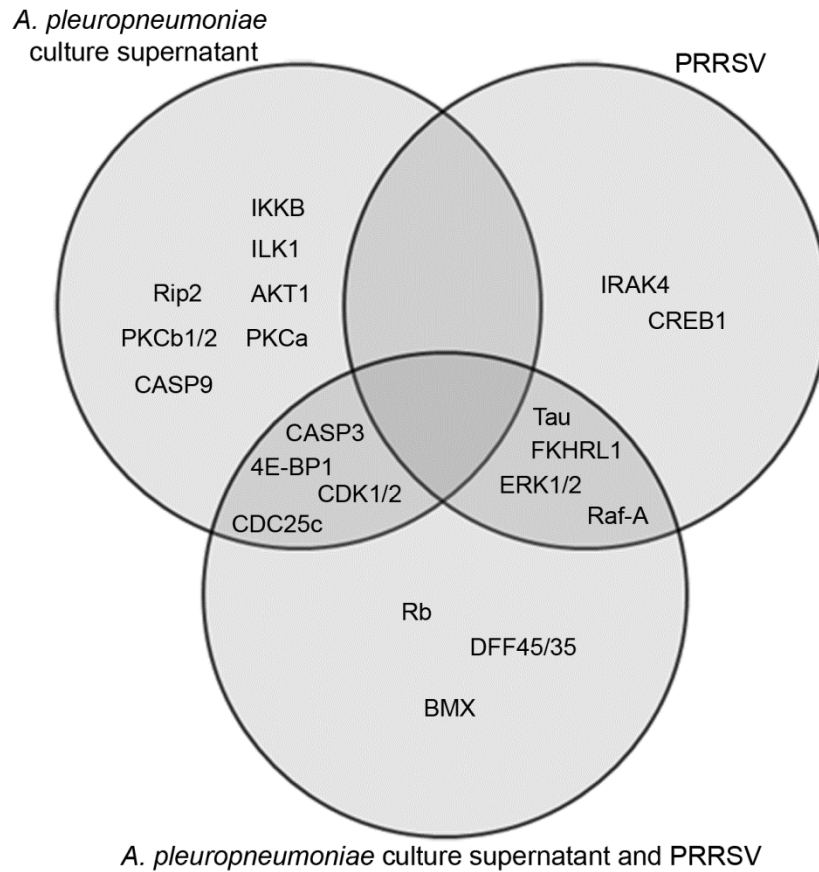


19. **Seo SH, Goloubeva O, Webby R, Webster RG.** 2001. Characterization of a porcine lung epithelial cell line suitable for influenza virus studies. *J Virol* **75**:9517-9525.
20. **Rowland RR, Robinson B, Stefanick J, Kim TS, Guanghua L, Lawson SR, Benfield DA.** 2001. Inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by interferon-gamma and recovery of virus replication with 2-aminopurine. *Arch Virol* **146**:539-555.
21. **Kim HS, Kwang J, Yoon IJ, Joo HS, Frey ML.** 1993. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch Virol* **133**:477-483.
22. **Provost C, Jia JJ, Music N, Lévesque C, Lebel MÈ, del Castillo JRE, Jacques M, Gagnon CA.** 2012. Identification of a new cell line permissive to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection and replication which is phenotypically distinct from MARC-145 cell line. *Virol J* **9**:267.
23. **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. *J Virol* **84**:5454-5455.
24. **Tremblay YDN, Lévesque C, Segers RPAM, Jacques M.** 2013. Method to grow *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilm on a biotic surface. *BMC Vet Res* **9**:213.

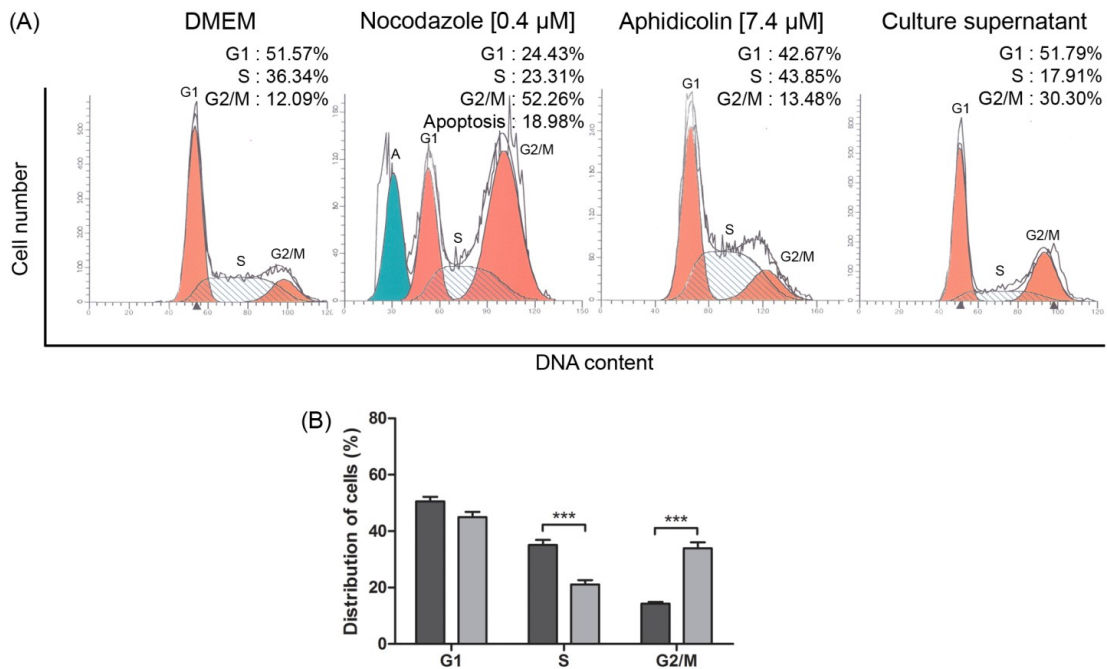
25. **Mardassi H, Athanassious R, Mounir S, Dea S.** 1994. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: morphological, biochemical and serological characteristics of Québec isolates associated with acute and chronic outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome. *Can J Vet Res* **58**:55-64.
26. **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. *Arch Virol* **148**:951-972.
27. **Auger E, Deslandes V, Ramjeet M, Contreras I, Nash JHE, Harel J, Gottschalk M, Olivier M, Jacques M.** 2009. Host-pathogen interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with porcine lung and tracheal epithelial cells. *Infect Immun* **77**:1426-1441.
28. **Sazer S, Sherwood SW.** 1990. Mitochondrial growth and DNA synthesis occur in the absence of nuclear DNA replication in fission yeast. *J Cell Sci* **97**:509-516.
29. **Wiles S, Bishop AL.** 2013. Biostat decision tree. [figshare   
 http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.95778](http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.95778).
30. **Jones M, Onslow M, Packman A, Gebski V.** 2006. Guidelines for statistical analysis of percentage of syllables stuttered data. *J Speech Lang Hear Res* **49**:867-878.
31. **Kandala PK, Srivastava SK.** 2010. Activation of checkpoint kinase 2 by 3,3'-diindolylmethane is required for causing G2/M cell cycle arrest in human ovarian cancer cells. *Mol Pharmacol* **78**:297-309.

32. **Keppner S, Proschak E, Kaufmann M, Strebhardt K, Schneider G, Spänkuch B.** 2010. Biological impact of freezing Plk1 in its inactive conformation in cancer cells. *Cell cycle* **9**:761-774.
33. **Lee YJ, Lee C.** 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication is suppressed by inhibition of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway. *Virus Res* **152**:50-58.
34. **Han M, Du Y, Song C, Yoo D.** 2013. Degradation of CREB-binding protein and modulation of type I interferon induction by the zinc finger motif of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nsp1alpha subunit. *Virus Res* **172**:54-65.
35. **Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L, Ogura Y, Kawasaki A, Fukase K, Kusumoto S, Valvano MA, Foster SJ, Mak TW, Nuñez G, Inohara N.** 2003. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol* **4**:702-707.
36. **Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LAM, Antignac A, Jéhanno M, Viala J, Tedin K, Taha MK, Labigne A, Zähringer U, Coyle AJ, DiStefano PS, Bertin J, Sansonetti PJ, Philpott DJ.** 2003. Nod1 detects a unique muropeptide from Gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* **300**:1584-1587.
37. **Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE.** 2006. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol* **7**:1250-1257.
38. **Lee SM, Kleiboeker SB.** 2005. Porcine arterivirus activates the NF-kappaB pathway through IkappaB degradation. *Virology* **342**:47-59.

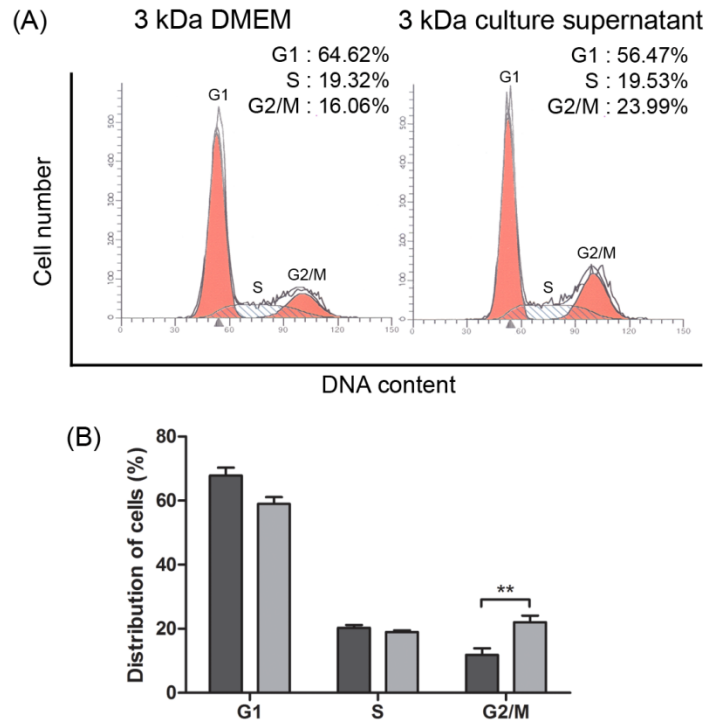
39. **Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ.** 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**:231-241.
40. **Chien MS, Chan YY, Chen ZW, Wu CM, Liao JW, Chen TH, Lee WC, Yeh KS, Hsuan SL.** 2009. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 10 derived ApxI induces apoptosis in porcine alveolar macrophages. *Vet Microbiol* **135**:327-333.
41. **Wu CM, Chen ZW, Chen TH, Liao JW, Lin CC, Chien MS, Lee WC, Hsuan SL.** 2011. Mitogen-activated protein kinases p38 and JNK mediate *Actinobacillus pleuropneumoniae* exotoxin ApxI-induced apoptosis in porcine alveolar macrophages. *Vet Microbiol* **151**:372-378.
42. **Ohguchi M, Ishisaki A, Okahashi N, Koide M, Koseki T, Yamato K, Noguchi T, Nishihara T.** 1998. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* toxin induces both cell cycle arrest in the G2/M phase and apoptosis. *Infect Immun* **66**:5980-5987.
43. **Sugai M, Kawamoto T, Pérès SY, Ueno Y, Komatsuzawa H, Fujiwara T, Kurihara H, Suginaka H, Oswald E.** 1998. The cell cycle-specific growth-inhibitory factor produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is a cytolethal distending toxin. *Infect Immun* **66**:5008-5019.
44. **Sun Y, Li D, Giri S, Prasanth SG, Yoo D.** 2014. Differential host cell gene expression and regulation of cell cycle progression by nonstructural protein 11 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Biomed Res Int* **2014**:430508.



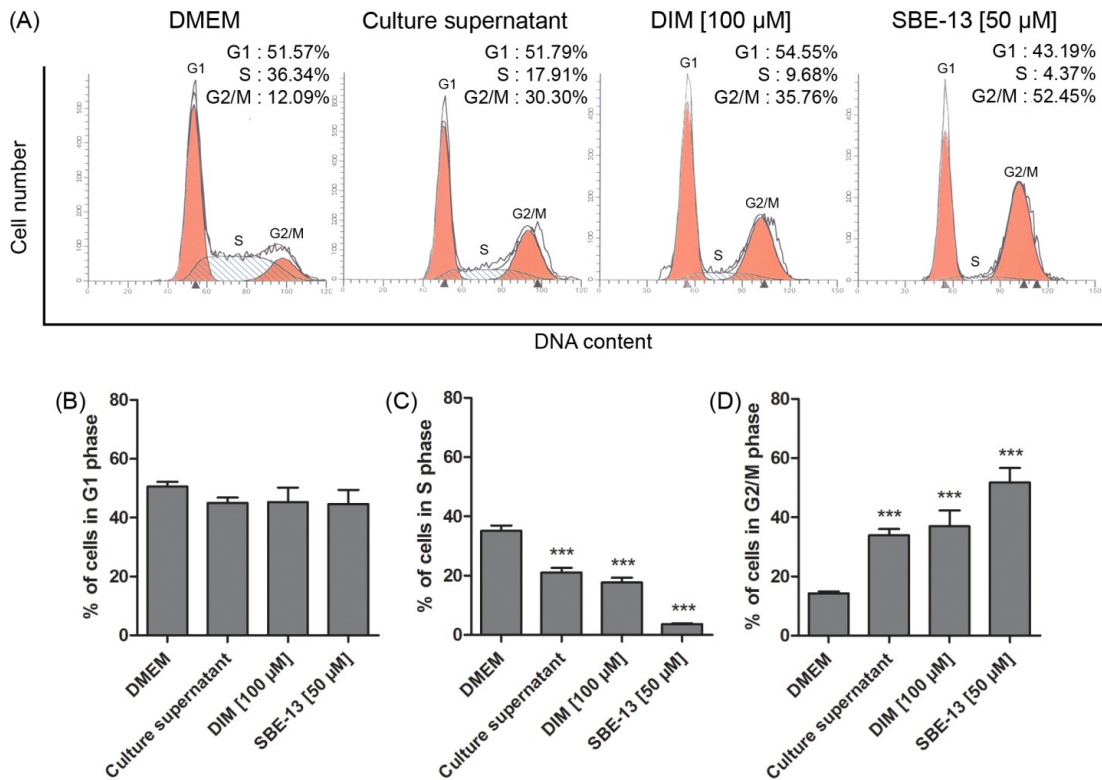
**Figure 1. Repartition of the most upregulated proteins of SJPL cells after PRRSV infection followed or not by the *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant treatment.** CDC25c : ser216 phosphorylated form; CDK1/2 : tyr161 phosphorylated form; Tau : ser516 and ser519 phosphorylated forms; Rb : ser807 and ser811 phosphorylated forms.



**Figure 2. *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant effect on SJPL cell cycle.** (A) Cell cycle analysis histograms; DMEM, nocodazole and aphidicolin as controls are compared to the culture supernatant. A : apoptosis; G1 : Gap-1 phase; S : synthesis phase; G2/M : Gap-2 and mitotic phases. (B) Distribution of cell cycle phases after SJPL cells treatments with the DMEM (  ) or the *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant (  ). Asterisks indicated significant differences between untreated SJPL cells and SJPL cells treated with the *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant. n = 15, \*\*\* $P \leq 0.0001$ , values are presented as  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

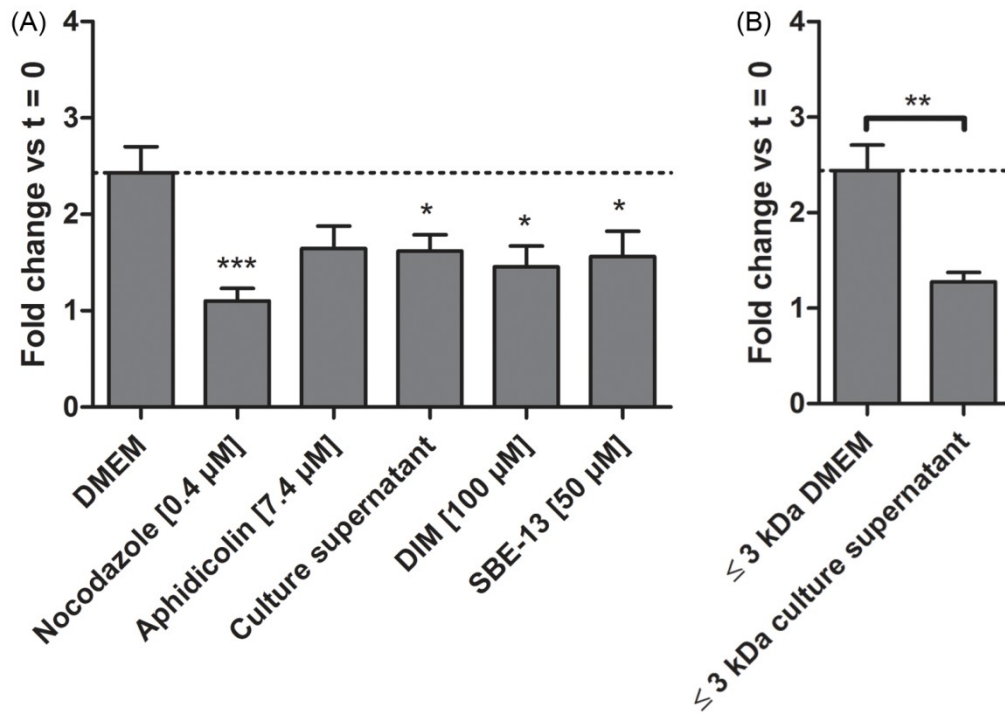


**Figure 3. The  $\leq 3$  kDa *App $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC* culture supernatant ultrafiltrate effect on SJPL cell cycle.** (A) Cell cycle analysis histogram;  $\leq 3$  kDa DMEM ultrafiltrate as control is compared to the  $\leq 3$  kDa *App $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC* culture supernatant ultrafiltrate. (B) Distribution of cell cycle phases after SJPL cells treatments with the  $\leq 3$  kDa DMEM ultrafiltrate (  ) or the  $\leq 3$  kDa *App $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC* culture supernatant ultrafiltrate (  ). Asterisks indicated significant differences.  $n = 4$ ,  $**P = 0.0054$ , values are presented as  $\pm$  SEM.

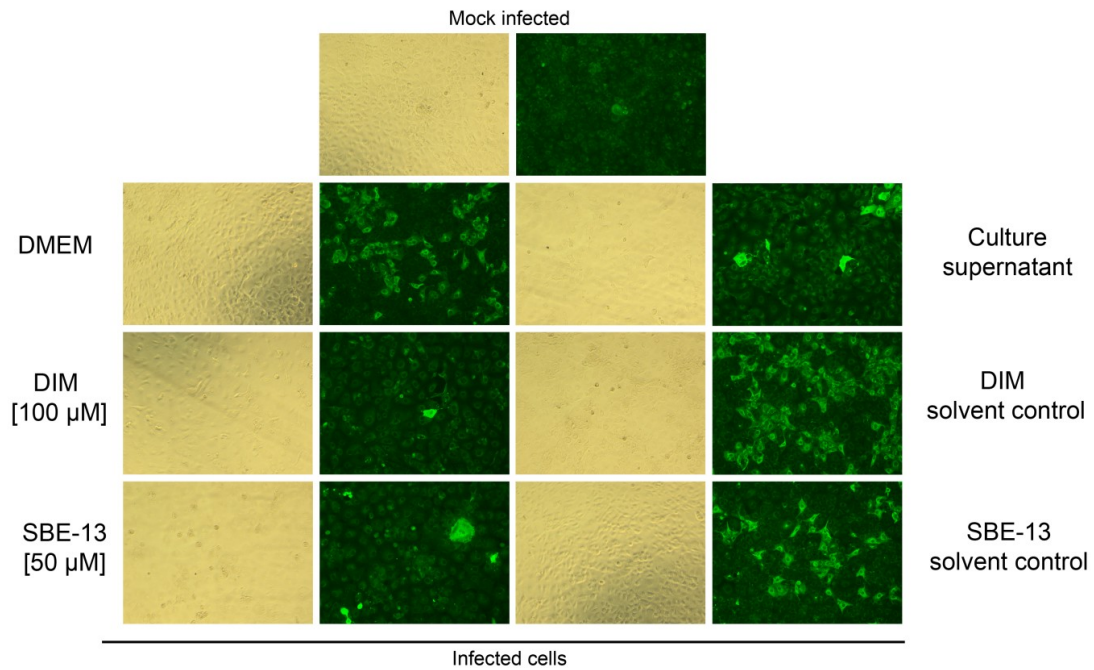


**Figure 4. Modulation of SJPL cell cycle by DIM and SBE-13.** (A) Cell cycle analysis histograms; DMEM and *AppΔapxICΔapxIC* culture supernatant are compared to DIM and SBE-13. (B) Percentage of cells in G1 phase. (C) Percentage of cells in S-phase. (D) Percentage of cells in G2/M-phases. Asterisks indicated significant differences between DMEM cells and treated cells.  $n \geq 6$ ,  $***P \leq 0.0001$ , values are presented as  $\pm$  SEM.

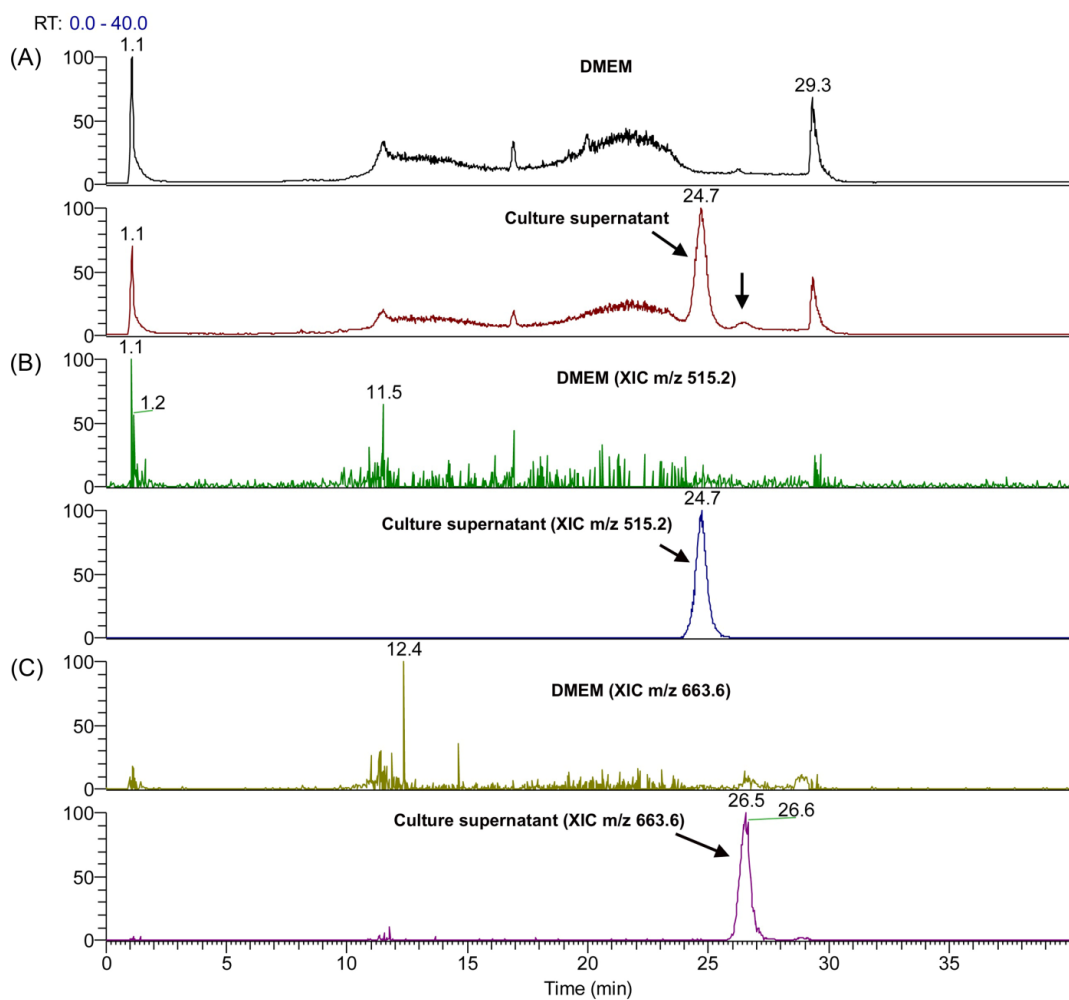




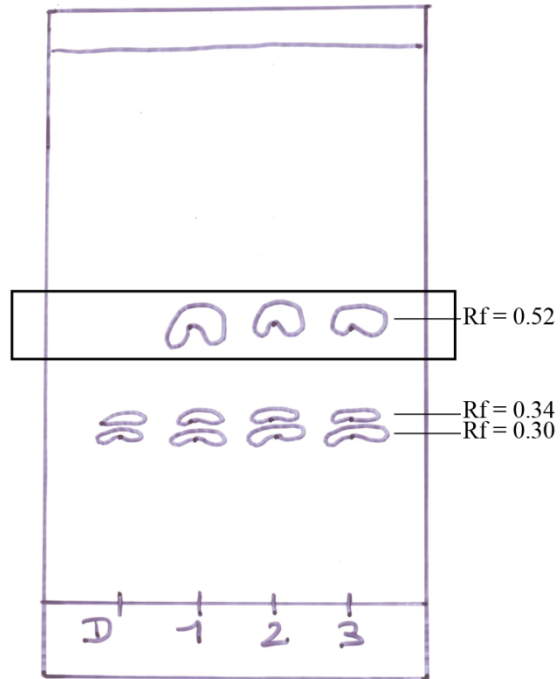
**Figure 5. Investigation of treated SJPL cell proliferation using cell counts.** As proliferative index, cell counts were carried out before and after treatments. (A) Cells treated with nocodazole (known to induce apoptosis), aphidicolin, *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant, DIM or SBE-13. (B) Cells treated with the ≤ 3 kDa *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant ultrafiltrate is compared to the ≤ 3 kDa DMEM ultrafiltrate. Asterisks indicated significant differences between DMEM cells or the ≤ 3 kDa DMEM ultrafiltrate and treated cells. n = 8, \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P = 0.0013$ , \*\*\* $P \leq 0.0001$ , values are presented as  $\pm$  SEM.



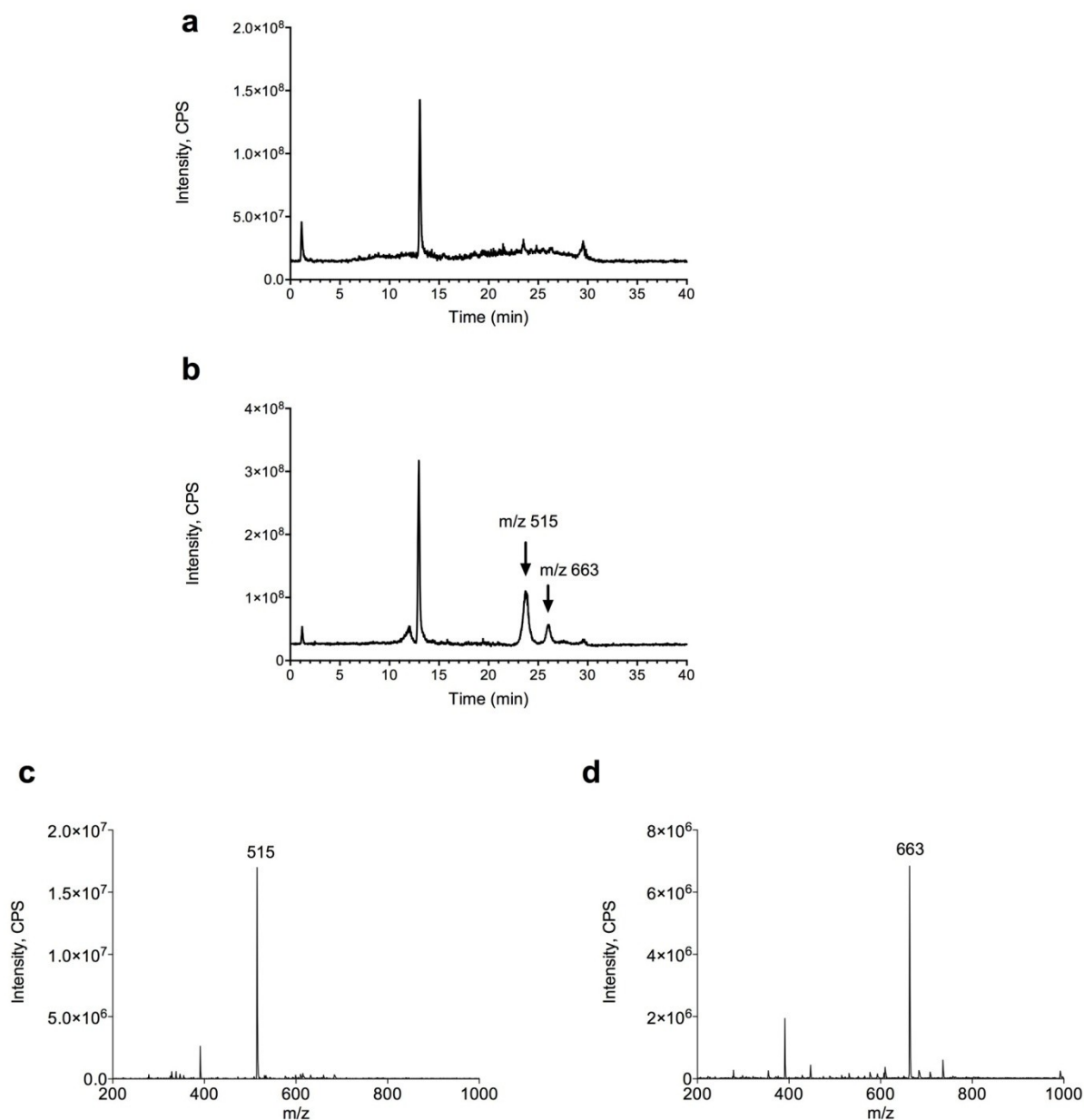
**Figure 6. Detection of PRRSV N antigen in PRRSV SJPL infected and treated cells.** Primary antibody targeted the PRRSV N protein and was revealed by an anti-rabbit antiserum FITC-conjugated. Bright field pictures and immunofluorescence pictures were acquired at 100 × magnification.



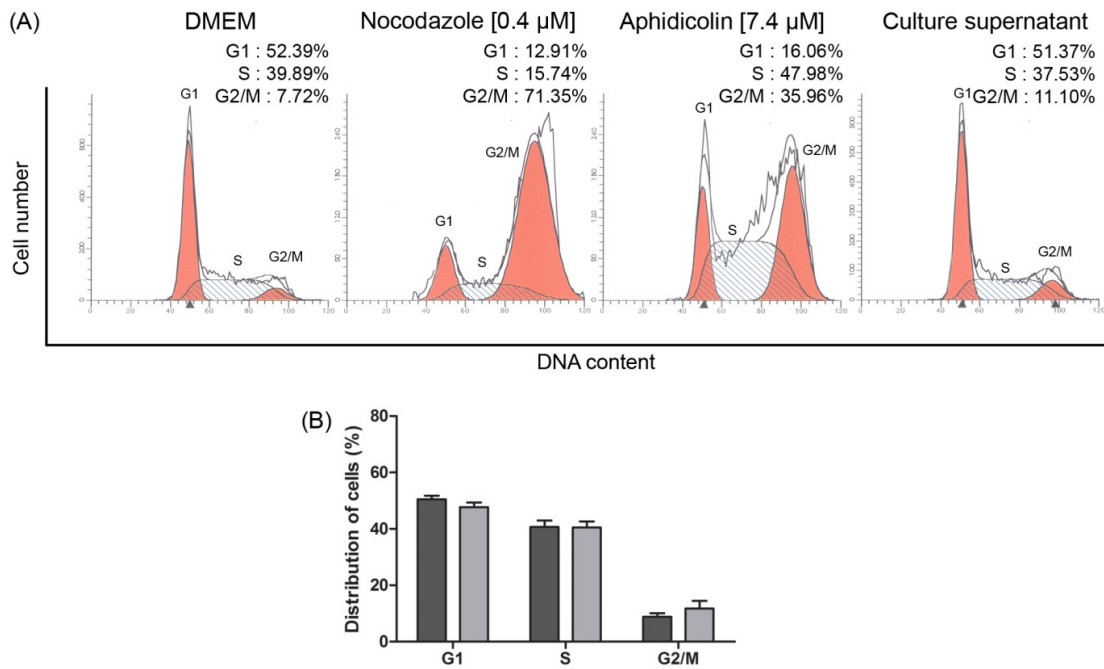
**Figure 7. Differential comparison of ions present in DMEM or *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant using LC-MS/MS.** Samples were analyzed by LC-MS/MS in full scan positive ion mode. (A) Total ion current chromatogram (TIC) of DMEM and *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant. (B) Extracted ion chromatogram (XIC) m/z 515.2. (C) XIC m/z 663.6. Black arrows : additional peaks in the culture supernatant.



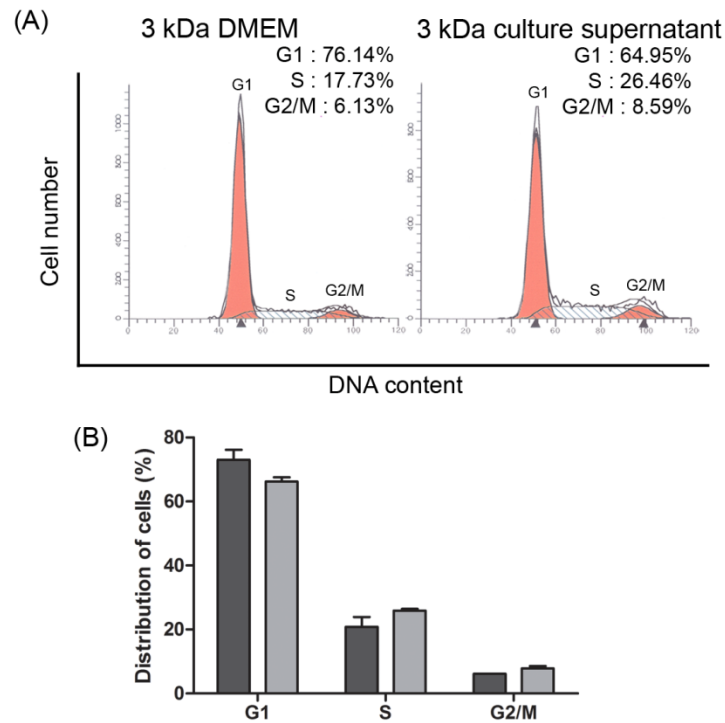
**Figure 8. Migration of DMEM and of different strains of *A. pleuropneumoniae* culture supernatant on TLC plate.** Representation of the TLC plate after migration and revelation. D : DMEM; 1 : App $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC culture supernatant; 2 : *A. pleuropneumoniae* (serotype 5b; strain L20) culture supernatant ; 3 : *A. pleuropneumoniae* (serotype 1; strain 4074) culture supernatant. Frame spots : spots of interest (Rf = 0.52).



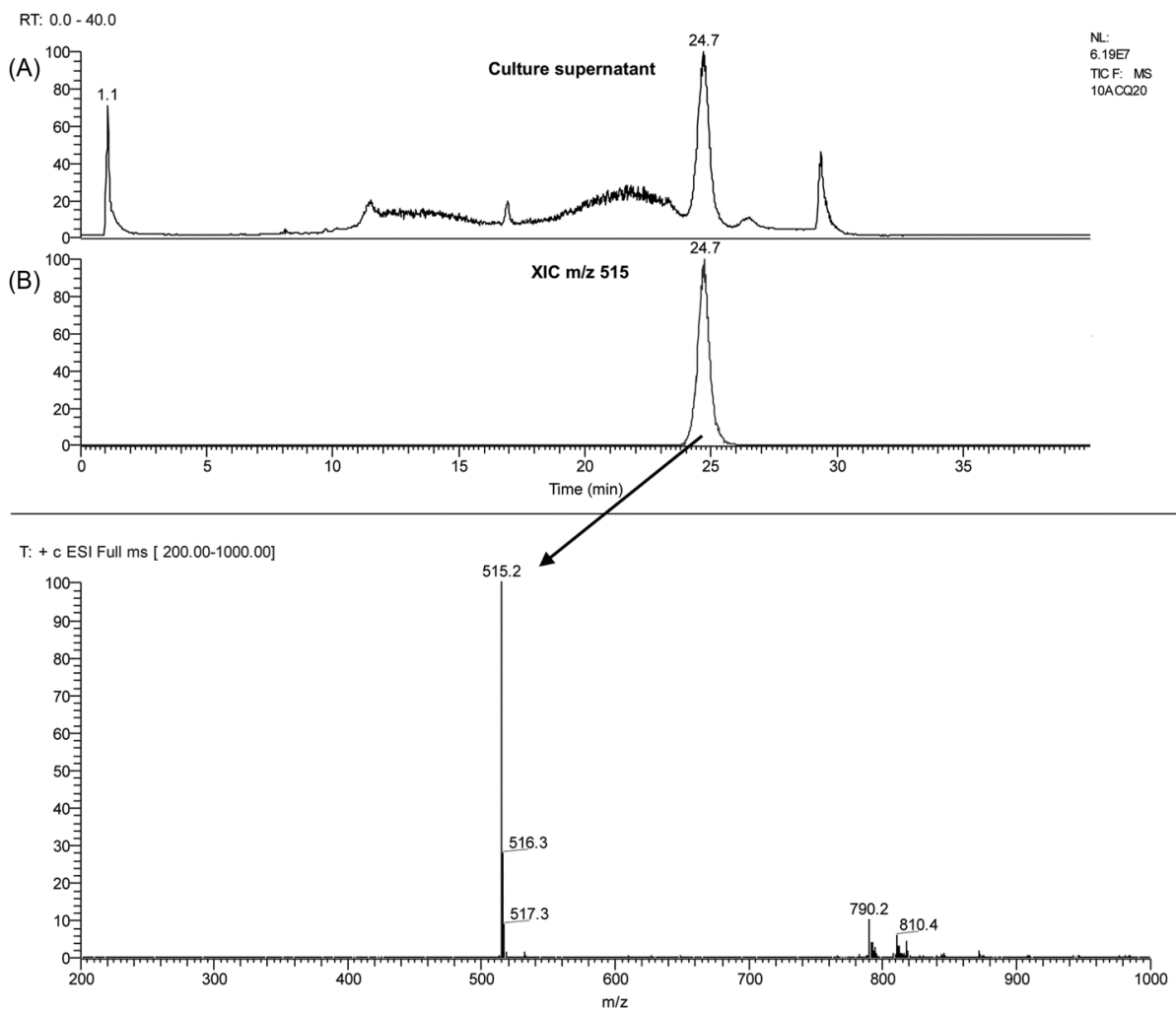
**Figure 9. LC-MS/MS analyses of the molecules extracted from the TLC spot observed at Rf 0.52.** (A) TIC of the control TLC spot. (B) TIC of the TLC spot present in the *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant. (C) XIC *m/z* 515.2 of the *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant TLC spot. (D) XIC *m/z* 663.6 of the *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant TLC spot. The unique and signature peaks at *m/z* 515.2 and 663.6 were observed exclusively into *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant.



**Figure S1. Influence of the *App $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC* culture supernatant on MARC-145 cell cycle.** (A) Cell cycle analysis histograms; DMEM, nocodazole and aphidicolin as controls are compared to the culture supernatant. (B) Distribution of cell cycle phases after MARC-145 cells treatments with the DMEM (  ) or the *App $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC* culture supernatant (  ). n = 4, values are presented as  $\pm$  SEM.

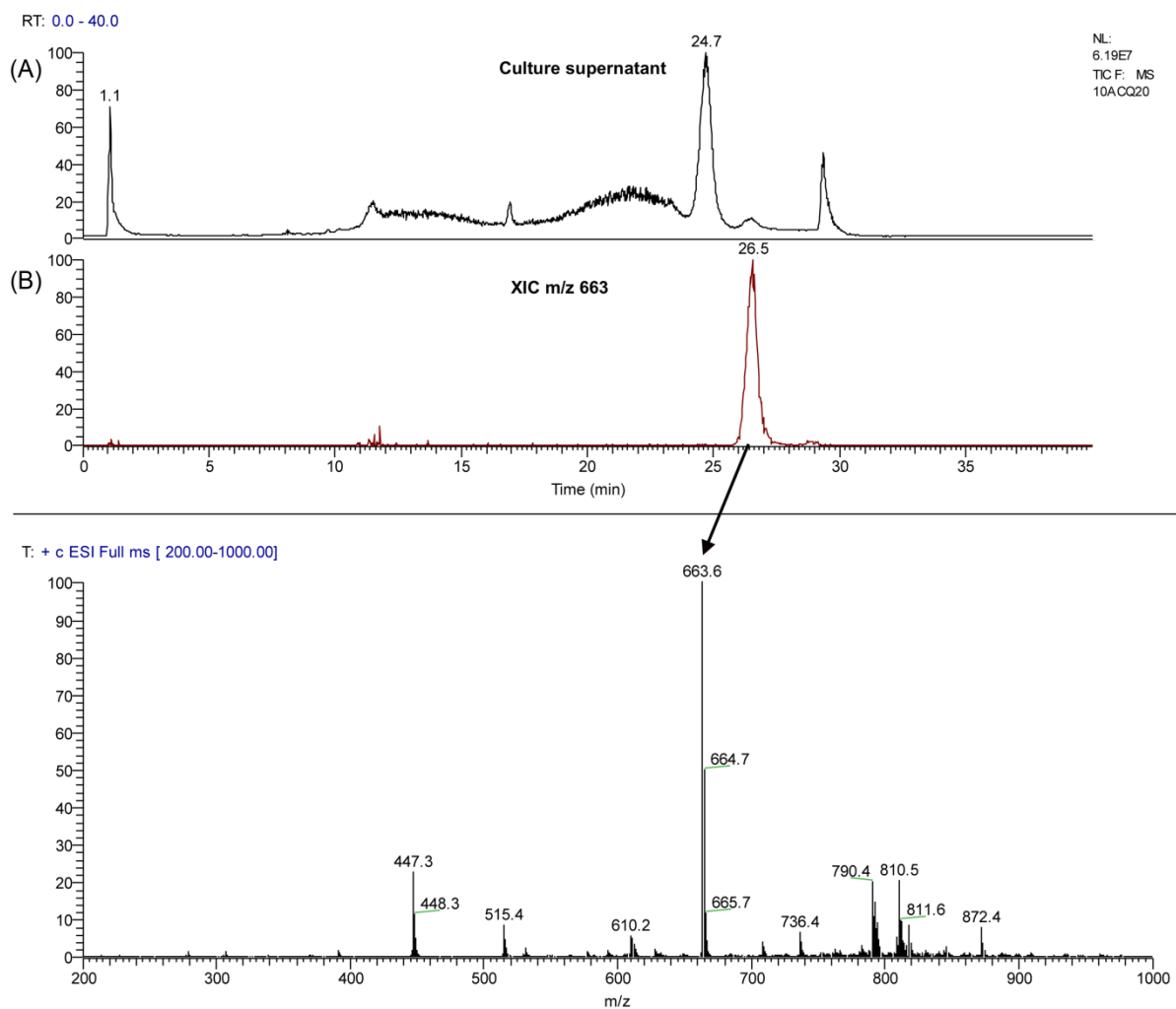


**Figure S2. Influence of the  $\leq 3$  kDa *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant ultrafiltrate on MARC-145 cell cycle.** (A) Cell cycle analysis histograms;  $\leq 3$  kDa DMEM ultrafiltrate as control is compared to the  $\leq 3$  kDa *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant ultrafiltrate. (B) Distribution of cell cycle phases after MARC-145 cells treatments with the  $\leq 3$  kDa DMEM ultrafiltrate (  ) or the  $\leq 3$  kDa *AppΔapxICΔapxIIC* ultrafiltrate (  ).  $n = 2$ , values are presented as  $\pm$  SEM.

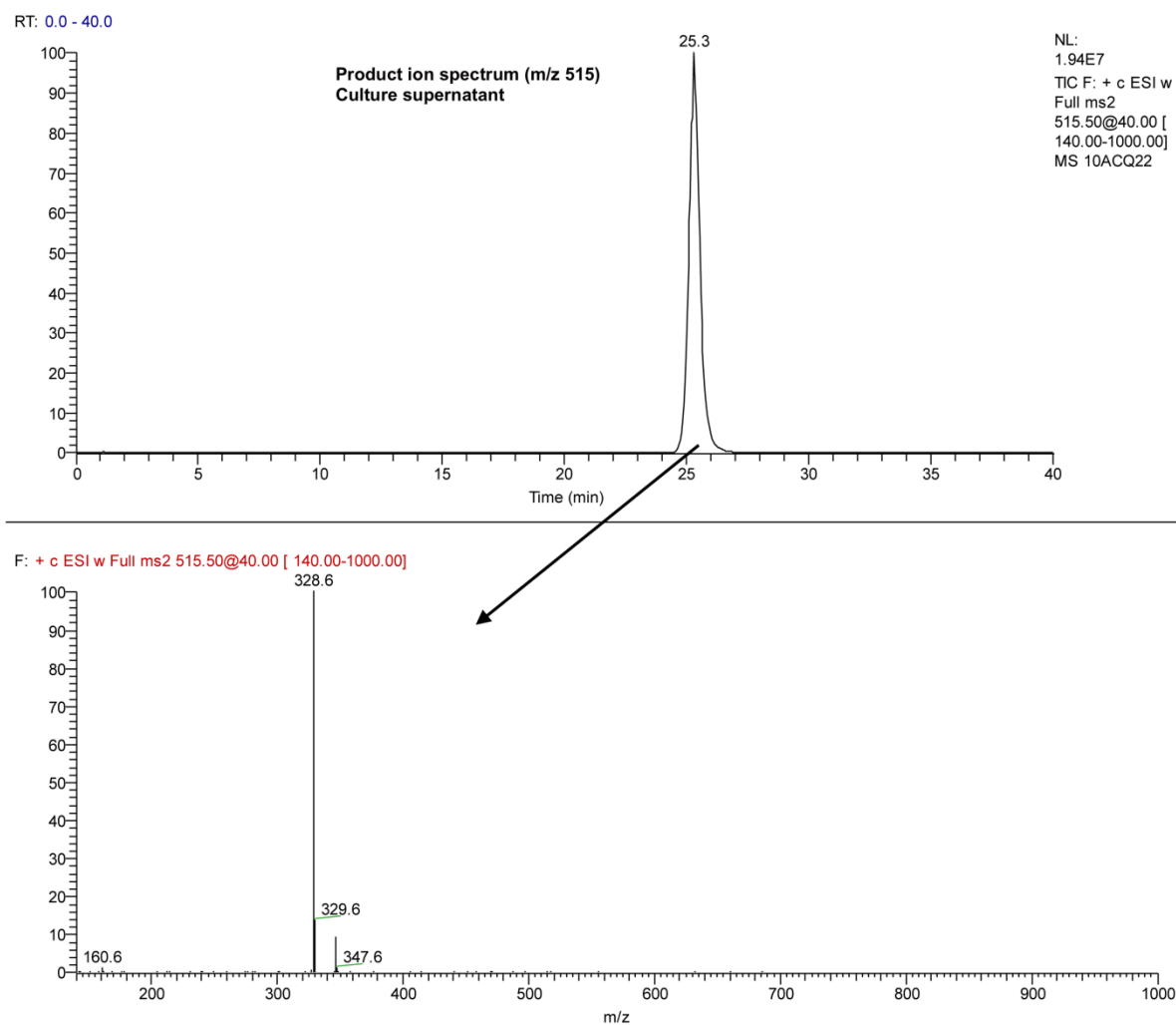


**Figure S3.** Extracted ion chromatogram of the  $m/z$  515.2 ion present in the *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant. (A) TIC of *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant. (B) XIC  $m/z$  515.2 of *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant.

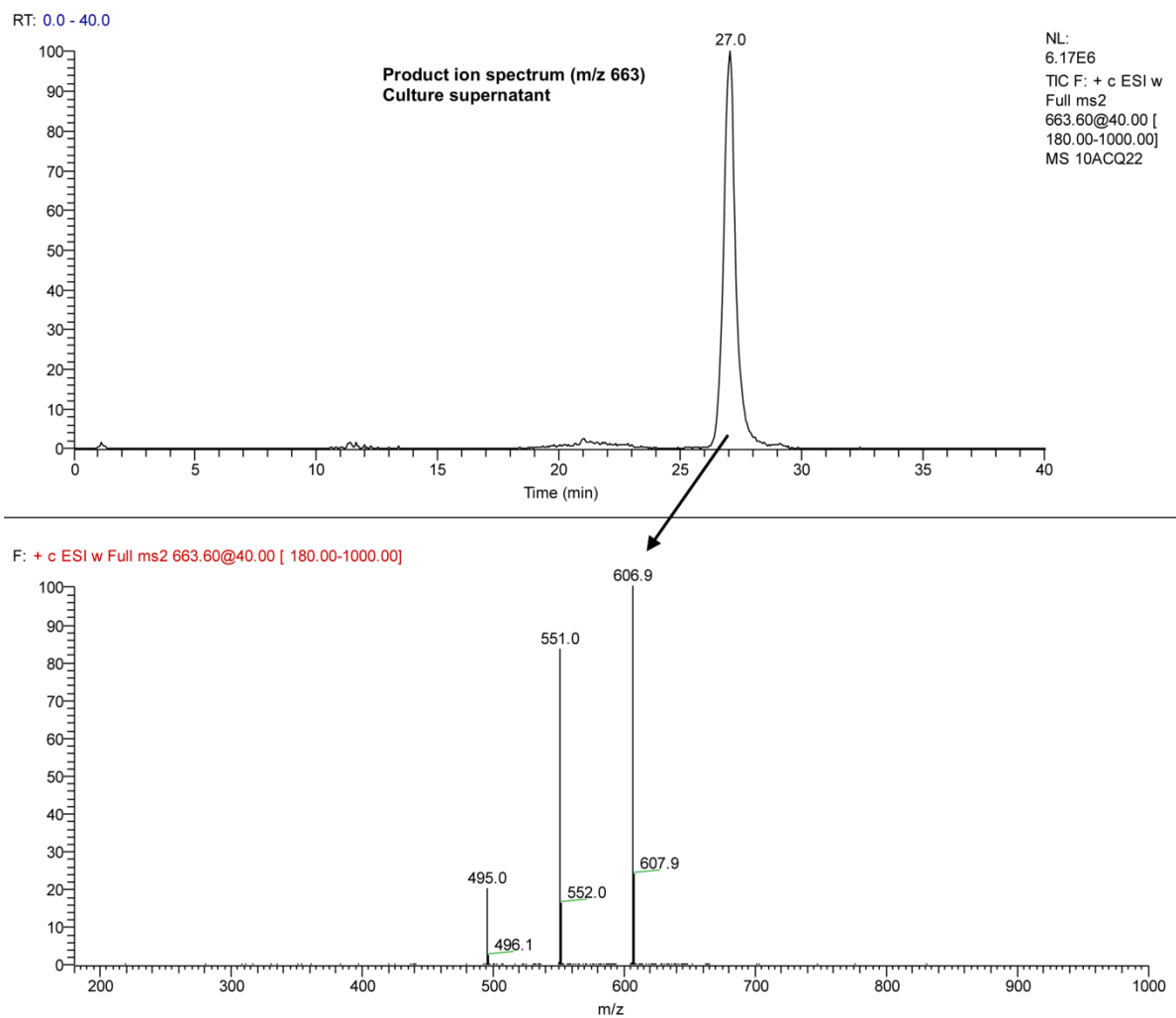




**Figure S4. Extracted ion chromatogram of the m/z 663.6 ion present in the *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant. (A) TIC of *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant. (B) XIC m/z 663.6 of *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant.**



**Figure S5. Fragmentation pattern of the m/z 515.2 present in the *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant.**



**Figure S6. Fragmentation pattern of the m/z 663.6 present in the *AppΔapxICΔapxIIC* culture supernatant.**

**Table SI. Protein profiling of SJPL cells after infection or not with PRRSV for 4 hours (MOI = 0.5) and/or treatment for 18 hours with the App $\Delta$ apxIC $\Delta$ apxIIC culture supernatant using the Kinex™ KAM-850 antibody microarray.**

%CFC : percent “change from control” (moke-infected and untreated SJPL cells).

$$\%CFC = ((\text{Globally Normalized Treated} - \text{Globally Normalized Control}) / \text{Globally Normalized Control}) * 100$$

Major functions	Protein name	Kinexus antibody codes	Protein phosphorylation sites	%CFC			Uniprot access number
				Supernatant	PRRSV	PRRSV and supernatant	
<i>Transcription and translation factors</i>							
	4E-BP1						<a href="#">Q13541</a>
	<b>Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1</b>						
		NN166	Pan-specific	134	19	179	
		PN001	S65	594	2	172	
		PN114	T45	162	47	311	
		PN128	T70	-37	-45	30	
	ARRB1						<a href="#">P49407</a>
	<b>Beta-arrestin-1</b>						
		NN121	Pan-specific	-47	-38	73	
		PN133	S412	-3	8	33	
	ATF2						<a href="#">P15336</a>
	<b>Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-2</b>						
		NN160	Pan-specific	-84	-84	-64	
		PN006-1	T69/T71	-10	-21	4	
		PN006-3	T69/T71	102	8	90	
		PN115	S112	161	27	70	
	CDK8						<a href="#">P49336</a>
	<b>Cyclin-dependent kinase 8</b>						
		NK031-2	Pan-specific	-6	24	121	
		NK031-4	Pan-specific	88	16	10	
		NK031-5	Pan-specific	5	48	41	
	c-Myc						<a href="#">P01106</a>
	<b>Myc proto-oncogene protein</b>						

	PN130	T58/S62	25	27	167	
eIF2a						<a href="#">P05198</a>
	<b>Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1</b>					
	NN038-1	Pan-specific	36	19	88	
	PN028-1	S52	19	-15	37	
	PN028-2	S52	-1	-18	62	
eIF4E						<a href="#">P06730</a>
	<b>Eukaryotic translation initiation factor 4E</b>					
	NN039-1	Pan-specific	4	21	266	
	PN030-1	S209	-26	148	191	
	PN030-2	S209	14	-1	-8	
Elk-1						<a href="#">P19419</a>
	<b>ETS domain-containing protein Elk-1</b>					
	NN168	Pan-specific	26	9	196	
	PN149	S383	16	-17	53	
FKHRL1						<a href="#">O43524</a>
	<b>Forkhead box protein O3</b>					
	PN032	T32	88	33598	28258	
	PN032-1	T32	-32	94	180	
	PN145-PN032	T32	-31	-18	19	
IKKg						<a href="#">Q9Y6K9</a>
	<b>NF-kappa-B essential modulator</b>					
	NN161	Pan-specific	89	12	-25	
Jun						<a href="#">P05412</a>
	<b>Transcription factor AP-1</b>					
	NN162	Pan-specific	-82	-84	-89	
	PN047	S63	-41	-30	-67	
	PN048-1	S73	13	56	31	
	PN048-2	S73	14	-10	-29	
PARP1						<a href="#">P09874</a>
	<b>Poly [ADP-ribose] polymerase 1</b>					
	NN085-1	Pan-specific	69	53	73	
	NN085-2	Pan-specific	-44	-57	-27	
PDK1						<a href="#">O15530</a>
	<b>3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1</b>					
	NK126-1	Pan-specific	39	100	4	
	NK126-2	Pan-specific	-2	55	-11	
	PK066	S241	-6	-37	-8	
RelB						<a href="#">Q01201</a>

	<b>Transcription factor RelB</b>					
	NN170	Pan-specific	25	6	27	
	PN151	S573	73	110	122	
S6						<a href="#">P62753</a>
	<b>40S ribosomal protein S6</b>					
	PN073	S235	67	103	139	
Smad1/5/8						<a href="#">Q15797</a>
	<b>SMAD family member 1</b>					
	PN075	S463/S465/S467	8	-24	136	
STAT1a/b						<a href="#">P42224</a>
	<b>Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta</b>					
	NN102-NN124	Pan-specific	-3	14	17	
	NN102-NN124-2	Pan-specific	-52	-4	-39	
	NN139	Pan-specific	48	99	171	
	PN078-PN135	S727	96	5	-6	
	PN079-PN136-1	Y701	-1	-61	-49	
STAT3						<a href="#">P40763</a>
	<b>Signal transducer and activator of transcription 3</b>					
	NN104	Pan-specific	-34	-14	-12	
	NN104-2	Pan-specific	-53	-43	-37	
	PN081-2	S727	71	-17	-14	
	PN082	Y705	112	80	65	
	PN082-1	Y705	22	-47	-53	
STAT5A						<a href="#">P42229</a>
	<b>Signal transducer and activator of transcription 5A</b>					
	NN105	Pan-specific	83	-29	3	
	PN083	Y694	97	-22	-28	
	PN083-1	Y694	75	108	110	
	PN119	S780	-44	-40	-50	
YB1						<a href="#">P67809</a>
	<b>Nuclease-sensitive element-binding protein 1</b>					
	PN152	S102	168	-22	0	
<i>Proteins implicated in signal transduction pathway</i>						
BMX						<a href="#">P51813</a>
	<b>Cytoplasmic tyrosine-protein kinase BMX</b>					
	NK012	Pan-specific	15	54	399	
	PK003	Y40	-35	-44	-29	
CAMK1a						<a href="#">Q14012</a>

<b>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1</b>					
	NK211	Pan-specific	25	63	89
CaMK1d					<a href="#">Q8IU85</a>
<b>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1D</b>					
	NK016-1	Pan-specific	60	3	80
	NK016-2	Pan-specific	-7	10	-19
CaMK4					<a href="#">Q16566</a>
<b>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV</b>					
	NK021	Pan-specific	64	26	78
	NK021-2	Pan-specific	49	19	130
	NK021-3	Pan-specific	40	62	54
CaMKK					<a href="#">Q8N5S9</a>
<b>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1</b>					
	NK022	Pan-specific	81	15	49
CAV1					<a href="#">Q03135</a>
<b>Caveolin-1</b>					
	NN167	Pan-specific	148	81	15
	PN147	Y14	194	15	158
CAV2					<a href="#">P51636</a>
<b>Caveolin 2</b>					
	NN022-1	Pan-specific	168	-4	-1
	PN018	S36	44	-26	-35
Csk					<a href="#">P41240</a>
<b>Tyrosine-protein kinase CSK</b>					
	NK044	Pan-specific	-37	68	91
	NK044-2	Pan-specific	-23	-5	-6
DAXX					<a href="#">Q9UER7</a>
<b>Death domain-associated protein 6</b>					
	NN034	Pan-specific	2	58	62
Dok2					<a href="#">Q60496</a>
<b>Docking protein 2</b>					
	PN027	Y139	-5	27	62
	PN027-2	Pan-specific	12	56	109
EGFR					<a href="#">P00533</a>
<b>Epidermal growth factor receptor</b>					
	NK052-1	Pan-specific	-2	-26	-1
	PK010	Y1172	-4	-10	24
	PK010-2	Y1172	-2	-20	7
	PK011	Y1197	43	41	52

	PK011-1	Y1197	20	-17	24	
	PK121	T693	5	21	90	
	PK122-1	Y1092	2	-36	35	
	PK123	Y1110	6	26	108	
ErbB2	<b>Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2</b>					<a href="#">P04626</a>
	NK054-1	Pan-specific	52	53	245	
	NK054-2	Pan-specific	-6	-16	-20	
	PK013-1	Y1248	-1	-30	-7	
	PK013-2	Y1248	-30	-7	52	
	PK134	T686	-19	6	7	
Erk1/2	<b>Mitogen-activated protein kinase</b>					<a href="#">P27361</a> <a href="#">P28482</a>
	NK055-NK056	Pan-specific	37	6	167	
	NK055-NK056-2	Pan-specific	-14	-32	-57	
	NK055-NK056-4	Pan-specific	8	12	135	
	NK055-NK056-5	Pan-specific	4	0	45	
	NK055-NK056-6	Pan-specific	30	976	163	
	NK055-NK056-8	Pan-specific	-14	-12	391	
	PK014-PK015-2	T185/Y187	20	4	115	
	PK014-PK015-3	T202/Y204	-17	-29	14	
	PK014-PK015-4	T202/Y204	-43	11	87	
Erk4	<b>Mitogen-activated protein kinase</b>					<a href="#">Q13164</a>
	NK058	Pan-specific	29	118	171	
Erk5	<b>Mitogen-activated protein kinase</b>					<a href="#">Q13164</a>
	NK206-1	Pan-specific	-15	25	91	
	NK206-2	Pan-specific	-44	6	182	
	NK206-3	Pan-specific	-31	-28	-17	
	PK016	T218/Y220	2	6	31	
	PK016-3	T218/Y220	149	117	93	
FAK	<b>Focal adhesion kinase 1</b>					<a href="#">Q05397</a>
	NK060	Pan-specific	-43	-42	-48	
	PK017	Y397	-7	-24	-38	
	PK017-1	Y397	45	64	87	
	PK020-3	S722	-6	-15	-29	
	PK021	S732	1	-20	-10	



	PK022-2	S843	-29	-30	-27	
	PK024	S910	21	-11	-3	
<hr/>						
GNB2L1						<a href="#">P63244</a>
	<b>Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1</b>					
	NN045	Pan-specific	8	142	62	
<hr/>						
IGF1R						<a href="#">P08069</a>
	<b>Insulin-like growth factor 1 receptor</b>					
	NK074	Pan-specific	102	29	112	
	PK139	Y1161/Y1185	35	23	-13	
<hr/>						
IKKa						<a href="#">Q15111</a>
	<b>Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha</b>					
	NK075-1	Pan-specific	-48	-48	-26	
	NK075-2	Pan-specific	-7	16	29	
	NK075-3	Pan-specific	44	-15	5	
	NK075-4	Pan-specific	-12	39	9	
	NK075-5	Pan-specific	-20	19	21	
	NK075-6	Pan-specific	18	154	202	
<hr/>						
IKKa/b						<a href="#">Q15111</a> <a href="#">Q14920</a>
	<b>Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha/beta</b>					
	PK030-PK031	S181	-95	-24	-95	
<hr/>						
IKKb						<a href="#">Q14920</a>
	<b>Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta</b>					
	NK076-1	Pan-specific	307	-3	9	
	NK076-2	Pan-specific	1	32	12	
	NK076-3	Pan-specific	-26	52	45	
	NK076-4	Pan-specific	8	33	35	
<hr/>						
ILK1						<a href="#">Q13418</a>
	<b>Integrin-linked protein kinase</b>					
	NK078-2	Pan-specific	245	37	47	
	NK078-3	Pan-specific	33	56	58	
<hr/>						
JAK1						<a href="#">P23458</a>
	<b>Tyrosine-protein kinase JAK1</b>					
	NK084-1	Pan-specific	-20	-20	-14	
	NK084-2	Pan-specific	24	121	51	
	PK126	Y1034	159	-3	-15	
<hr/>						
JNK1/2/3						<a href="#">P45983</a> <a href="#">P45984</a> <a href="#">P53779</a>
	<b>c-Jun N-terminal kinase 1/2/3</b>					
	NK088-1	Pan-specific	-10	88	61	
	NK088-2	Pan-specific	-26	54	19	

	NK088-3	Pan-specific	9	-13	-3	
	PK035-1	T183/Y185	0	-37	-58	
	PK035-2	T183/Y185	-49	-64	-74	
	PK035-4	T183/Y185	-6	-1	-22	
JNK2/3						<a href="#">P45984</a>
		<b>c-Jun N-terminal kinase 2/3</b>				<a href="#">P53779</a>
	NK196	Pan-specific	4	147	77	
Ksr1						<a href="#">Q8IVT5</a>
		<b>Kinase suppressor of Ras 1</b>				
	NK090	Pan-specific	-17	-3	129	
	NK090-2	Pan-specific	-1	65	83	
MEK1 (also named MAP2K1)						<a href="#">Q02750</a>
		<b>Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1</b>				
	NK099-1	Pan-specific	69	-2	-28	
	NK099-2	Pan-specific	43	54	72	
	NK099-3	Pan-specific	23	27	37	
	NK099-4	Pan-specific	14	19	28	
	NK099-5	Pan-specific	-2	26	46	
	PK046-1	T292	31	15	20	
	PK046-2	T292	33	25	40	
	PK046-3	T292	-11	-27	-6	
	PK047-2	S298	-3	0	28	
	PK048-1	T386	0	-38	-30	
	PK048-2	T386	31	21	13	
	PK048-3	T386	45	63	92	
Mnk2						<a href="#">Q9HBH9</a>
		<b>MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 2</b>				
	NK111	Pan-specific	66	77	79	
PAC1						<a href="#">Q05923</a>
		<b>Dual specificity protein phosphatase 2</b>				
	NP008	Pan-specific	3	23	96	
PAK1						<a href="#">Q13153</a>
		<b>Serine/threonine-protein kinase PAK 1</b>				
	NK122	Pan-specific	-25	-21	-25	
	NK122-2	Pan-specific	-44	-28	-10	
	NK122-4	Pan-specific	30	43	148	
	PK130	T212	72	54	128	
	PK061	S144/S141/S154	-7	-12	10	
PAK2						<a href="#">Q13177</a>

<b>Serine/threonine-protein kinase PAK 2</b>					
	NK200	Pan-specific	62	53	201
	NK200-2	Pan-specific	35	4	40
PI3KR4					
<b>Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4</b>					
	NN114	Pan-specific	13	93	82
PKA R1a					
<b>cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit</b>					
	NN116	Pan-specific	233	34	-4
PKA R2a					
<b>cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit</b>					
	NK128	Pan-specific	276	129	44
	PK069	S99	47	62	45
PKBa (also named Akt1)					
<b>RAC-alpha serine/threonine-protein kinase</b>					
	NK129	Pan-specific	-32	-15	-20
	NK129-2	Pan-specific	624	11	-30
	PK071-2	T308	326	-44	-37
	PK072-1	S473	174	60	40
	PK072-3	S473	26	4	-14
	PK072-5	S473	-10	59	-42
	PK148	Y474	341	55	77
PKBb (also named Akt2)					
<b>RAC-beta serine/threonine-protein kinase</b>					
	NK130-1	Pan-specific	300	50	39
	NK130-2	Pan-specific	302	-6	3
	NK130-3	Pan-specific	71	64	50
	NK130-5	Pan-specific	38	143	109
	NK130-6	Pan-specific	84	30	66
	NK130-7	Pan-specific	120	25	38
PKBg (also named Akt3)					
<b>RAC-gamma serine/threonine-protein kinase</b>					
	NK131-1	Pan-specific	82	39	23
	NK131-2	Pan-specific	56	102	67
PKC					
<b>Protein kinase C alpha type</b>					
	NK201	Pan-specific	37	86	103
PKCa					
<b>Protein kinase C alpha type</b>					

	NK132	Pan-specific	286	48	42	
	PK073	S657	251	36	37	
	PK074	T638/T641	197	-21	-34	
PKCb1						<a href="#">P05771</a>
	<b>Protein kinase C beta type</b>					
	NK133	Pan-specific	22	16	15	
	NK133-2	Pan-specific	83	63	64	
PKCb1/2						<a href="#">P05771</a>
	<b>Protein kinase C beta type</b>					
	PK075	T500	367	-8	-30	
	PK075-2	T500	571	5	-24	
PKCb2						<a href="#">P05771-2</a>
	<b>Protein kinase C beta type</b>					
	NK134	Pan-specific	222	56	55	
	NK134-2	Pan-specific	12	11	11	
	PK076-2	T641	50	11	-7	
PKCd						<a href="#">Q05655</a>
	<b>Protein kinase C delta type</b>					
	NK135	Pan-specific	58	60	50	
	PK077-1	Y313	158	106	45	
	PK077-2	Y313	206	69	47	
	PK078	T507	-9	16	24	
	PK080	S664	79	3	-13	
PKCe						<a href="#">Q02156</a>
	<b>Protein kinase C epsilon type</b>					
	NK136	Pan-specific	31	11	26	
	NK136-2	Pan-specific	50	35	39	
	PK081-1	S729	63	195	41	
PKCh						<a href="#">P24723</a>
	<b>Protein kinase C eta type</b>					
	NK218	Pan-specific	63	52	96	
PP2A/Ca+b						<a href="#">P62714</a>
	<b>Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform</b>					
	NP013/NP014	Pan-specific	-90	-79	-78	
PRAS40						<a href="#">Q96B36</a>
	<b>Proline-rich AKT1 substrate 1</b>					
	PN062	T246	35	37	94	
PTEN						<a href="#">P60484</a>
	<b>Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN</b>					

	NP023	Pan-specific	131	-18	-36	
	NP023-2	Pan-specific	25	-35	-19	
	PP003	S380/T382/S385	22	-32	-14	
Raf-A						<a href="#">P10398</a>
	<b>Serine/threonine-protein kinase A-Raf</b>					
	NK205	Pan-specific	-6	35828	47118	
	NK205-2	Pan-specific	-15	-53	-43	
ROR2						<a href="#">Q01974</a>
	<b>Tyrosine-protein kinase transmembrane receptor ROR2</b>					
	NK162	Pan-specific	39	73	94	
Src						<a href="#">P12931</a>
	<b>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</b>					
	NK172	Pan-specific	8	47	108	
	NK172-2	Pan-specific	28	54	54	
	NK172-3	Pan-specific	66	20	132	
	NK172-4	Pan-specific	-29	22	77	
	PK107	Y419	28	-4	60	
	PK108	Y530	22	-30	25	
Tyk2						<a href="#">P29597</a>
	<b>Non-receptor tyrosine-protein kinase TYK2</b>					
	NK181	Pan-specific	122	48	166	
	NK181-2	Pan-specific	38	90	53	
<i>Proteins implicated in host-pathogen interaction or in immunity response</i>						
	ASK1 (also named MAP3K5)					<a href="#">Q99683</a>
	<b>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5</b>					
	NK007	Pan-specific	101	19	61	
	NK007-2	Pan-specific	43	26	97	
	PK143	S1046	-46	7	64	
Axl						<a href="#">P30530</a>
	<b>Tyrosine-protein kinase receptor UFO</b>					
	NK010	Pan-specific	125	18	55	
Btk						<a href="#">Q06187</a>
	<b>Tyrosine-protein kinase BTK</b>					
	NK014	Pan-specific	50	28	81	
	PK004	Y223	205	15	219	
CD45						<a href="#">P08575</a>
	<b>Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C</b>					
	NP001	Pan-specific	136	78	51	

CDC2L5 ( also named CHED)					<a href="#">Q14004</a>
<b>Cyclin-dependent kinase 13</b>					
	NK024	Pan-specific	45	95	95
CREB1					<a href="#">P16220</a>
<b>Cyclic AMP-responsive element-binding protein 1</b>					
	PN023	S129/S133	-5	-24	47
	PN024	S133	13	-36	-52
	PN024-2	S133	-9	50939	219
Hsp60					<a href="#">P10809</a>
<b>60 kDa heat shock protein, mitochondrial</b>					
	NN059-1	Pan-specific	16	39	71
	NN059-2	Pan-specific	-21	-32	-43
	NN059-3	Pan-specific	118	15	33
Hsp90a/b					<a href="#">P07900</a>
<b>Heat shock protein HSP 90-alpha</b>					
	NN061	Pan-specific	7	29	16
	NN061-1	Pan-specific	-34	-58	-54
	NN061-2	Pan-specific	28	31	49
	NN061-3	Pan-specific	35	82	330
	NN061-4	Pan-specific	-3	38	41
IRAK2					<a href="#">Q43187</a>
<b>Interleukin-1 receptor-associated kinase-like 2</b>					
	NK081	Pan-specific	11	45	38
	NK081-2	Pan-specific	136	48	8
IRAK4					<a href="#">Q9NWZ3</a>
<b>Interleukin-1 receptor-associated kinase 4</b>					
	NK083-1	Pan-specific	-8	-45	-62
	NK083-2	Pan-specific	9	457	66
Lyn					<a href="#">P07948</a>
<b>Tyrosine-protein kinase Lyn</b>					
	NK095	Pan-specific	-18	-6	-8
	PK043	Y508	181	24	31
Pyk2					<a href="#">Q14289</a>
<b>Protein-tyrosine kinase 2-beta</b>					
	NK154	Pan-specific	2	-24	-26
	PK097-2	Y579	14	-14	12
	PK097-3	Y579	-68	-69	-55
RIP2					<a href="#">Q43353</a>
<b>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2</b>					

	NK157	Pan-specific	316	92	97	
RONa						<a href="#">Q04912</a>
	<b>Macrophage-stimulating protein receptor</b>					
	NK161	Pan-specific	90	53	92	
TBK1						<a href="#">Q9UHD2</a>
	<b>Serine/threonine-protein kinase TBK1</b>					
	NK220-1	Pan-specific	1	125	119	
	NK220-2	Pan-specific	72	88	120	
ZAP70						<a href="#">P43403</a>
	<b>Tyrosine-protein kinase ZAP-70</b>					
	NK187	Pan-specific	6	81	53	
	NK187-2	Pan-specific	40	46	28	
ZAP70/Syk						<a href="#">P43403</a>
	<b>Tyrosine-protein kinase ZAP-70</b>					
	PK109	Y319/Y352	41	168	55	
<i>Proteins implicated in stress response</i>						
Hsp27						<a href="#">P04792</a>
	<b>Heat shock protein beta-1</b>					
	NN152-1	Pan-specific	-21	-25	-29	
	PN040-1	S15	15	136	114	
	PN040-2	S15	156	44	30	
	PN041	S78	-9	-15	-20	
	PN042-1	S82	19	-7	-4	
	PN042-2	S82	4	-7	-35	
	PN042-3	S82	-7	-1	-19	
Hsp40						<a href="#">P25685</a>
	<b>DnaJ homolog subfamily B member 1</b>					
	NN057	Pan-specific	97	175	171	
	NN057-2	Pan-specific	27	37	38	
	NN057-3	Pan-specific	-96	-95	-96	
Hsp70						<a href="#">P08107</a>
	<b>Heat shock 70 kDa protein 1A/1B</b>					
	NN060	Pan-specific	30	69	76	
	NN060-2	Pan-specific	48	53	86	
	NN060-3	Pan-specific	-27	-28	-39	
JIK						<a href="#">Q9UHG7</a>
	<b>Serine/threonine-protein kinase TAO3</b>					
	NK087	Pan-specific	100	19	-9	

KHS					<a href="#">Q9Y4K4</a>
	<b>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5</b>				
	NK089	Pan-specific	-13	95	110
MAPKAPK2a/b					<a href="#">P49137</a>
	<b>MAP kinase-activated protein kinase 2</b>				
	PN049-PN112-1	T334	-12	11	9
	PN049-PN112-2	T334	141	-29	-44
MEK3 (also named MAP2K3)					<a href="#">P46734</a>
	<b>Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 3</b>				
	NK101	Pan-specific	24	77	25
	NK101-3	Pan-specific	-1	33	3
	PK127	S218	-4	4	11
MEK4 (also named MAP2K4)					<a href="#">P45985</a>
	<b>Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 4</b>				
	NK103	Pan-specific	-30	-35	-30
	NK103-2	Pan-specific	-14	21	39
	NK103-3	Pan-specific	16	109	46
	PK052	S257/T261	-2	-13	-22
p38a MAPK					<a href="#">Q16539</a>
	<b>Mitogen-activated protein kinase 14</b>				
	PK060-1	T180/Y182	49	51	129
	PK060-2	T180/Y182	31	41	161
	PK060-3	T180/Y182	-14	43	36
	PK060-4	T180/Y182	3	-30	18
	PK060-5	T180/Y182	11	32	101
	NK120-1	Pan-specific	34	35	92
	NK120-10	Pan-specific	0	-3	6
	NK120-2	Pan-specific	-15	5	-12
	NK120-3	Pan-specific	-12	-26	13
	NK120-4	Pan-specific	32	16	49
	NK120-5	Pan-specific	-16	-5	-39
	NK120-7	Pan-specific	41	79	129
RSK1/2					<a href="#">Q15418</a>
	<b>Ribosomal protein S6 kinase alpha-1</b>				
	PK099	S221/S227	71	53	83
	PK100	S363/S369	69	30	58
	PK100-2	S363/S369	16	-33	5
	PK101-1	S380/S386	13	29	99
	PK101-2	S380/S386	56	-23	4



RSK2					<a href="#">P51812</a>
	<b>Ribosomal protein S6 kinase alpha-3</b>				
	NK165	Pan-specific	28	38	129
TAK1					<a href="#">O43318</a>
	<b>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7</b>				
	NK175-1	Pan-specific	26	8	10
	NK175-2	Pan-specific	36	-64	-64
	NK175-3	Pan-specific	71	95	82
	NK175-4	Pan-specific	55	113	81
	NK175-5	Pan-specific	-4	-34	-3
<i>Proteins implicated in cell spreading, cell migration, cell survival, cell growth, cell cycle and cell proliferation</i>					
AIK1					<a href="#">O14965</a>
	<b>Aurora kinase A</b>				
	NK008-1	Pan-specific	-15	-6	0
	NK008-2	Pan-specific	-78	-83	-42
AIK3					<a href="#">Q9UQB9</a>
	<b>Aurora kinase C</b>				
	NK009	Pan-specific	57	5	96
BUB1A					<a href="#">O43683</a>
	<b>Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1</b>				
	NK015	Pan-specific	91	55	206
CDC25B					<a href="#">P30305</a>
	<b>M-phase inducer phosphatase 2</b>				
	NP002	Pan-specific	98	-19	-19
CDC25C					<a href="#">P30307</a>
	<b>M-phase inducer phosphatase 3</b>				
	NP003	Pan-specific	47	6	23
	PP005	S216	509	63	166
CDK1					<a href="#">P06493</a>
	<b>Cyclin-dependent kinase 1</b>				
	NK025-1	Pan-specific	39	-8	11
	NK025-2	Pan-specific	38	49	48
	NK025-3	Pan-specific	20	2	-31
	NK025-4	Pan-specific	43	6	46
	NK025-5	Pan-specific	-5	75	27
	NK025-6	Pan-specific	27	33	88
CDK1/2					<a href="#">P06493</a>
	<b>Cyclin-dependent kinase 1/2</b>				<a href="#">P24941</a>

	PK006	T14+Y15	41	-30	-16	
	PK007-1	Y15	54	-4	18	
	PK007-2	Y15	44	64	22	
	PK007-3	Y15	42	12	0	
	PK008	T161	197	14	426	
CDK2						<a href="#">P24941</a>
	<b>Cyclin-dependent kinase 2</b>					
	NK026-2	Pan-specific	-17	24	57	
	NK026-3	Pan-specific	-40	61	297	
	NK026-4	Pan-specific	3	147	371	
	NK026-5	Pan-specific	-30	-15	-48	
	NK026-6	Pan-specific	-25	20	38	
	NK026-7	Pan-specific	-33	15	-3	
CDK6						<a href="#">Q00534</a>
	<b>Cyclin-dependent kinase 6</b>					
	NK029	Pan-specific	-14	34	188	
	NK029-2	Pan-specific	41	37	66	
	NK029-3	Pan-specific	-3	45	22	
CDK7						<a href="#">P50613</a>
	<b>Cyclin-dependent kinase 7</b>					
	NK030-2	Pan-specific	-15	23	42	
	NK030-3	Pan-specific	-2	68	121	
Chk2						<a href="#">Q96017</a>
	<b>Serine/threonine-protein kinase Chk2</b>					
	NK035	Pan-specific	-31	-68	-75	
	PK119	T68	16	5	102	
Cyclin D1						<a href="#">P24385</a>
	<b>G1/S-specific cyclin-D1</b>					
	NN030-1	Pan-specific	-7	8	13	
	NN030-2	Pan-specific	16	8	192	
Nek2						<a href="#">P51955</a>
	<b>Serine/threonine-protein kinase Nek2</b>					
	NK117-1	Pan-specific	14	78	44	
	NK117-2	Pan-specific	-6	-14	-9	
	NK117-3	Pan-specific	7	-18	-6	
	NK117-4	Pan-specific	16	27	53	
	NK117-5	Pan-specific	-7	38	25	
RB						<a href="#">P06400</a>
	<b>Retinoblastoma-associated protein</b>					

	NN093	Pan-specific	-17	26	-32	
	PN065	T356	11	17	20	
	PN066	S612	-14	-50	-27	
	PN067	S780	-20	-47	-40	
	PN068	S807	-17	-13	-18	
	PN069	S807/S811	-21	-36	792	
	PN070	T821	27	9	24	
	PN071	T826	-49	-56	-43	
	PN113	S608	-45	98	125	
	PN131	S795	-47	-55	28	
<hr/>						
S6Kb1						<a href="#">P23443</a>
	<b>Ribosomal protein S6 kinase beta-1</b>					
	NK223	Pan-specific	0	-6	18	
	NK223-1	Pan-specific	-4	-13	-1	
	NK223-2	Pan-specific	42	17	76	
	PK145	T252	47	1	48	
	PK146	T444/S447	42	105	146	
	PK147	T412	-27	115	-11	
<hr/>						
S6Kb2						<a href="#">Q9UBS0</a>
	<b>Ribosomal protein S6 kinase beta-2</b>					
	NK222	Pan-specific	45	43	126	
<hr/>						
TTK						<a href="#">P33981</a>
	<b>Dual specificity protein kinase TTK</b>					
	NK180	Pan-specific	59	138	109	
<hr/>						
<i>Apoptosis signaling pathway</i>						
Bad						<a href="#">Q92934</a>
	<b>Bcl2 antagonist of cell death</b>					
	PN010	S75	16	5	-49	
	PN012-1	S99	129	8	201	
<hr/>						
Bcl2						<a href="#">P10415</a>
	<b>Apoptosis regulator Bcl-2</b>					
	NN006	Pan-specific	-29	-15	65	
	NN006-1	Pan-specific	71	22	217	
<hr/>						
CASP1						<a href="#">P29466</a>
	<b>Caspase-1</b>					
	NN011	Pan-specific	-11	-2	-27	
	NN011-2	Pan-specific	84	-1	-21	
<hr/>						
CASP3						<a href="#">P42574</a>

	<b>Caspase-3</b>					
	NN013	Pan-specific	149	-3	113	
	NN013-3	Pan-specific	632	6	248	
CASP5						<a href="#">P51878</a>
	<b>Caspase-5</b>					
	NN015	Pan-specific	79	26	32	
CASP6						<a href="#">P55212</a>
	<b>Caspase-6</b>					
	NN016	Pan-specific	58	135	115	
CASP7						<a href="#">P55210</a>
	<b>Caspase-7</b>					
	NN017	Pan-specific	121	41	115	
	NN017-2	Pan-specific	132	81	139	
CASP9						<a href="#">P55211</a>
	<b>Caspase-9</b>					
	NN019-2	Pan-specific	457	-12	37	
CDK5						<a href="#">Q00535</a>
	<b>Cyclin-dependent kinase 5</b>					
	NK028-1	Pan-specific	34	14	91	
	NK028-2	Pan-specific	0	8	117	
	NK028-4	Pan-specific	-13	20	27	
	NK028-5	Pan-specific	-19	65	55	
c-IAP1						<a href="#">Q13490</a>
	<b>Inhibitor of apoptosis protein 2</b>					
	NN025	Pan-specific	12	19	76	
DFF45/35						<a href="#">O00273</a>
	<b>DNA fragmentation factor subunit alpha</b>					
	NN035-NN126	Pan-specific	37	70	316	
DRAK2						<a href="#">O94768</a>
	<b>Serine/threonine-protein kinase 17B</b>					
	NK050	Pan-specific	2	27	50	
FAS						<a href="#">P25445</a>
	<b>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6</b>					
	NN042	Pan-specific	37	47	125	
p53						<a href="#">P04637</a>
	<b>Cellular tumor antigen p53</b>					
	NN082	Pan-specific	-7	-13	0	
	PN057-1	S392	69	124	258	
	PN057-2	S392	27	4	14	

	PN057-3	S392	-70	-74	-74	
SLK						<a href="#">Q9H2G2</a>
	<b>STE20-like serine/threonine-protein kinase</b>					
	NK171	Pan-specific	73	49	102	
Smac/DIABLO						<a href="#">Q9NR28</a>
	<b>Diablo homolog, mitochondrial</b>					
	NN095	Pan-specific	89	79	150	
ZIPK						<a href="#">Q43293</a>
	<b>Death-associated protein kinase 3</b>					
	NK188-1	Pan-specific	-21	94	128	
	NK188-2	Pan-specific	5	32	-1	
<i>Cytoskeleton-associated protein</i>						
CALD1						<a href="#">Q05682</a>
	<b>Caldesmon</b>					
	PN015	S789	72	143	82	
CDC42						<a href="#">P60953</a>
	<b>Cell division control protein 42 homolog</b>					
	NN024	Pan-specific	144	27	-20	
CFL1						<a href="#">P23528</a>
	<b>Cofilin-1</b>					
	NN026	Pan-specific	8	80	-16	
	PN019	S3	-14	-26	-39	
MARCKS						<a href="#">P29966</a>
	<b>Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate</b>					
	PN050-1	S159/S163	225	46	30	
PXN1						<a href="#">P49023</a>
	<b>Paxillin 1</b>					
	NN086	Pan-specific	50	84	212	
	PN059	Y31	81	32	66	
	PN060-1	Y118	53	16	14	
	PN060-3	Y118	-33	-26	1	
ROCK1						<a href="#">Q13464</a>
	<b>Rho-associated protein kinase 1</b>					
	NK160	Pan-specific	42	69	97	
ROCK2						<a href="#">O75116</a>
	<b>Rho-associated protein kinase 2</b>					
	NK159-1	Pan-specific	7	-10	11	

	NK159-2	Pan-specific	77	48	151	
STK33						<a href="#">Q8NEF5</a>
	<b>Serine/threonine-protein kinase 33</b>					
	NK173	Pan-specific	9	108	54	
Tau						<a href="#">P10636</a>
	<b>Microtubule-associated protein tau</b>					
	PN085	S516	19	-11	-19	
	PN086	S516/S519	-1	8488	8056	
	PN090	S713	60	30	25	
	PN090-2	S713	-12	-51	-51	
	PN091	S717	-50	-69	-75	
	PN092	S721	37	-1	-11	
	PN106	S519	21	970	37	
	PN107	S739	20	-16	-22	
	PN121	T522	-14	-10	-8	
	PN122	T548	8	89	39	
<i>Proteins implicated in cell biosynthesis and metabolism</i>						
	<b>AMPKb1</b>					
	<b>5'-AMP-activated protein kinase subunit beta-1</b>					
	NK005	Pan-specific	6	2	184	<a href="#">Q9Y478</a>
GSK3a/b						<a href="#">P49840</a> <a href="#">P49841</a>
	<b>Glycogen synthase kinase-3 alpha/beta</b>					
	NK069-NK070	Pan-specific	-38	-25	-35	
	NK069-NK070-2	Pan-specific	24	110	111	
	PK026-PK027-1	S9	7	46	61	
	PK028-PK029-1	Y279	-29	-30	-50	
GSK3b						<a href="#">P49841</a>
	<b>Glycogen synthase kinase-3 beta</b>					
	NK070	Pan-specific	-4	28	-9	
	NK070-1	Pan-specific	-79	-74	-78	
IR						<a href="#">P06213</a>
	<b>Insulin receptor</b>					
	NK079	Pan-specific	-39	39	-20	
	PK032-1	Y999	196	-10	-34	
	PK033	Y1189/Y1190	-3	-18	-31	
PP1/Ca						<a href="#">P62136</a>
	<b>Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit</b>					
	NP009	Pan-specific	-63	-50	-49	

	NP009-2	Pan-specific	-80	-70	-67	
	PP001	T320	-61	-75	-69	
PRKAB1						<a href="#">Q9Y478</a>
	<b>5'-AMP-activated protein kinase subunit beta-1</b>					
	NK150	Pan-specific	26	51	104	
PyDK2						<a href="#">Q15119</a>
	<b>[Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase isozyme 2, mitochondrial</b>					
	NK153	Pan-specific	-24	151	16	
SOD (Mn)						<a href="#">P04179</a>
	<b>Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial</b>					
	NN068	Pan-specific	6	-15	119	
	NN068-1	Pan-specific	18	-60	-38	
TPIPb						<a href="#">Q6XPS3</a>
	<b>Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase TPTE2</b>					
	NP034	Pan-specific	42	151	131	
<i>Proteins implicated in other biological process or unclassifiable proteins</i>						
14-3-3 z						<a href="#">P63104</a>
	<b>14-3-3 protein zeta/delta</b>					
	NN001	Pan-specific	-95	-78	-53	
Acetylated Lysine						n/a
	NN135-1	Pan-specific	207	6	120	
	NN135-1	Pan-specific	235	69	187	
NPM						<a href="#">P06748</a>
	<b>Nucleophosmin</b>					
	PN008	T199	-19	-35	8	
	PN008-2	T199	-91	-86	-57	
	PN009	T234/T237	-39	-54	4	
Exp2						<a href="#">P55060</a>
	<b>Exportin-2</b>					
	NN010	Pan-specific	270	47	172	
CASK/Lin2						<a href="#">O14936</a>
	<b>Peripheral plasma membrane protein CASK</b>					
	NK023	Pan-specific	97	175	259	
CK2a						<a href="#">P68400</a>
	<b>Casein kinase II subunit alpha</b>					
	NK041	Pan-specific	20	27	207	
Cx43						<a href="#">P17302</a>
	<b>Connexin-43</b>					

	PN148	S368	19	46	105	
DNAPK						<a href="#">P78527</a>
	<b>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</b>					
	NK048	Pan-specific	22	77	132	
	NK048-2	Pan-specific	-8	62	401	
EphA1						<a href="#">P21709</a>
	<b>Ephrin type-A receptor 1</b>					
	NK053	Pan-specific	53	85	162	
Histone H2AX						<a href="#">P16104</a>
	<b>Histone H2AX</b>					
	PN036	S140	16	74	85	
Histone H3						<a href="#">P84243</a>
	<b>Histone H3.3</b>					
	PN038	S11	42	47	81	
	PN039	S29	-1	12	15	
	PN100	T12	55	193	193	
	PN101	T4	-6	-31	-26	
	PN101-2	T4	9	37	28	
HspBP1						<a href="#">O95351</a>
	<b>Hsp70-binding protein 1</b>					
	NN063	Pan-specific	25	164	99	
ITA4						<a href="#">P13612</a>
	<b>Integrin A4</b>					
	PN043	S1027	-35	190	71	
LAR						<a href="#">P10586</a>
	<b>Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F</b>					
	NP005	Pan-specific	174	159	156	
NT5E						<a href="#">P21589</a>
	<b>5'-nucleotidase</b>					
	NN075	Pan-specific	54	64	85	
PCNA						<a href="#">P12004</a>
	<b>Proliferating cell nuclear antigen</b>					
	NN087	Pan-specific	25	29	82	
SG2NA						<a href="#">Q13033</a>
	<b>Striatin-3</b>					
	NN133	Pan-specific	71	59	95	
Ep-cam						<a href="#">P16422</a>
	<b>Epithelial cell adhesion molecule</b>					
	NN173	Pan-specific	39	71	107	



## **DISCUSSION GÉNÉRALE**

L'objectif de mon projet était d'étudier l'effet du surnageant de culture d'*A. pleuropneumoniae*, et plus particulièrement de son ultrafiltrat, afin de mieux comprendre son activité antivirale contre le VSRRP. Afin de mener à bien mon projet, une expérience de micropuce à anticorps a été effectuée. Cette expérience nous a fourni de nombreuses données d'importances quant aux différentes voies de signalisation modulées par le surnageant de culture d'*A. pleuropneumoniae*, le VSRRP ou ces deux pathogènes (dans le cas de la coinfection). Cette expérience nous aura permis d'orienter mon projet sur l'analyse du cycle cellulaire qui semblait perturbé en présence du surnageant de culture d'*A. pleuropneumoniae*.

### **État des lieux des différentes voies de signalisation cellulaire modulées : NF-κB**

L'analyse du protéome des cellules SJPL infectées avec le VSRRP et/ou traitées avec le surnageant de culture d'*A. pleuropneumoniae* nous a fourni de très nombreux résultats. J'ai observé que les cellules infectées avec le VSRRP présentaient une régulation à la hausse de la voie de signalisation MAPK/ERK. Cette dernière étant modulée via les protéines ERK1/2, RAF-A et CREB. Ces résultats sont en accord avec les observations de Lee et Lee (2010) ainsi que de Han et collaborateurs (2013) qui ont respectivement démontré une activation de ERK1/2 et une dégradation de CBP qui permet alors au VSRRP de réguler la production d'interférons. Cette activation de la voie de signalisation n'est pas retrouvée lorsque les cellules sont infectées par le VSRRP et traitées avec le surnageant de culture. Lors d'un traitement avec le surnageant de culture seul, la voie de signalisation MAPK/ERK semble même être inhibée. Cette diminution des voies de signalisation cellulaire MAPK/ERK et NF-κB peuvent être une part de l'explication de l'activité antivirale observée contre le VSRRP. Le VSRRP ayant besoin de diminuer ces voies afin de prendre le contrôle de la cellule et d'inhiber la production d'interférons qui l'inhiberait.

Une autre voie de signalisation cellulaire menant à l'activation de NF-κB est la voie de signalisation NOD. C'est la présence de fragments de peptidoglycane qui est responsable de l'activation de cette voie de signalisation (Chamaillard et al., 2003; Girardin et al., 2003). Une fois activées, les protéines NOD1 ou NOD2 forment un complexe avec RIP2. Ce complexe

activera la protéine I $\kappa$ B $\alpha$ , menant à l'activation de NF- $\kappa$ B (Fritz et al., 2006). L'analyse du protéome des cellules SJPL traitées avec le surnageant de culture et infectées ou non avec le VSRRP a démontré une activation de RIP2. Cette activation de RIP2 devrait mener à une activation de NF- $\kappa$ B, ce qui n'est pas le cas, ceci est surprenant. Cependant, NF- $\kappa$ B reste une protéine centrale et son activation ou inhibition peut résulter d'un ratio des activations et inhibitions provenant des différentes voies de signalisation. Ainsi, une éventuelle activation de NF- $\kappa$ B via RIP2 peut être masquée par une éventuelle inhibition de NF- $\kappa$ B via une autre protéine. Enfin, Lévesque et collaborateurs ont démontré que l'effet antiviral contre le VSRRP n'était pas provoqué par des fragments de peptidoglycane (Lévesque et al., 2014). Mes résultats ne peuvent que confirmer leur observation ; la voie NOD peut être modulée mais ne semble pas être impliquée dans l'activité antivirale contre le VSRRP.

Tous ces résultats semblent indiquer qu'il n'y a pas d'activation du NF- $\kappa$ B par le surnageant de culture, malgré l'activation de certains de ces activateurs. Ceci peut être expliqué par le fait qu'il est aussi possible que d'autres voies de signalisation cellulaire influencent son activation. Un autre point pouvant expliquer nos résultats est le fait qu'Auger et collaborateurs ont démontré la capacité d'*A. pleuropneumoniae* à induire uniquement l'une des deux sous unités de NF- $\kappa$ B, p50. Aucune induction de la seconde unité, p65, n'avait alors été observée (Auger et al., 2009). Ces auteurs ont également mis en évidence que les cellules SJPL ne seraient pas capables d'exprimer la sous unité p65 et qu'en son absence, des complexes p50/p50 inactifs seraient formés (Auger et al., 2009) ; ceci pourrait expliquer une fois de plus l'absence d'activation du NF- $\kappa$ B malgré l'activation de ses activateurs.

### **L'apoptose cellulaire**

L'apoptose est un important processus cellulaire pouvant être régulé par des caspases et menant à la mort de la cellule (Taylor et al., 2008). Durant les analyses de protéomes, de faibles activations de CASP3 et CASP9 ont été relevées. Les toxines Apx sécrétées par *A. pleuropneumoniae* sont connues pour provoquer l'apoptose cellulaire en activant CASP3 et la voie de signalisation JNK/MAPK (Chien et al., 2009; Wu et al., 2011). Aucune activation de la voie de signalisation JNK/MAPK n'a été mise en évidence. Ajoutant à cela le fait qu'un mutant produisant des toxines ApxI et ApxII inactives a été utilisé et qu'aucun pic

correspondant à de l'apoptose n'a été retrouvé lors de l'analyse du cycle cellulaire, il est possible de penser que le surnageant de culture ne cause pas d'apoptose. L'induction de l'apoptose par *A. pleuropneumoniae* avait été étudié par Auger et collaborateurs qui n'avaient alors pas observé d'activation de CASP3 ni d'apoptose (Auger et al., 2009). Nos résultats semblent confirmer cela.

### **Le cycle cellulaire**

Le cycle cellulaire est un mécanisme cellulaire jouant un rôle primordial dans la prolifération des cellules. Ce mécanisme fait intervenir plusieurs points de contrôle qui peuvent être régulés et causer, au besoin, un arrêt du cycle cellulaire. Le point de contrôle du passage de la phase G2 à la phase M est activé en cas de dommage de l'ADN, ceci permettant à la cellule de se réparer (Stark et Taylor, 2006).

Nous avons démontré que le surnageant de culture d'*A. pleuropneumoniae* causait un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M chez les cellules SJPL et que celui-ci était également responsable d'une diminution de la prolifération cellulaire ; cycle cellulaire et prolifération cellulaire étant liés. L'analyse du protéome nous a permis d'observer que différentes protéines impliquées dans la régulation de la transition de la phase G2 à la phase M étaient modulées. J'ai alors été capable de les inhiber au moyen d'inhibiteurs chimiques : DIM et SBE-13, inhibant CDC25c, CDK1/2 et PLK. L'utilisation de la DIM et du SBE-13 a permis d'imiter l'effet du surnageant de culture sur le cycle cellulaire et la prolifération des cellules SJPL. Ceci nous permet d'avancer l'hypothèse que l'arrêt du cycle cellulaire observé chez les cellules SJPL lors d'un traitement avec le surnageant de culture serait probablement causé par une inhibition de CDC25c ou de CDK1/2 par le surnageant de culture. Afin de pouvoir confirmer cela, il faudrait étudier d'avantage le système de régulation et caractériser les modulations grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques en Western-blot. Des ARN interférents pourraient aussi être utilisés afin de cibler spécifiquement CDC25c et CDK1/2, ce qui confirmerait l'inhibition de ses protéines.

Avant mes résultats, aucune information concernant un potentiel arrêt du cycle cellulaire par *A. pleuropneumoniae* n'avait été publiée. Cependant, il a été démontré qu'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (anciennement nommé *Actinobacillus actinomycetemcomitans*) causait un arrêt du cycle cellulaire des cellules HeLa en phase G2/M via sa toxine CDT (*cytolethal distending toxin*) (Ohguchi et al., 1998; Sugai et al., 1998). Cette toxine CDT présente certains domaines très conservés et est retrouvée chez différentes bactéries à Gram négatif, incluant *A. actinomycetemcomitans* (Ohguchi et al., 1998; Sugai et al., 1998), et *Escherichia coli* (Pérès et al., 1997). Elle est connue pour induire un arrêt du cycle cellulaire en G2/M chez différentes lignées cellulaires. Lors de l'analyse du cycle cellulaire des cellules SJPL, le surnageant de culture contenait probablement les toxines ApxI et ApxII inactives. On peut alors se demander s'il n'existe pas un lien entre ces toxines et la toxine CDT. Les toxines Apx sont d'un poids moléculaire supérieur à 3 kDa et ne sont donc pas responsables de l'activité antivirale ; mais il est possible de penser qu'un domaine peptidique commun aux CDT et aux toxines Apx soit présent dans le surnageant de culture et ainsi responsable du blocage du cycle cellulaire. Une autre hypothèse peut être la présence dans le génome bactérien d'une séquence codant pour une partie de la toxine CDT et qui n'aurait pas été identifiée chez *A. pleuropneumoniae*. Les CDT induisent le blocage du cycle cellulaire en phase G2/M via l'activation de la voie de signalisation de la protéine ATM, cette voie est activée en cas de lésions de l'ADN (Jinadasa et al., 2011). Il peut être intéressant d'étudier cette voie de signalisation en réalisant par exemple des Western-blot afin de détecter les protéines ATM, Chk1/2 ou encore CDC25c. Également, il peut être intéressant d'étudier les rafts lipidiques présents au niveau des cellules SJPL car les toxines CDT sont internalisées à leur niveau. L'isolement et l'étude des rafts lipidiques pourrait peut-être permettre d'identifier un potentiel domaine protéique associé aux rafts lipidiques et présent uniquement dans le surnageant de culture.

Lévesque et collaborateurs (2014) ont démontré que l'activité antivirale du surnageant de culture d'*A. pleuropneumoniae* n'était pas observée avec la lignée cellulaire MARC-145. J'ai donc également étudié les cellules MARC-145. Mes résultats démontrent qu'au contraire des cellules SJPL, le surnageant de culture n'induit pas d'arrêt du cycle cellulaire chez les cellules MARC-145. Ceci se reflète également sur la prolifération cellulaire, l'ultrafiltrat

$\leq 3$  kDa du surnageant de culture ne perturbe pas la prolifération cellulaire (voir Annexe 1). Aussi, l'utilisation de la DIM et du SBE-13 chez les cellules MARC-145 n'entraîne pas d'arrêt du cycle cellulaire en G2/M comme chez les cellules SJPL, mais plutôt un arrêt en phase G1 ; forte diminution du nombre de cellule en phase S au profit d'une augmentation du nombre de cellules en phase G1 (voir Annexe 2).

Tous ces résultats, incluant les analyses du cycle cellulaire, permettent d'avancer l'hypothèse que le surnageant de culture est capable de provoquer un arrêt du cycle cellulaire des cellules SJPL en phase G2/M et que cet arrêt provoquerait l'effet antiviral contre le VSRRP. Pour étayer cette hypothèse, ajoutons à cela le fait que la DIM et le SBE-13 possèdent tous deux un effet antiviral contre le VSRRP chez les cellules SJPL. Ajoutons également que concernant le VSRRP, Sun et collaborateurs ont très récemment démontré la capacité de la nsp11 à causer un arrêt du cycle cellulaire en phase S (Sun et al., 2014). Un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M et non en phase S pourrait alors induire un blocage de la réplication du VSRRP, d'où l'observation de l'effet antiviral.

### **Analyses chimiques du surnageant de culture**

Le second objectif de mon projet était d'identifier la ou les molécule(s) impliquée(s) dans l'effet antiviral contre le VSRRP. Afin d'identifier les potentielles molécules, j'ai utilisé des techniques de fractionnement de milieu comme l'ultrafiltration sur membrane (3 kDa) ainsi que la séparation des fractions organiques et inorganiques de l'ultrafiltrat. À la suite de ces fractionnements, l'identification des éventuelles molécules a été effectuée grâce à l'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Nous avons alors pu observer et identifier deux pics présents dans l'ultrafiltrat du surnageant de culture, mais absents de l'ultrafiltrat du DMEM ; ces deux pics avaient des ratios m/z de 515 et de 663.

Afin de mener plus loin l'identification et la caractérisation des pics trouvés grâce à la spectrométrie de masse, j'ai réalisé une étape supplémentaire de purification par TLC. Après avoir observé une bande supplémentaire dans le surnageant de culture, j'ai procédé à l'extraction des molécules la composant en utilisant de l'acétonitrile. Le choix de l'acétonitrile comme solvant pour reprendre les bandes provenant de la TLC est dans un premier temps légitime car c'est ce solvant qui est utilisé lors de la séparation des fractions organique et

inorganique. Utilisant la spectrométrie de masse, il a alors été mis en évidence la présence de nos deux pics d'intérêt ( $m/z$  515 et 663) parmi les molécules composant la bande d'intérêt obtenue par TLC. Malheureusement, les patrons de fragmentation des pics d'intérêt n'ont pas donné suffisamment d'informations nous permettant d'identifier ces molécules à l'aide de base de données (e.g. METLIN).

### **Limites de l'étude et perspectives futures**

Lors de mon projet, j'ai utilisé un système de micropuce à anticorps afin de caractériser l'effet antiviral d'*A. pleuropneumoniae* contre le VSRRP dans la lignée cellulaire SJPL. Cette technique m'a fourni de très nombreux résultats qui étaient souvent incohérents et difficiles à comprendre. Cette technique a probablement posée plus de questions qu'elle n'a apportée de réponses. Cependant, elle nous aura permis de cibler sur quelques mécanismes cellulaires tels que le cycle cellulaire.

Sachant que les cellules cibles primaires du VSRRP sont les macrophages alvéolaires porcins et que ces cellules n'ont pas de cycle cellulaire actif, il n'est pas évident de comprendre l'importance du cycle cellulaire dans le mécanisme d'effet antiviral contre le VSRRP. Il est probable que l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M que j'ai observé dans les cellules SJPL ne soit qu'un effet indirect induit par un mécanisme bien plus en amont. Il se pourrait par exemple que le surnageant de culture d'*A. pleuropneumoniae* induise une réponse immunitaire innée chez les cellules SJPL et les macrophages alvéolaires et que cette réponse mène à un arrêt de cycle chez les cellules SJPL. Il se pourrait également que la ou les molécules responsables de l'effet antiviral contre le VSRRP inhibent une protéine ou une voie de signalisation cellulaire importante pour la réplication du VSRRP. De nombreux virus (p.ex. le VIH) nécessitent un arrêt du cycle cellulaire afin de se répliquer le plus efficacement possible. Si l'effet antiviral contre le VSRRP est induit par un blocage du cycle cellulaire alors possiblement que le VSRRP nécessiterait également un arrêt du cycle cellulaire afin de proliférer efficacement (dans des modèles en culture cellulaire). Il serait important de vérifier si le VSRRP est capable d'induire un arrêt de cycle cellulaire ; car si cela s'avère vrai, alors il sera possible d'explorer d'avantage autour de ce phénomène et de découvrir de potentiel facteur de restriction cellulaire contre le VSRRP.

Au niveau mécanistique, j'ignore si l'effet antiviral observé dans les macrophages alvéolaires est comparable à celui observé dans les cellules SJPL. L'une des raisons est le manque de caractérisation des macrophages en question. Le surnageant de culture d'*A. pleuropneumoniae* peut-il induire l'activation des macrophages ou de certains sous-types de macrophages (p.ex. M1, M2) et alors les rendre non-permissifs au VSRRP ? Les cellules SJPL ne pouvant probablement pas être activées, je pense qu'il serait important de vérifier l'état d'activation des macrophages car il a été démontré que des macrophages alvéolaires porcins activés devenaient non permissifs au VSRRP (Duan et al., 1997a). Il pourrait donc être intéressant de stimuler en parallèle des macrophages alvéolaires porcins avec le surnageant de culture d'*A. pleuropneumoniae* et différents activateurs des macrophages (p.ex. IFN $\gamma$ , IL-4, IL-13, IL-10) puis d'analyser par cytométrie en flux différentes protéines membranaires ; p.ex. CD80, CD86, CMHII, CD163 (Gordon et Taylor, 2005; Martinez et al., 2013; Mosser, 2003). Si le surnageant de culture d'*A. pleuropneumoniae* est capable d'activer les macrophages alvéolaires porcins alors ceci pourrait expliquer la différence entre ce modèle et le modèle SJPL.

À l'heure actuelle, l'utilisation de la spectrométrie de masse a permis de mettre en évidence la présence de deux pics additionnels présent dans le surnageant de culture (m/z 515 et 663). Elle ne nous aura cependant pas permis d'aller plus loin dans l'analyse des pics car le degré de pureté des échantillons était limité et qu'il m'était techniquement impossible de les purifier d'avantage. Afin d'obtenir plus d'informations quant à l'identité des molécules et afin de parvenir à les caractériser, nous pourrions les analyser par résonance magnétique nucléaire (RMN). L'obtention des spectres RMN protons et carbone 13 permettrait d'obtenir de précieuses informations quant à la structure des molécules (Gardner et Kay, 1998). Malheureusement les préparations des échantillons nécessitent un degré de pureté élevée (85%) et une quantité relativement importante de produit (entre 250 et 500  $\mu$ g).



## **CONCLUSIONS**

Au début de mon projet, de nombreuses questions se posaient concernant l'effet antiviral d'*A. pleuropneumoniae* contre le VSRRP : par quel mécanisme *A. pleuropneumoniae* inhibe-t-il le VSRRP ? Les voies de signalisations cellulaires sont-elles touchées par *A. pleuropneumoniae* et si oui, quelles sont les voies modulées ? Quelles sont les molécules présentes dans le surnageant de culture et responsables de l'effet antiviral ? Pour répondre à ces questions, deux principaux objectifs ont été fixés. Le premier était d'analyser la réponse des cellules SJPL par rapport au surnageant de culture. La seconde était de caractériser le surnageant de culture afin d'identifier la ou les molécule(s) impliquée(s) dans le mécanisme d'effet antiviral. Ce travail aura permis de répondre en grande partie à ces questions et objectifs grâce à l'analyse du protéome et à l'utilisation de la spectrométrie de masse. L'analyse du protéome a apportée beaucoup d'information sur les différentes voies de signalisation régulées par *A. pleuropneumoniae* et accessoirement par le VSRRP ; mais elle a aussi soulevé des interrogations causées par la difficulté d'analyser autant de résultats et leur relative discordance.

L'analyse du protéome nous a menée à étudier le cycle cellulaire et à établir son rôle possible dans l'effet antiviral d'*A. pleuropneumoniae* contre le VSRRP dans la lignée cellulaire SJPL. Nos résultats suggèrent que le cycle cellulaire est important pour le VSRRP et qu'un blocage en phase G2/M peut entraîner l'inhibition du VSRRP. Il peut être intéressant d'étudier d'avantage le cycle cellulaire pour les deux pathogènes afin de comprendre autant le mécanisme de blocage induit par le surnageant de culture que l'importance du cycle cellulaire pour le VSRRP. Des Western-blots pourraient alors être réalisés afin de vérifier l'état d'activation ainsi que la quantité de protéines clefs de la voie de signalisation. Il serait également possible de mettre au point et d'utiliser des techniques d'ARN interférence afin de vérifier quelle est la protéine clef dans l'effet antiviral contre le VSRRP.

Des résultats intéressants ont également été obtenus par la spectrométrie de masse et nous ont permis d'identifier deux pics qui pourraient être responsables de l'activité antivirale contre le VSRRP. Il serait important de pouvoir purifier en plus grande quantité ces deux pics d'intérêt pour éventuellement pouvoir confirmer leur implication dans l'activité antivirale. Si ceux-ci sont actifs *in vitro* alors il pourrait être très intéressant de changer de modèle pour

passer dans un modèle *in vivo* afin d'évaluer directement chez le porc la capacité des molécules à inhiber le VSRRP.

Ce projet a permis de mieux comprendre le VSRRP ainsi que le rôle du cycle cellulaire dans l'effet antiviral contre le VSRRP. Ceci pourrait également permettre le développement de nouveaux outils prophylactiques ou thérapeutiques contre le VSRRP.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- Aarestrup, F.M., Jensen, N.E., 1999. Susceptibility testing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Denmark. Evaluation of three different media of MIC-determinations and tablet diffusion tests. *Vet. Microbiol.* 64, 299-305.
- Abul-Milh, M., Paradis, S.É., Dubreuil, J.D., Jacques, M., 1999. Binding of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lipopolysaccharides to glycosphingolipids evaluated by thin-layer chromatography. *Infect. Immun.* 67, 4983-4987.
- Albina, E., 1997. Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an overview. *Vet. Microbiol.* 55, 309-316.
- Albina, E., Carrat, C., Charley, B., 1998. Interferon-alpha response to swine arterivirus (PoAV), the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Interferon Cytokine Res.* 18, 485-490.
- Albina, E., Leforban, Y., Baron, T., Plana Duran, J.P., Vannier, P., 1992. An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Ann. Rech. Vet.* 23, 167-176.
- Allan, G.M., McNeilly, F., Ellis, J., Krakowka, S., Meehan, B., McNair, I., Walker, I., Kennedy, S., 2000. Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. *Arch. Virol.* 145, 2421-2429.
- Alonso, C., Davies, P.R., Polson, D.D., Dee, S.A., Lazarus, W.F., 2013. Financial implications of installing air filtration systems to prevent PRRSV infection in large sow herds. *Prev. Vet. Med.* 111, 268-277.
- Altman, E., Brisson, J.R., Perry, M.B., 1986. Structure of the O-chain of the lipopolysaccharide of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 1. *Biochem. Cell. Biol.* 64, 1317-1325.

- Amass, S.F., Clark, L.K., van Alstine, W.G., Bowersock, T.L., Murphy, D.A., Knox, K.E., Albrechts, S.R., 1994. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida* infections in swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204, 102-107.
- An, T.Q., Tian, Z.J., Xiao, Y., Li, R., Peng, J.M., Wei, T.C., Zhang, Y., Zhou, Y.J., Tong, G.Z., 2010. Origin of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus, China. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 365-367.
- Andreoni, M., Giacometti, A., Maida, I., Meraviglia, P., Ripamonti, D., Sarmati, L., 2012. HIV-HCV co-infection: epidemiology, pathogenesis and therapeutic implications. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 16, 1473-1483.
- Andreyev, V.G., Wesley, R.D., Mengeling, W.L., Vorwald, A.C., Lager, K.M., 1997. Genetic variation and phylogenetic relationships of 22 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) field strains based on sequence analysis of open reading frame 5. *Arch. Virol.* 142, 993-1001.
- Angen, O., Ahrens, P., Jessing, S.G., 2008. Development of a multiplex PCR test for identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1, 7, and 12. *Vet. Microbiol.* 132, 312-318.
- Ansari, I.H., Kwon, B., Osorio, F.A., Pattnaik, A.K., 2006. Influence of N-linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies. *J. Virol.* 80, 3994-4004.
- Archambault, M., Harel, J., Gouré, J., Tremblay, Y.D., Jacques, M., 2012. Antimicrobial susceptibilities and resistance genes of Canadian isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microb. Drug. Resist.* 18, 198-206.
- Archambault, M., Labrie, J., Rioux, C.R., Dumas, F., Thibault, P., Elkins, C., Jacques, M., 2003. Identification and preliminary characterization of a 75-kDa hemin- and hemoglobin-binding outer membrane protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Can. J. Vet. Res.* 67, 271-277.

- Archambault, M., Olivier, M., Foiry, B., Diarra, M.S., Paradis, S.É., Jacques, M., 1997. Effects of pig hemoglobin binding on some physical and biological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lipopolysaccharides. *J. Endotoxin Res.* 4, 53-65.
- 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 Microbiol. Lett.* 173, 17-25.
- Assavacheep, P., Persson, M., Luengyosluechakul, S., Watanaphansak, S., Laohasinnarong, D., Pungkhun, P., Wallgren, P., 2003. *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Thai pig herds. Prevalence of serum antibodies and relation to performance. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 50, 390-395.
- Auger, E., Deslandes, V., Ramjeet, M., Contreras, I., Nash, J.H.E., Harel, J., Gottschalk, M., Olivier, M., Jacques, M., 2009. Host-pathogen interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with porcine lung and tracheal epithelial cells. *Infect. Immun.* 77, 1426-1441.
- Baarsch, M.J., Scamurra, R.W., Burger, K., Foss, D.L., Maheswaran, S.K., Murtaugh, M.P., 1995. Inflammatory cytokine expression in swine experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* 63, 3587-3594.
- Balogun, T.M., Emmanuel, S., Ojerinde, E.F., 2012. HIV, Hepatitis B and C viruses' coinfection among patients in a Nigerian tertiary hospital. *Pan. Afr. Med. J.* 12, 100.
- Baltes, N., Gerlach, G.F., 2004. Identification of genes transcribed by *Actinobacillus pleuropneumoniae* in necrotic porcine lung tissue by using selective capture of transcribed sequences. *Infect. Immun.* 72, 6711-6716.
- Baltes, N., Hennig-Pauka, I., Gerlach, G.F., 2002. Both transferrin binding proteins are virulence factors in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 infection. *FEMS Microbiol. Lett.* 209, 283-287.

- Bandara, A.B., Lawrence, M.L., Veit, H.P., Inzana, T.J., 2003. Association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* capsular polysaccharide with virulence in pigs. *Infect. Immun.* 71, 3320-3328.
- Bates, T.W., Thurmond, M.C., Carpenter, T.E., 2001. Direct and indirect contact rates among beef, dairy, goat, sheep, and swine herds in three California counties, with reference to control of potential foot-and-mouth disease transmission. *Am. J. Vet. Res.* 62, 1121-1129.
- Bautista, E.M., Faaberg, K.S., Mickelson, D., McGruder, E.D., 2002. Functional properties of the predicted helicase of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 298, 258-270.
- Bautista, E.M., Molitor, T.W., 1999. IFN gamma inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in macrophages. *Arch. Virol.* 144, 1191-1200.
- Bautista, E.M., Suárez, P., Molitor, T.W., 1999. T cell responses to the structural polypeptides of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch. Virol.* 144, 117-134.
- Beck, M., van den Bosch, J.F., Jongenelen, I.M., Loeffen, P.L., Nielsen, R., Nicolet, J., Frey, J., 1994. RTX toxin genotypes and phenotypes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* field strains. *J. Clin. Microbiol.* 32, 2749-2754.
- Bélanger, M., Bégin, C., Jacques, M., 1995. Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infect. Immun.* 63, 656-662.
- Bélanger, M., Dubreuil, D., Harel, J., Girard, C., Jacques, M., 1990. Role of lipopolysaccharides in adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal rings. *Infect. Immun.* 58, 3523-3530.
- Bélanger, M., Dubreuil, D., Jacques, M., 1994. Proteins found within porcine respiratory tract secretions bind lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* 62, 868-873.



- Benfield, D.A., Nelson, E., Collins, J.E., Harris, L., Goyal, S.M., Robison, D., Christianson, W.T., Morrison, R.B., Gorcyca, D., Chladek, D., 1992. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *J. Vet. Diagn. Invest.* 4, 127-133.
- Bertram, T.A., 1990. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: molecular aspects of virulence and pulmonary injury. *Can. J. Vet. Res.* 54 Suppl, S53-56.
- Beura, L.K., Sarkar, S.N., Kwon, B., Subramaniam, S., Jones, C., Pattnaik, A.K., Osorio, F.A., 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1beta modulates host innate immune response by antagonizing IRF3 activation. *J. Virol.* 84, 1574-1584.
- Biberstein, E.L., Gunnarsson, A., Hurvell, B., 1977. Cultural and biochemical criteria for the identification of *Haemophilus* spp from swine. *Am. J. Vet. Res.* 38, 7-11.
- Blackall, P.J., Bowles, R., Pahoff, J.L., Smith, B.N., 1999. Serological characterisation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs in 1993 to 1996. *Aust. Vet. J.* 77, 39-43.
- Blackall, P.J., Klaasen, H.L., van den Bosch, H., Kuhnert, P., Frey, J., 2002. Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Vet. Microbiol.* 84, 47-52.
- Blanco, M., Kadlec, K., Gutiérrez Martín, C.B., de la Fuente, A.J., Schwarz, S., Navas, J., 2007. Nucleotide sequence and transfer properties of two novel types of *Actinobacillus pleuropneumoniae* plasmids carrying the tetracycline resistance gene *tet(H)*. *J. Antimicrob. Chemother.* 60, 864-867.
- Bloemraad, M., de Kluijver, E.P., Petersen, A., Burkhardt, G.E., Wensvoort, G., 1994. Porcine reproductive and respiratory syndrome: temperature and pH stability of Lelystad virus and its survival in tissue specimens from viraemic pigs. *Vet. Microbiol.* 42, 361-371.
- Boekema, B.K., Stockhofe-Zurwieden, N., Smith, H.E., Kamp, E.M., van Putten, J.P., Verheijden, J.H., 2003. Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to primary cultures of porcine lung epithelial cells. *Vet. Microbiol.* 93, 133-144.

- Boekema, B.K., van Putten, J.P., Stockhofe-Zurwieden, N., Smith, H.E., 2004. Host cell contact-induced transcription of the type IV fimbria gene cluster of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* 72, 691-700.
- Boklund, A., Alban, L., Mortensen, S., Houe, H., 2004. Biosecurity in 116 Danish fattening swineherds: descriptive results and factor analysis. *Prev. Vet. Med.* 66, 49-62.
- Bossé, J.T., Janson, H., Sheehan, B.J., Beddek, A.J., Rycroft, A.N., Kroll, J.S., Langford, P.R., 2002. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes Infect.* 4, 225-235.
- Bøtner, A., Strandbygaard, B., Sørensen, K.J., Have, P., Madsen, K.G., Madsen, E.S., Alexandersen, S., 1997. Appearance of acute PRRS-like symptoms in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine. *Vet. Rec.* 141, 497-499.
- Bousquet, E., Morvan, H., Aitken, I., Morgan, J.H., 1997. Comparative *in vitro* activity of doxycycline and oxytetracycline against porcine respiratory pathogens. *Vet. Rec.* 141, 37-40.
- Brockmeier, S.L., 2004. Prior infection with *Bordetella bronchiseptica* increases nasal colonization by *Haemophilus parasuis* in swine. *Vet. Microbiol.* 99, 75-78.
- Brockmeier, S.L., Palmer, M.V., Bolin, S.R., 2000. Effects of intranasal inoculation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, *Bordetella bronchiseptica*, or a combination of both organisms in pigs. *Am. J. Vet. Res.* 61, 892-899.
- Brockmeier, S.L., Palmer, M.V., Bolin, S.R., Rimler, R.B., 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. *Am. J. Vet. Res.* 62, 521-525.
- Brockmeier, S.L., Register, K.B., 2007. Expression of the dermonecrotic toxin by *Bordetella bronchiseptica* is not necessary for predisposing to infection with toxigenic *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.* 125, 284-289.

- Buettner, F.F., Maas, A., Gerlach, G.F., 2008. An *Actinobacillus pleuropneumoniae arca* deletion mutant is attenuated and deficient in biofilm formation. *Vet. Microbiol.* 127, 106-115.
- Burton, P.J., Thornsberry, C., Cheung Yee, Y., Watts, J.L., Yancey, R.J., 1996. Interpretive criteria for antimicrobial susceptibility testing of ceftiofur against bacteria associated with swine respiratory disease. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8, 464-468.
- Calvert, J.G., Slade, D.E., Shields, S.L., Jolie, R., Mannan, R.M., Ankenbauer, R.G., Welch, S.K., 2007. CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *J. Virol.* 81, 7371-7379.
- Cancel-Tirado, S.M., Evans, R.B., and Yoon, K.J., 2004. Monoclonal antibody analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus epitopes associated with antibody-dependent enhancement and neutralization of virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 249-262.
- Caruso, J.P., Ross, R.F., 1990. Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infections on alveolar macrophage functions in swine. *Am. J. Vet. Res.* 51, 227-231.
- Carvalho, L.F., Segalés, J., Pijoan, C., 1997. Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on subsequent *Pasteurella multocida* challenge in pigs. *Vet. Microbiol.* 55, 241-246.
- Cavanagh, D., 1997. Nidovirales: a new order comprising *Coronaviridae* and *Arteriviridae*. *Arch. Virol.* 142, 629-633.
- Chai, Z., Ma, W., Fu, F., Lang, Y., Wang, W., Tong, G., Liu, Q., Cai, X., Li, X., 2013. A SYBR Green-based real-time RT-PCR assay for simple and rapid detection and differentiation of highly pathogenic and classical type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus circulating in China. *Arch. Virol.* 158, 407-415.

- Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu, S., Saab, L., Ogura, Y., Kawasaki, A., Fukase, K., Kusumoto, S., Valvano, M.A., Foster, S.J., Mak, T.W., Nuñez, G., Inohara, N., 2003. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat. Immunol.* 4, 702-707.
- Chang, C.F., Chang, L.C., Chang, Y.F., Chen, M., Chiang, T.S., 2002. Antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Salmonella choleraesuis* recovered from Taiwanese swine. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14, 153-157.
- Chang, H.C., Peng, Y.T., Chang, H.L., Chaung, H.C., Chung, W.B., 2008. Phenotypic and functional modulation of bone marrow-derived dendritic cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.* 129, 281-293.
- Chang, H.W., Jeng, C.R., Lin, C.M., Liu, J.J., Chang, C.C., Tsai, Y.C., Chia, M.Y., Pang, V.F., 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*. *Vet. Microbiol.* 122, 72-82.
- Chang, H.W., Jeng, C.R., Liu, J.J., Lin, T.L., Chang, C.C., Chia, M.Y., Tsai, Y.C., Pang, V.F., 2005. Reduction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in swine alveolar macrophages by porcine circovirus 2 (PCV2)-induced interferon-alpha. *Vet. Microbiol.* 108, 167-177.
- Chang, N.Y., Chen, Z.W., Chen, T.H., Liao, J.W., Lin, C.C., Chien, M.S., Lee, W.C., Lin, J.H., Hsuan, S.L., 2014. Elucidating the role of ApxI in hemolysis and cellular damage by using a novel *apxIA* mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 10. *J. Vet. Sci.* 15, 81-89.
- Chen, Y., Guo, R., He, S., Zhang, X., Xia, X., Sun, H., 2014. Additive inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection with the soluble sialoadhesin and CD163 receptors. *Virus Res.* 179, 85-92.

- Chen, Z., Lawson, S., Sun, Z., Zhou, X., Guan, X., Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., Fang, Y., 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.
- Chevallier, B., Dugourd, D., Tarasiuk, K., Harel, J., Gottschalk, M., Kobisch, M., Frey, J., 1998. Chromosome sizes and phylogenetic relationships between serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 160, 209-216.
- Chien, M.S., Chan, Y.Y., Chen, Z.W., Wu, C.M., Liao, J.W., Chen, T.H., Lee, W.C., Yeh, K.S., Hsuan, S.L., 2009. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 10 derived ApxI induces apoptosis in porcine alveolar macrophages. *Vet. Microbiol.* 135, 327-333.
- Chiers, K., de Waele, T., Pasmans, F., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., 2010. Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. *Vet. Res.* 41, 65.
- Chin, N., Frey, J., Chang, C.F., Chang, Y.F., 1996. Identification of a locus involved in the utilization of iron by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 143, 1-6.
- Cho, H.J., McNab, B., Dubuc, C., Jordan, L., Afshar, A., Magar, R., Prins, S., Eernisse, K., 1997. Comparative study of serological methods for the detection of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can. J. Vet. Res.* 61, 161-166.
- Cho, J.G., Dee, S.A., Deen, J., Trincado, C., Fano, E., Jiang, Y., Faaberg, K., Murtaugh, M.P., Guedes, A., Collins, J.E., Joo, H.S., 2006. The impact of animal age, bacterial coinfection, and isolate pathogenicity on the shedding of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in aerosols from experimentally infected pigs. *Can. J. Vet. Res.* 70, 297-301.
- Cho, W.S., Choi, C., Chae, C., 2002. In situ hybridization for the detection of the *apxIV* gene in the lungs of pigs experimentally infected with twelve *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes. *Vet. Res.* 33, 653-660.

- 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. *Res. Vet. Sci.* 72, 45-49.
- Choi, C., Kwon, D., Min, K., Chae, C., 2001. Detection and localization of *apxI*, *-II* and *-III* genes of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in natural porcine pleuropneumonia in natural porcine pleuropneumonia by in situ hybridization. *Vet. Pathol.* 38, 390-395.
- Choi, Y.K., Goyal, S.M., Joo, H.S., 2003. Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs. *Can. Vet. J.* 44, 735-737.
- Christianson, W.T., Choi, C.S., Collins, J.E., Molitor, T.W., Morrison, R.B., Joo, H.S., 1993. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses. *Can. J. Vet. Res.* 57, 262-268.
- Christianson, W.T., Collins, J.E., Benfield, D.A., Harris, L., Gorcyca, D.E., Chladek, D.W., Morrison, R.B., Joo, H.S., 1992. Experimental reproduction of swine infertility and respiratory syndrome in pregnant sows. *Am. J. Vet. Res.* 53, 485-488.
- Chung, J.W., Küster-Schöck, E., Gibbs, B.F., Jacques, M., Coulton, J.W., 2012. Immunoproteomic analyses of outer membrane antigens of *Actinobacillus pleuropneumoniae* grown under iron-restricted conditions. *Vet. Microbiol.* 159, 187-194.
- Ciprián, A., Pijoan, C., Cruz, T., Camacho, J., Tórtora, J., Colmenares, G., López-Revilla, R., de la Garza, M., 1988. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. *Can. J. Vet. Res.* 52, 434-438.
- Collins, J.E., Benfield, D.A., Christianson, W.T., Harris, L., Hennings, J.C., Shaw, D.P., Goyal, S.M., McCullough, S., Morrison, R.B., Joo, H.S., Gorcyca, D., Chladek, D., 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. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4, 117-126.

- Costers, S., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J., 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. *J. Gen. Virol.* 87, 2341-2351.
- Costerton, J.W., Geesey, G.G., Cheng, K.J., 1978. How bacteria stick. *Sci. Am.* 238, 86-95.
- da Costa, M.M., Klein, C.S., Balestrin, R., Schrank, A., Piffer, I.A., da Silva, S.C., Schrank, I.S., 2004. Evaluation of PCR based on gene *apxIVA* associated with 16S rDNA sequencing for the identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and related species. *Curr. Microbiol.* 48, 189-195.
- Daban, M., Medrano, A., Querol, E., 1996. Cloning, sequencing and expression of the transferrin-binding protein 1 gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Biochem. J.* 315, 257-264.
- Das, P.B., Dinh, P.X., Ansari, I.H., de Lima, M., Osorio, F.A., Pattnaik, A.K., 2010. The minor envelope glycoproteins GP2a and GP4 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus interact with the receptor CD163. *J. Virol.* 84, 1731-1740.
- de la Puente-Redondo, V.A., del Blanco, N.G., Gutiérrez-Martín, C.B., Méndez, J.N., Rodríguez Ferri, E.F., 2000. Detection and subtyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains by PCR-RFLP analysis of the *tbpA* and *tbpB* genes. *Res. Microbiol.* 151, 669-681.
- de Lima, M., Pattnaik, A.K., Flores, E.F., Osorio, F.A., 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.
- Dea, S., Bilodeau, R., Athanassious, R., Sauvageau, R., Martineau, G.P., 1992. Swine reproductive and respiratory syndrome in Quebec: Isolation of an enveloped virus serologically-related to Lelystad virus. *Can. Vet. J.* 33, 801-808.

- Dea, S., Gagnon, C.A., Mardassi, H., Pirzadeh, B., Rogan, D., 2000. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Arch. Virol.* 145, 659-688.
- 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*. *Vet. Res.* 40, 39.
- Dee, S.A., Molitor, T.W., 1998. Elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using a test and removal process. *Vet. Rec.* 143, 474-476.
- Dee, S.A., Philips, R.E., 1999. Use of polymerase chain reaction (PCR) to detect vertical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in piglets from gilt litters. *Swine Health. Prod.* 7, 237-239.
- Delputte, P.L., Costers, S., Nauwynck, H.J., 2005. Analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization: distinctive roles for heparan sulphate and sialoadhesin. *J. Gen. Virol.* 86, 1441-1445.
- Delputte, P.L., Meerts, P., Costers, S., Nauwynck, H.J., 2004. Effect of virus-specific antibodies on attachment, internalization and infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in primary macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 179-188.
- Delputte, P.L., Vanderheijden, N., Nauwynck, H.J., Pensaert, M.B., 2002. Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages. *J. Virol.* 76, 4312-4320.
- Denac, H., Moser, C., Tratschin, J.D., Hofmann, M.A., 1997. An indirect ELISA for the detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant nucleocapsid protein as antigen. *J. Virol. Methods* 65, 169-181.
- Deneer, H.G., Potter, A.A., 1989. Effect of iron restriction on the outer membrane proteins of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* 57, 798-804.



- Deslandes, V., Denicourt, M., Girard, C., Harel, J., Nash, J.H., Jacques, M., 2010. Transcriptional profiling of *Actinobacillus pleuropneumoniae* during the acute phase of a natural infection in pigs. *BMC Genomics* 11, 98.
- Deslandes, V., Nash, J.H., Harel, J., Coulton, J.W., Jacques, M., 2007. Transcriptional profiling of *Actinobacillus pleuropneumoniae* under iron-restricted conditions. *BMC Genomics* 8, 72.
- Díaz, 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.
- Díaz, I., Pujols, J., Ganges, L., Gimeno, M., Darwich, L., Domingo, M., Mateu, E., 2009. *In silico* prediction and *ex vivo* evaluation of potential T-cell epitopes in glycoproteins 4 and 5 and nucleocapsid protein of genotype-I (European) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* 27, 5603-5611.
- Díaz, I., Venteo, Á., Rebollo, B., Martín-Valls, G.E., Simon-Grifé, M., Sanz, A., Mateu, E., 2012. Comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 24, 344-348.
- Doan, D.N., Dokland, T., 2003. Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the structural domain of the nucleocapsid N protein from porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 59, 1504-1506.
- Dom, P., Hommeez, J., Castryck, F., Devriese, L.A., Haesebrouck, F., 1994. Serotyping and quantitative determination of *in vitro* antibiotic susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated in Belgium (July 1991-August 1992). *Vet. Q.* 16, 10-13.

- Dreyfus, A., Schaller, A., Nivollet, S., Segers, R.P., Kobisch, M., Mieli, L., Soerensen, V., Hüßy, D., Miserez, R., Zimmermann, W., Inderbitzin, F., Frey, J., 2004. Use of recombinant ApxIV in serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections, development and prevalidation of the ApxIV ELISA. *Vet. Microbiol.* 99, 227-238.
- Duan, X., Nauwynck, H.J., Favoreel, H.W., Pensaert, M.B., 1998a. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of alveolar macrophages can be blocked by monoclonal antibodies against cell surface antigens. *Adv. Exp. Med. Biol.* 440, 81-88.
- Duan, X., Nauwynck, H.J., Favoreel, H.W., Pensaert, M.B., 1998b. Identification of a putative receptor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine alveolar macrophages. *J. Virol.* 72, 4520-4523.
- Duan, X., Nauwynck, H.J., Pensaert, M.B., 1997a. Effects of origin and state of differentiation and activation of monocytes/macrophages on their susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Arch. Virol.* 142, 2483-2497.
- Duan, X., Nauwynck, H.J., Pensaert, M.B., 1997b. Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissues of pigs at different time intervals after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet. Microbiol.* 56, 9-19.
- Dubreuil, J.D., Jacques, M., Mittal, K.R., Gottschalk, M., 2000. *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. *Anim. Health Res. Rev.* 1, 73-93.
- Dubreuil, J.D., Letellier, A., Stenbaek, E., Gottschalk, M., 1996. Serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 strains using a monoclonal-based polystyrene agglutination test. *Can. J. Vet. Res.* 60, 69-71.
- Eamens, G.J., Gonsalves, J.R., Whittington, A.M., Turner, B., 2012. Evaluation of serovar-independent ELISA antigens of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs, following experimental challenge with *A. pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida*. *Aust. Vet. J.* 90, 225-234.

- Enøe, C., Mousing, J., Schirmer, A.L., Willeberg, P., 2002. Infectious and rearing-system related risk factors for chronic pleuritis in slaughter pigs. *Prev. Vet. Med.* 54, 337-349.
- Faaberg, K.S., Plagemann, P.G., 1997. ORF 3 of lactate dehydrogenase-elevating virus encodes a soluble, nonstructural, highly glycosylated, and antigenic protein. *Virology* 227, 245-251.
- Fales, W.H., Morehouse, L.G., Mittal, K.R., Bean-Knudsen, C., Nelson, S.L., Kintner, L.D., Turk, J.R., Turk, M.A., Brown, T.P., Shaw, D.P., 1989. Antimicrobial susceptibility and serotypes of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* recovered from Missouri swine. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1, 16-19.
- Falk, K., Høie, S., Lium, B.M., 1991. An abattoir survey of pneumonia and pleuritis in slaughter weight swine from 9 selected herds. II. Enzootic pneumonia of pigs: microbiological findings and their relationship to pathomorphology. *Acta Vet. Scand.* 32, 67-77.
- Fang, Y., Treffers, E.E., Li, Y., Tas, A., Sun, Z., van der Meer, Y., de Ru, A.H., van Veelen, P.A., Atkins, J.F., Snijder, E.J., Firth, A.E., 2012. Efficient -2 frameshifting by mammalian ribosomes to synthesize an additional arterivirus protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, E2920-2928.
- Fano, E., Olea, L., Pijoan, C., 2005. Eradication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by serum inoculation of naive gilts. *Can. J. Vet. Res.* 69, 71-74.
- Firth, A.E., Zevenhoven-Dobbe, J.C., Wills, N.M., Go, Y.Y., Balasuriya, U.B., Atkins, J.F., Snijder, E.J., Posthuma, C.C., 2011. Discovery of a small arterivirus gene that overlaps the GP5 coding sequence and is important for virus production. *J. Gen. Virol.* 92, 1097-1106.
- Fittipaldi, N., Klopfenstein, C., Gottschalk, M., Broes, A., Paradis, M.A., Dick, C.P., 2005. Assessment of the efficacy of tilmicosin phosphate to eliminate *Actinobacillus pleuropneumoniae* from carrier pigs. *Can. J. Vet. Res.* 69, 146-150.

- Flores-Mendoza, L., Silva-Campa, E., Reséndiz, M., Osorio, F.A., Hernández, J., 2008. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infects mature porcine dendritic cells and up-regulates interleukin-10 production. *Clin. Vaccine Immunol.* 15, 720-725.
- Fodor, L., Varga, J., Molnár, E., Hajtós, I., 1989. Biochemical and serological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 strains isolated from swine. *Vet. Microbiol.* 20, 173-180.
- Fraile, L., Alegre, A., López-Jiménez, R., Nofrarías, M., Segalés, J., 2010. Risk factors associated with pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation in slaughter-aged pigs. *Vet. J.* 184, 326-333.
- Frey, J., 2011. The role of RTX toxins in host specificity of animal pathogenic *Pasteurellaceae*. *Vet. Microbiol.* 153, 51-58.
- Frey, J., Beck, M., Stucki, U., Nicolet, J., 1993a. Analysis of hemolysin operons in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Gene* 123, 51-58.
- Frey, J., Bossé, J.T., Chang, Y.F., Cullen, J.M., Fenwick, B., Gerlach, G.F., Gygi, D., Haesebrouck, F., Inzana, T.J., Jansen, R., Kamp, E.M., Macdonald, J., MacInnes, J.I., Mittal, K.R., Nicolet, J., Rycroft, A.N., Segers, R.P.A.M., Smits, M.A., Stenbaek, E., Struck, D.K., van den Bosch, J.F., Willson, P.J., Young, R., 1993b. *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of haemolysins, cytolysins, pleurotoxin and their genes. *J. Gen. Microbiol.* 139, 1723-1728.
- Frey, J., Kuhn, R., Nicolet, J., 1994. Association of the CAMP phenomenon in *Actinobacillus pleuropneumoniae* with the RTX toxins ApxI, ApxII and ApxIII. *FEMS Microbiol. Lett.* 124, 245-251.
- Frey, J., Kuhnert, P., 2002. RTX toxins in *Pasteurellaceae*. *Int. J. Med. Microbiol.* 292, 149-158.
- Frey, J., Nicolet, J., 1988. Regulation of hemolysin expression in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 by Ca<sup>2+</sup>. *Infect. Immun.* 56, 2570-2575.

- Frey, J., Perrin, J., Nicolet, J., 1989. Cloning and expression of a cohemolysin, the CAMP factor of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* 57, 2050-2056.
- 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*. *Infect. Immun.* 60, 1671-1676.
- Fritz, J.H., Ferrero, R.L., Philpott, D.J., Girardin, S.E., 2006. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat. Immunol.* 7, 1250-1257.
- Fuentes, M.C., Pijoan, C., 1987. Pneumonia in pigs induced by intranasal challenge exposure with pseudorabies virus and *Pasteurella multocida*. *Am. J. Vet. Res.* 48, 1446-1448.
- Fuller, C.A., Yu, R., Irwin, S.W., Schryvers, A.B., 1998. Biochemical evidence for a conserved interaction between bacterial transferrin binding protein A and transferrin binding protein B. *Microb. Pathog.* 24, 75-87.
- Gagné, A., Lacouture, S., Broes, A., D'Allaire, S., Gottschalk, M., 1998. Development of an immunomagnetic method for selective isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 from tonsils. *J. Clin. Microbiol.* 36, 251-254.
- Gagnon, C.A., 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. *Arch. Virol.* 148, 951-972.
- Gao, L., Zhang, W., Sun, Y., Yang, Q., Ren, J., Liu, J., Wang, H., Feng, W.H., 2013. *Cryptosporidium parvum* extract inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One* 8, e63767.
- Gardner, K.H., Kay, L.E., 1998. The use of <sup>2</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N multidimensional NMR to study the structure and dynamics of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27, 357-406.

- Gerber, P.F., Giménez-Lirola, L.G., Halbur, P.G., Zhou, L., Meng, X.J., Opriessnig, T., 2014. Comparison of commercial enzyme-linked immunosorbent assays and fluorescent microbead immunoassays for detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boars. *J. Virol. Methods* 197, 63-66.
- Gerlach, G.F., Anderson, C., Potter, A.A., Klashinsky, S., Willson, P.J., 1992. Cloning and expression of a transferrin-binding protein from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* 60, 892-898.
- Girardin, S.E., Boneca, I.G., Carneiro, L.A.M., Antignac, A., Jéhanno, M., Viala, J., Tedin, K., Taha, M.K., Labigne, A., Zähringer, U., Coyle, A.J., DiStefano, P.S., Bertin, J., Sansonetti, P.J., Philpott, D.J., 2003. Nod1 detects a unique muropeptide from Gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 300, 1584-1587.
- Gonin, P., Pirzadeh, B., Gagnon, C.A., Dea, S., 1999. Seroneutralization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus correlates with antibody response to the GP5 major envelope glycoprotein. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11, 20-26.
- Gonzalez, G.C., Caamano, D.L., Schryvers, A.B., 1990. Identification and characterization of a porcine-specific transferrin receptor in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 4, 1173-1179.
- Gonzalez, G.C., Yu, R.H., Rosteck, P.R., Schryvers, A.B., 1995. Sequence, genetic analysis, and expression of *Actinobacillus pleuropneumoniae* transferrin receptor genes. *Microbiology* 141, 2405-2416.
- Gordon, S., Taylor, P.R., 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 953-964.
- Gottschalk, M., 2007. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes, pathogenicity and virulence, in: American association of swine veterinarians (Ed.), Orlando, FL, United-States.
- Gottschalk, M., Lacouture, S., 2014. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 3, 6, 8 and 15 isolated from diseased pigs in North America. *Vet. Rec.* 174, 452.

- Goubau, D., Deddouche, S., Reis e Sousa, C., 2013. Cytosolic Sensing of Viruses. *Immunity* 38, 855–869.
- Gouré, J., Findlay, W.A., Deslandes, V., Bouevitch, A., Foote, S.J., MacInnes, J.I., Coulton, J.W., Nash, J.H., Jacques, M., 2009. Microarray-based comparative genomic profiling of reference strains and selected Canadian field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *BMC Genomics* 10, 88.
- Grasteau, A., Tremblay, Y.D., Labrie, J., Jacques, M., 2011. Novel genes associated with biofilm formation of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 153, 134-143.
- Gunnarsson, A., Biberstein, E.L., Hurvell, B., 1977. Serologic studies on porcine strains of *Haemophilus paraahaemolyticus* (*pleuropneumoniae*): agglutination reactions. *Am. J. Vet. Res.* 38, 1111-1114.
- Gutiérrez-Martín, C.B., del Blanco, N.G., Blanco, M., Navas, J., Rodríguez-Ferri, E.F., 2006. Changes in antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs in Spain during the last decade. *Vet. Microbiol.* 115, 218-222.
- Gutiérrez-Martín, C.B., Rodríguez-Delgado, O., Alvarez-Nistal, D., de la Puente-Redondo, V.A., García-Rioja, F., Martín-Vicente, J., Rodríguez Ferri, E.F., 2000. Simultaneous serological evidence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, PRRS, Aujeszky's disease and influenza viruses in Spanish finishing pigs. *Res. Vet. Sci.* 68, 9-13.
- Gutiérrez, C.B., Rodríguez Barbosa, J.I., Tascón, R.I., Costa, L., Riera, P., Rodríguez Ferri, E.F., 1995. Serological characterisation and antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs in Spain. *Vet. Rec.* 137, 62-64.
- 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*. *Mol. Microbiol.* 4, 123-128.

- Habrun, B., Frey, J., Bilic, V., Nicolet, J., Humski, A., 1998. Prevalence of serotypes and toxin types of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs in Croatia. *Vet. Rec.* 143, 255-256.
- Halbur, P.G., Bush, E.J., 1997. Update on abortion storms and sow mortality. *Swine Health Prod.* 5, 73.
- Halbur, P.G., Miller, L.D., Paul, P.S., Meng, X.J., Huffman, E.L., Andrews, J.J., 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. *Vet. Pathol.* 32, 200-204.
- Halbur, P.G., Paul, P.S., Meng, X.J., Lum, M.A., Andrews, J.J., Rathje, J.A., 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. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8, 11-20.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P., 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 95-108.
- Hamer-Barrera, R., Godínez, D., Enríquez, V.I., Vaca-Pacheco, S., Martínez-Zúñiga, R., Talamás-Rohana, P., Suárez-Güemez, F., de la Garza, M., 2004. Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 to swine buccal epithelial cells involves fibronectin. *Can. J. Vet. Res.* 68, 33-41.
- Han, M., Du, Y., Song, C., Yoo, D., 2013. Degradation of CREB-binding protein and modulation of type I interferon induction by the zinc finger motif of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nsplalpha subunit. *Virus. Res.* 172, 54-65.
- Harding, J.C., Baarsch, M.J., Murtaugh, M.P., 1997. Association of tumour necrosis factor and acute phase reactant changes with post arrival disease in swine. *Zentralbl. Veterinarmed B* 44, 405-413.



- Harms, P.A., Sorden, S.D., Halbur, P.G., Bolin, S.R., Lager, K.M., Morozov, I., Paul, P.S., 2001. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Pathol.* 38, 528-539.
- Hedges, J.F., Balasuriya, U.B., MacLachlan, N.J., 1999. The open reading frame 3 of equine arteritis virus encodes an immunogenic glycosylated, integral membrane protein. *Virology* 264, 92-98.
- Holtkamp, D.J., Kliebenstein, J.B., Neumann, E.J., Zimmerman, J.J., Rotto, H.F., Yoder, T.K., Wang, C., Yeske, P.E., Mowrer, C.L., Haley, C.A., 2013. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on United States pork producers. *J. Swine Health Prod.* 21, 72-84.
- Huang, H., Zhou, R., Fan, H., Dan, H., Chen, M., Yan, L., Bei, W., Chen, H., 2006. Generation of monoclonal antibodies and epitope mapping of ApxIVA of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Mol. Immunol.* 43, 2130-2134.
- Inzana, T.J., Fenwick, B., 2001. Serologic detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in swine by capsular polysaccharide-biotin-streptavidin enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1279-1282.
- Inzana, T.J., Ma, J., Workman, T., Gogolewski, R.P., Anderson, P., 1988. Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect. Immun.* 56, 1880-1889.
- Inzana, T.J., Todd, J., Veit, H.P., 1993. Safety, stability, and efficacy of noncapsulated mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* for use in live vaccines. *Infect. Immun.* 61, 1682-1686.
- Ito, H., 2010. Development of a cps-based multiplex PCR for typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2 and 5. *J. Vet. Med. Sci.* 72, 653-655.

- Ito, H., Ishii, H., Akiba, M., 2004. Analysis of the complete nucleotide sequence of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* streptomycin-sulfonamide resistance plasmid, pMS260. *Plasmid* 51, 41-47.
- Izano, E.A., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Mulks, M.H., Velliyagounder, K., Ragunath, C., Kher, W.B., Ramasubbu, N., Jabbouri, S., Perry, M.B., Kaplan, J.B., 2007. Poly-N-acetylglucosamine mediates biofilm formation and antibiotic resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microb. Pathog.* 43, 1-9.
- Jacques, M., 2004. Surface polysaccharides and iron-uptake systems of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can. J. Vet. Res.* 68, 81-85.
- Jacques, M., Aragon, V., Tremblay, Y.D., 2010. Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. *Anim. Health. Res. Rev.* 11, 97-121.
- Jacques, M., Bélanger, M., Roy, G., Foiry, B., 1991. Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal epithelial cells and frozen lung sections. *Vet. Microbiol.* 27, 133-143.
- Jaglic, Z., Svastova, P., Rychlik, I., Nedbalcova, K., Kucerova, Z., Pavlik, I., Bartos, M., 2004. Differentiation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR-REA based on sequence variability of the *apxIVA* gene and by ribotyping. *Vet. Microbiol.* 103, 63-69.
- Jansen, R., Briaire, J., Kamp, E.M., Gielkens, A.L., Smits, M.A., 1995. The CAMP effect of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is caused by Apx toxins. *FEMS Microbiol. Lett.* 126, 139-143.
- Jensen, A.E., Bertram, T.A., 1986. Morphological and biochemical comparison of virulent and avirulent isolates of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect. Immun.* 51, 419-424.
- Jessing, S.G., Angen, O., Inzana, T.J., 2003. Evaluation of a multiplex PCR test for simultaneous identification and serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 2, 5, and 6. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4095-4100.

- Jiang, Y., Khan, F.A., Pandupuspitasari, N.S., Kadariya, I., Cheng, Z., Ren, Y., Chen, X., Zhou, A., Yang, L., Kong, D., Zhang, S., 2013. Analysis of the binding sites of porcine sialoadhesin receptor with PRRSV. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 23955-23979.
- Jinadasa, R.N., Bloom, S.E., Weiss, R.S., Duhamel, G.E., 2011. Cytolethal distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages. *Microbiology* 157, 1851-1875.
- Johnson, C.R., Yu, W., Murtaugh, M.P., 2007. Cross-reactive antibody responses to nsp1 and nsp2 of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 88, 1184-1195.
- Jones, M., Onslow, M., Packman, A., Gebiski, V., 2006. Guidelines for statistical analysis of percentage of syllables stuttered data. *J. Speech Lang. Hear. Res.* 49, 867-878.
- Jung, K., Renukaradhya, G.J., Alekseev, K.P., Fang, Y., Tang, Y., Saif, L.J., 2009. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus modifies innate immunity and alters disease outcome in pigs subsequently infected with porcine respiratory coronavirus: implications for respiratory viral co-infections. *J. Gen. Virol.* 90, 2713-2723.
- Jusa, E.R., Inaba, Y., Kouno, M., Hirose, O., 1997. Effect of heparin on infection of cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Am. J. Vet. Res.* 58, 488-491.
- Kamp, E.M., Popma, J.K., Anakotta, J., Smits, M.A., 1991. Identification of hemolytic and cytotoxic proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by use of monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 59, 3079-3085.
- Kamp, E.M., Popma, J.K., van Leengoed, L.A., 1987. Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* in the Netherlands: with emphasis on heterogeneity within serotype 1 and (proposed) serotype 9. *Vet. Microbiol.* 13, 249-257.
- Kandala, P.K., Srivastava, S.K., 2010. Activation of checkpoint kinase 2 by 3,3'-diindolylmethane is required for causing G2/M cell cycle arrest in human ovarian cancer cells. *Mol. Pharmacol.* 78, 297-309.

- Kaplan, J.B., Mulks, M.H., 2005. Biofilm formation is prevalent among field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 108, 89-94.
- Kaplan, J.B., Velliyagounder, K., Rangunath, C., Rohde, H., Mack, D., Knobloch, J.K., Ramasubbu, N., 2004. Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. *J. Bacteriol.* 186, 8213-8220.
- Karniychuk, U.U., Saha, D., Vanhee, M., Geldhof, M., Cornillie, P., Caij, A.B., de Regge, N., Nauwynck, H.J., 2012. Impact of a novel inactivated PRRS virus vaccine on virus replication and virus-induced pathology in fetal implantation sites and fetuses upon challenge. *Theriogenology* 78, 1527-1537.
- Karuppanan, A.K., Wu, K.X., Qiang, J., Chu, J.J., Kwang, J., 2012. Natural compounds inhibiting the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Antiviral Res.* 94, 188-194.
- Keffaber, K.K., 1989. Reproductive failure of unknown etiology. *Am. Assoc. Swine Pract. News* 1, 1-9.
- Keppner, S., Proschak, E., Kaufmann, M., Strebhardt, K., Schneider, G., Spänkuch, B., 2010. Biological impact of freezing Plk1 in its inactive conformation in cancer cells. *Cell Cycle* 9, 761-774.
- Kielstein, P., Wuthe, H.H., 1998. [Isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, and related bacteria from the organs of pigs from Schleswig-Holstein (Germany) examined post mortem]. *Tierarztl. Umschau.* 53, 250-258.
- Kim, H., Kim, H.K., Jung, J.H., Choi, Y.J., Kim, J., Um, C.G., Hyun, S.B., Shin, S., Lee, B., Jang, G., Kang, B.K., Moon, H.J., Song, D.S., 2011. The assessment of efficacy of porcine reproductive respiratory syndrome virus inactivated vaccine based on the viral quantity and inactivation methods. *Virol. J.* 8, 323.

- Kim, H.S., Kwang, J., Yoon, I.J., Joo, H.S., Frey, M.L., 1993. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch. Virol.* 133, 477-483.
- Kim, T., Lee, J., 2006. Cloning and expression of genes encoding transferrin-binding protein A and B from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. *Protein. Expr. Purif.* 45, 235-240.
- Kim, T.S., Benfield, D.A., Rowland, R.R., 2002. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced cell death exhibits features consistent with a nontypical form of apoptosis. *Virus Res.* 85, 133-140.
- Kimman, T.G., Cornelissen, L.A., Moormann, R.J., Rebel, J.M., Stockhofe-Zurwieden, N., 2009. Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccinology. *Vaccine* 27, 3704-3718.
- Klausen, J., Andresen, L.O., Barfod, K., Sørensen, V., 2002. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for serological surveillance of infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 in pig herds. *Vet. Microbiol.* 88, 223-232.
- Klausen, J., Ekerøth, L., Grøndahl-Hansen, J., Andresen, L.O., 2007. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 7 in pig serum. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19, 244-249.
- Kleiboeker, S.B., Schommer, S.K., Lee, S.M., Watkins, S., Chittick, W., Polson, D., 2005. Simultaneous detection of North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome virus using real-time quantitative reverse transcriptase-PCR. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17, 165-170.
- Klein, C.S., Piffer, I.A., Ceroni da Silva, S., Schrank, A., Fávero, M.B., Schrank, I.S., 2003. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR on field strains from healthy and diseased pigs. *Curr. Microbiol.* 46, 443-447.
- Klessig, D.F., Anderson, C.W., 1975. Block to multiplication of adenovirus serotype 2 in monkey cells. *J. Virol.* 16, 1650-1668.

- Kreutz, L.C., 1998. Cellular membrane factors are the major determinants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus tropism. *Virus Res.* 53, 121-128.
- Kreutz, L.C., Ackermann, M.R., 1996. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus enters cells through a low pH-dependent endocytic pathway. *Virus Res.* 42, 137-147.
- Kroese, M.V., Zevenhoven-Dobbe, J.C., Bos-de Ruijter, J.N., Peeters, B.P., Meulenbergh, J.J., Cornelissen, L.A., Snijder, E.J., 2008. The nsp1alpha and nsp1 papain-like autoproteases are essential for porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA synthesis. *J. Gen. Virol.* 89, 494-499.
- Kucerova, Z., Jaglic, Z., Ondriasova, K., Nedbalcova, K., 2005. Serotype distribution of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from porcine pleuropneumonia in the Czech Republic during period 2003–2004. *Vet. Med.* 50, 355-360.
- 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. *Vet. Res.* 34, 249-260.
- Labrie, J., Pelletier-Jacques, G., Deslandes, V., Ramjeet, M., Auger, E., Nash, J.H., Jacques, M., 2010. Effects of growth conditions on biofilm formation by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Res.* 41, 3.
- Lally, E.T., Hill, R.B., Kieba, I.R., Korostoff, J., 1999. The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol.* 7, 356-361.
- Lambert, M.E., Poljak, Z., Arsenault, J., D'Allaire, S., 2012. Epidemiological investigations in regard to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in Quebec, Canada. Part 1: biosecurity practices and their geographical distribution in two areas of different swine density. *Prev. Vet. Med.* 104, 74-83.
- Larochelle, R., Magar, R., 1997. Evaluation of the presence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in packaged pig meat using virus isolation and polymerase chain reaction (PCR) method. *Vet. Microbiol.* 58, 1-8.

- Lee, C., Bachand, A., Murtaugh, M.P., Yoo, D., 2004. Differential host cell gene expression regulated by the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP4 and GP5 glycoproteins. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 189-198.
- 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, S.M., Kleiboeker, S.B., 2005. Porcine arterivirus activates the NF-kappaB pathway through IkappaB degradation. *Virology* 342, 47-59.
- Lee, Y.J., Lee, C., 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication is suppressed by inhibition of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway. *Virus Res.* 152, 50-58.
- Lei, L., Du, C., Yang, P., Xie, F., Ou, P., Han, W., Wang, J., 2009. Screening of strain-specific *Actinobacillus pleuropneumoniae* genes using a combination method. *J. Microbiol. Methods* 77, 145-151.
- Leng, X., Li, Z., Xia, M., He, Y., Wu, H., 2012. Evaluation of the efficacy of an attenuated live vaccine against highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in young pigs. *Clin. Vaccine Immunol.* 19, 1199-1206.
- Lévesque, C., 2010. Modèles cellulaires pour étudier les interactions entre *Actinobacillus pleuropneumoniae* et le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin, Université de Montréal, p. 125, mémoire de maîtrise.
- Lévesque, C., Provost, C., Labrie, J., Hernandez Reyes, Y., Burciaga Nava, J.A., Gagnon, C.A., Jacques, M., 2014. *Actinobacillus pleuropneumoniae* possesses an antiviral activity against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *PLoS One* 9, e98434.
- Li, Y., Wang, X., Bo, K., Wang, X., Tang, B., Yang, B., Jiang, W., Jiang, P., 2007. Emergence of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the Mid-Eastern region of China. *Vet. J.* 174, 577-584.

- Litt, D.J., Palmer, H.M., Borriello, S.P., 2000. *Neisseria meningitidis* expressing transferrin binding proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* can utilize porcine transferrin for growth. *Infect. Immun.* 68, 550-557.
- Liu, J., Chen, X., Lin, L., Tan, C., Chen, Y., Guo, Y., Jin, M., Guo, A., Bei, W., Chen, H., 2007. Potential use an *Actinobacillus pleuropneumoniae* double mutant strain *DeltaapxIICDeltaapxIVA* as live vaccine that allows serological differentiation between vaccinated and infected animals. *Vaccine* 25, 7696-7705.
- Liu, K., Feng, X., Ma, Z., Luo, C., Zhou, B., Cao, R., Huang, L., Miao, D., Pang, R., He, D., Lian, X., Chen, P., 2012. Antiviral activity of phage display selected peptides against porcine reproductive and respiratory syndrome virus *in vitro*. *Virology* 432, 73-80.
- Loemba, H.D., 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. *Arch. Virol.* 141, 751-761.
- Lone, A.G., Deslandes, V., Nash, J.H., Jacques, M., MacInnes, J.I., 2009a. *malT* knockout mutation invokes a stringent type gene-expression profile in *Actinobacillus pleuropneumoniae* in bronchoalveolar fluid. *BMC Microbiol.* 9, 195.
- Lone, A.G., Deslandes, V., Nash, J.H., Jacques, M., Macinnes, J.I., 2009b. Modulation of gene expression in *Actinobacillus pleuropneumoniae* exposed to bronchoalveolar fluid. *PLoS One* 4, e6139.
- Lopez, O.J., Oliveira, M.F., García, E.A., Kwon, B.J., Doster, A., Osorio, F.A., 2007. Protection against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection through passive transfer of PRRSV-neutralizing antibodies is dose dependent. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 269-275.
- Loving, C.L., Brockmeier, S.L., Sacco, R.E., 2007. Differential type I interferon activation and susceptibility of dendritic cell populations to porcine arterivirus. *Immunology* 120, 217-229.



- Loving, C.L., Brockmeier, S.L., Vincent, A.L., Palmer, M.V., Sacco, R.E., Nicholson, T.L., 2010. Influenza virus coinfection with *Bordetella bronchiseptica* enhances bacterial colonization and host responses exacerbating pulmonary lesions. *Microb. Pathog.* 49, 237-245.
- Ma, Z., Zhang, W., Wang, L., Zhu, M., Wang, H., Feng, W.H., Ng, T.B., 2013. A novel compound from the mushroom *Cryptopus volvatus* inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) *in vitro*. *PLoS One* 8, e79333.
- MacLean, L.L., Perry, M.B., Vinogradov, E., 2004. Characterization of the antigenic lipopolysaccharide O chain and the capsular polysaccharide produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 13. *Infect. Immun.* 72, 5925-5930.
- Maes, D.G., Chiers, K., Haesebrouck, F., Laevens, H., Verdonck, M., de Kruif, A., 2002. Seroprevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 2, 3 and 9 in slaughter pigs from Belgian fattening farms. *Vet. Rec.* 151, 206-210.
- Magar, R., Robinson, Y., Dubuc, C., Larochele, R., 1995. Isolation and experimental oral transmission in pigs of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate. *Adv. Exp. Med. Biol.* 380, 139-144.
- Maldonado, J., Valls, L., Martínez, E., Riera, P., 2009. Isolation rates, serovars, and toxin genotypes of nicotinamide adenine dinucleotide-independent *Actinobacillus pleuropneumoniae* among pigs suffering from pleuropneumonia in Spain. *J. Vet. Diagn. Invest.* 21, 854-857.
- Mardassi, H., Athanassios, R., Mounir, S., Dea, S., 1994. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: morphological, biochemical and serological characteristics of Québec isolates associated with acute and chronic outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome. *Can. J. Vet. Res.* 58, 55-64.

- Mardassi, H., Gonin, P., Gagnon, C.A., 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. *J. Virol.* 72, 6298-6306.
- 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.
- Marois-Créhan, C., Lacouture, S., Jacques, M., Fittipaldi, N., Kobisch, M., Gottschalk, M., 2014. Development of two real-time polymerase chain reaction assays to detect *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1-9-11 and serovar 2. *J. Vet. Diagn. Invest.* 26, 146-149.
- Marois, C., Gottschalk, M., Morvan, H., Fablet, C., Madec, F., Kobisch, M., 2009. Experimental infection of SPF pigs with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 alone or in association with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 135, 283-291.
- Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., Locati, M., 2008. Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.* 13, 453-461.
- Masin, J., Fiser, R., Linhartova, I., Osicka, R., Bumba, L., Hewlett, E.L., Benz, R., Sebo, P., 2013. Differences in purinergic amplification of osmotic cell lysis by the pore-forming RTX toxins *Bordetella pertussis* CyaA and *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIA: the role of pore size. *Infect. Immun.* 81, 4571-4582.
- Matter, D., Rossano, A., Limat, S., Vorlet-Fawer, L., Brodard, I., Perreten, V., 2007. Antimicrobial resistance profile of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus porcitoncillarum*. *Vet. Microbiol.* 122, 146-156.
- Medrano, A., Querol, E., Daban, M., 1997. Cloning and sequencing of the gene encoding the outer-membrane protein Tbp1 from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Expression of Tbp1 and Tbp2. *Behring. Inst. Mitt.*, 410-423.

- Mengeling, W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C., 1995. Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 3-16.
- Metwally, S., Mohamed, F., Faaberg, K., Burrage, T., Prarat, M., Moran, K., Bracht, A., Mayr, G., Berninger, M., Koster, L., To, T.L., Nguyen, V.L., Reising, M., Landgraf, J., Cox, L., Lubroth, J., Carrillo, C., 2010. Pathogenicity and molecular characterization of emerging porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Vietnam in 2007. *Transbound Emerg. Dis.* 57, 315-329.
- Meulenbergh, J.J., Bos-de Ruijter, J.N., van de Graaf, R., Wensvoort, G., Moormann, R.J., 1998. Infectious transcripts from cloned genome-length cDNA of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Virol.* 72, 380-387.
- Meulenbergh, J.J., Petersen-den Besten, A., de Kluyver, E.P., Moormann, R.J., Schaaper, W.M., Wensvoort, G., 1995a. Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology* 206, 155-163.
- Meulenbergh, J.J., Petersen-den Besten, A., de Kluyver, E.P., Moormann, R.J., Schaaper, W.M., Wensvoort, G., 1995b. Characterization of structural proteins of Lelystad virus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 380, 271-276.
- Meyns, T., van Steelant, J., Rolly, E., Dewulf, J., Haesebrouck, F., Maes, D., 2011. A cross-sectional study of risk factors associated with pulmonary lesions in pigs at slaughter. *Vet. J.* 187, 388-392.
- Mikael, L.G., Pawelek, P.D., Labrie, J., Sirois, M., Coulton, J.W., Jacques, M., 2002. Molecular cloning and characterization of the ferric hydroxamate uptake (*fhu*) operon in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology* 148, 2869-2882.
- Mikael, L.G., Srikumar, R., Coulton, J.W., Jacques, M., 2003. *fhuA* of *Actinobacillus pleuropneumoniae* encodes a ferrichrome receptor but is not regulated by iron. *Infect. Immun.* 71, 2911-2915.
- Miller, L.C., Fox, J.M., 2004. Apoptosis and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 131-142.

- Miller, S.I., Ernst, R.K., Bader, M.W., 2005. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev. Microbiol.* 3, 36-46.
- Min, K., Chae, C., 1999. Serotype and apx genotype profiles of *Actinobacillus pleuropneumoniae* field isolates in Korea. *Vet. Rec.* 145, 251-254.
- Mittal, K.R., Bourdon, S., Higgins, R., 1998. [Evolution de la distribution des différents sérotypes d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* provenant de porcs malades au Québec]. *Med. Vet. Que.* 28, 91-92.
- Mittal, K.R., Higgins, R., Lariviere, S., 1982. Evaluation of slide agglutination and ring precipitation tests for capsular serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 15, 1019-1023.
- Mittal, K.R., Higgins, R., Lariviere, S., 1983a. Determination of antigenic specificity and relationship among *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes by an indirect hemagglutination test. *J. Clin. Microbiol.* 17, 787-790.
- Mittal, K.R., Higgins, R., Lariviere, S., 1983b. Identification and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by coagglutination test. *J. Clin. Microbiol.* 18, 1351-1354.
- Mittal, K.R., Higgins, R., Larivière, S., Nadeau, M., 1992. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs in Quebec. *Vet. Microbiol.* 32, 135-148.
- Mittal, K.R., Kamp, E.M., Kobisch, M., 1993. Serological characterisation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotypes 1, 9 and 11. *Res. Vet. Sci.* 55, 179-184.
- Molnár, E., 1990. Survey of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infection in swine by different methods. *Acta Vet. Hung.* 38, 231-238.
- Morioka, A., Asai, T., Nitta, H., Yamamoto, K., Ogikubo, Y., Takahashi, T., Suzuki, S., 2008. Recent trends in antimicrobial susceptibility and the presence of the tetracycline resistance gene in *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 70, 1261-1264.

- Mosser, D.M., 2003. The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* 73, 209-212.
- Mousing, J., Permin, A., Mortensen, S., Bøtner, A., Willeberg, P., 1997. A case-control questionnaire survey of risk factors for porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) seropositivity in Danish swine herds. *Vet. Microbiol.* 55, 323-328.
- Murtaugh, M.P., Elam, M.R., Kakach, L.T., 1995. Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus. *Arch. Virol.* 140, 1451-1460.
- Music, N., Gagnon, C.A., 2010. The role of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus structural and non-structural proteins in virus pathogenesis. *Anim. Health. Res. Rev.* 11, 135-163.
- Nauwynck, H.J., Duan, X., Favoreel, H.W., van Oostveldt, P., Pensaert, M.B., 1999. Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor-mediated endocytosis. *J. Gen. Virol.* 80, 297-305.
- Negrete-Abascal, E., Tenorio, V.R., Serrano, J.J., García, C., de la Garza, M., 1994. Secreted proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 degrade porcine gelatin, hemoglobin and immunoglobulin A. *Can. J. Vet. Res.* 58, 83-86.
- Neumann, E.J., Kliebenstein, J.B., Johnson, C.D., Mabry, J.W., Bush, E.J., Seitzinger, A.H., Green, A.L., Zimmerman, J.J., 2005. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 227, 385-392.
- Ni, Y.Y., Opriessnig, T., Zhou, L., Cao, D., Huang, Y.W., Halbur, P.G., Meng, X.J., 2013. Attenuation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by molecular breeding of virus envelope genes from genetically divergent strains. *J. Virol.* 87, 304-313.
- Nielsen, R., 1984. *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes--cross protection experiments. *Nord. Vet. Med.* 36, 221-234.

- Nielsen, R., 1986. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 12. *Acta Vet. Scand.* 27, 453-455.
- Nielsen, R., Andresen, L.O., Plambeck, T., 1996. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 1 strains antigenically related to both serotypes 2 and 7. *Acta Vet. Scand.* 37, 327-336.
- Niven, D.F., Donga, J., Archibald, F.S., 1989. Responses of *Haemophilus pleuropneumoniae* to iron restriction: changes in the outer membrane protein profile and the removal of iron from porcine transferrin. *Mol. Microbiol.* 3, 1083-1089.
- Niven, D.F., Lévesque, M., 1988. V-Factor-Dependent Growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Biotype 2 (Bertschinger 2008/76). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38, 319-320.
- Norcia, L.J., Silvia, A.M., Hayashi, S.F., 1999. Studies on time-kill kinetics of different classes of antibiotics against veterinary pathogenic bacteria including *Pasteurella*, *Actinobacillus* and *Escherichia coli*. *J. Antibiot.* 52, 52-60.
- O'Neill, C., Jones, S.C., Bossé, J.T., Watson, C.M., Williamson, S.M., Rycroft, A.N., Kroll, J.S., Hartley, H.M., Langford, P.R., 2010. Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars in England and Wales. *Vet. Rec.* 167, 661-662.
- Ohguchi, M., Ishisaki, A., Okahashi, N., Koide, M., Koseki, T., Yamato, K., Noguchi, T., Nishihara, T., 1998. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* toxin induces both cell cycle arrest in the G2/M phase and apoptosis. *Infect. Immun.* 66, 5980-5987.
- Oleksiewicz, M.B., Bøtner, 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. *J. Virol.* 75, 3277-3290.
- Oleksiewicz, M.B., Nielsen, J., 1999. Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) on alveolar lung macrophage survival and function. *Vet. Microbiol.* 66, 15-27.

- Opriessnig, T., Giménez-Lirola, L.G., Halbur, P.G., 2011a. Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Anim. Health Res. Rev.* 12, 133-148.
- Opriessnig, T., Madson, D.M., Schalk, S., Brockmeier, S., Shen, H.G., Beach, N.M., Meng, X.J., Baker, R.B., Zanella, E.L., Halbur, P.G., 2011b. Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination is effective in reducing disease and PCV2 shedding in semen of boars concurrently infected with PCV2 and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Theriogenology* 76, 351-360.
- Opriessnig, T., Thacker, E.L., Yu, S., Fenaux, M., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2004. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Vet. Pathol.* 41, 624-640.
- Ostrowski, M., Galeota, J.A., Jar, A.M., Platt, K.B., Osorio, F.A., Lopez, O.J., 2002. Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *J. Virol.* 76, 4241-4250.
- Oswald, W., Konine, D.V., Rohde, J., Gerlach, G.F., 1999. First chromosomal restriction map of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and localization of putative virulence-associated genes. *J. Bacteriol.* 181, 4161-4169.
- Otake, S., Dee, S.A., Moon, R.D., Rossow, K.D., Trincado, C., Pijoan, C., 2003a. Evaluation of mosquitoes, *Aedes vexans*, as biological vectors of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can. J. Vet. Res.* 67, 265-270.
- Otake, S., Dee, S.A., Rossow, K.D., Moon, R.D., Pijoan, C., 2002. Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by mosquitoes, *Aedes vexans* (Meigen). *Can. J. Vet. Res.* 66, 191-195.
- Otake, S., Dee, S.A., Rossow, K.D., Moon, R.D., Trincado, C., Pijoan, C., 2003b. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by houseflies (*Musca domestica*). *Vet. Rec.* 152, 73-76.

- Paradis, S.É., Dubreuil, D., Rioux, S., Gottschalk, M., Jacques, M., 1994. High-molecular-mass lipopolysaccharides are involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells. *Infect. Immun.* 62, 3311-3319.
- Paradis, S.É., Dubreuil, J.D., Gottschalk, M., Archambault, M., Jacques, M., 1999. Inhibition of adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract cells by monoclonal antibodies directed against LPS and partial characterization of the LPS receptors. *Curr. Microbiol.* 39, 313-0320.
- Park, J.Y., Kim, H.S., Seo, S.H., 2008. Characterization of interaction between porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine dendritic cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 1709-1716.
- Park, S.J., Seo, H.W., Park, C., Chae, C., 2014. Interaction between single-dose *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines on dually infected pigs. *Res. Vet. Sci.* 96, 516-522.
- Patel, D., Nan, Y., Shen, M., Ritthipichai, K., Zhu, X., Zhang, Y.J., 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus inhibits type I interferon signaling by blocking STAT1/STAT2 nuclear translocation. *J. Virol.* 84, 11045-11055.
- Pattison, I.H., Howell, D.G., Elliot, J., 1957. A haemophilus-like organism isolated from pig lung and the associated pneumonic lesions. *J. Comp. Pathol.* 67, 320-330.
- Pejsak, Z., Stadejek, T., Markowska-Daniel, I., 1997. Clinical signs and economic losses caused by porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a large breeding farm. *Vet. Microbiol.* 55, 317-322.
- Pérès, S.Y., Marchès, O., Daigle, F., Nougayrède, J.P., Hérault, F., Tasca, C., De Rycke, J., Oswald, E., 1997. A new cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. *Mol. Microbiol.* 24, 1095-1107.



- Perfumo, C.J., Rehbinder, C., Karlsson, K., 1983. Swine pleuropneumonia produced by *Haemophilus pleuropneumoniae*. III. An electron microscopic study. Zentralbl. Veterinarmed B 30, 678-684.
- Perry, M.B., Altman, E., Brisson, J.R., Beynon, L.M., Richards, J.C., 1990. Structural characteristics of the antigen capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in the serological classification of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* strains. Serodiag. Immun. Inf. D 4, 299-308.
- Perry, M.B., MacLean, L.L., 2004. Structural characterization of the antigenic O-polysaccharide in the lipopolysaccharide produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 14. Carbohydr. Res. 339, 1399-1402.
- Perry, M.B., MacLean, L.L., Vinogradov, E., 2005. Structural characterization of the antigenic capsular polysaccharide and lipopolysaccharide O-chain produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 15. Biochem. Cell. Biol. 83, 61-69.
- Piffer, I.A., Carter, G.R., Botovchenco, A.A., 1986. Identification of serotypes of *Haemophilus pleuropneumoniae* by counterimmunoelectrophoresis. Vet. Rec. 118, 292-294.
- Pirzadeh, B., Dea, S., 1997. Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants. J. Gen. Virol. 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. J. Gen. Virol. 79, 989-999.
- Plagemann, P.G., 2004. GP5 ectodomain epitope of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, strain Lelystad virus. Virus Res. 102, 225-230.
- Platanias, L.C., 2005. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. Nat. Rev. Immunol. 5, 375-386.

- Pohl, S., Bertschinger, H.U., Frederiksen, W., Mannheim, W., 1983. Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica*-like organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae* comb. nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33, 510-514.
- Pol, J.M., van Leengoed, L.A., Stockhofe, N., Kok, G., Wensvoort, G., 1997. Dual infections of PRRSV/influenza or PRRSV/*Actinobacillus pleuropneumoniae* in the respiratory tract. *Vet. Microbiol.* 55, 259-264.
- Power, S.B., Quigley, F.C., Pritchard, D.G., Croston, P., 1983. Porcine pleuropneumonia associated with *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 3 in the Republic of Ireland. *Vet. Rec.* 113, 113-114.
- Prather, R.S., Rowland, R.R., Ewen, C., Tribble, B., Kerrigan, M., Bawa, B., Teson, J.M., Mao, J., Lee, K., Samuel, M.S., Whitworth, K.M., Murphy, C.N., Egen, T., Green, J.A., 2013. An intact sialoadhesin (Sn/SIGLEC1/CD169) is not required for attachment/internalization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Virol.* 87, 9538-9546.
- Prieto, C., Suárez, P., Simarro, I., García, C., Fernández, A., Castro, J.M., 1997. Transplacental infection following exposure of gilts to porcine reproductive and respiratory syndrome virus at the onset of gestation. *Vet. Microbiol.* 57, 301-311.
- Provost, C., Jia, J.J., Music, N., Lévesque, C., Lebel, M.È., del Castillo, J.R.E., Jacques, M., Gagnon, C.A., 2012. Identification of a new cell line permissive to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection and replication which is phenotypically distinct from MARC-145 cell line. *Virol. J.* 9, 267.
- Prydz, K., Dalen, K.T., 2000. Synthesis and sorting of proteoglycans. *J. Cell. Sci.* 113, 193-205.

- Ramjeet, M., Cox, A.D., Hancock, M.A., Mourez, M., Labrie, J., Gottschalk, M., Jacques, M., 2008a. 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. *Mol. Microbiol.* 70, 221-235.
- Ramjeet, M., Deslandes, V., Gouré, J., Jacques, M., 2008b. *Actinobacillus pleuropneumoniae* vaccines: from bacterins to new insights into vaccination strategies. *Anim. Health Res. Rev.* 9, 25-45.
- Ramjeet, M., Deslandes, V., St Michael, F., Cox, A.D., Kobisch, M., Gottschalk, M., Jacques, M., 2005. Truncation of the lipopolysaccharide outer core affects susceptibility to antimicrobial peptides and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *J. Biol. Chem.* 280, 39104-39114.
- Renukaradhya, G.J., Alekseev, K., Jung, K., Fang, Y., Saif, L.J., 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced immunosuppression exacerbates the inflammatory response to porcine respiratory coronavirus in pigs. *Viral Immunol.* 23, 457-466.
- Ribbens, S., Dewulf, J., Koenen, F., Mintiens, K., de Kruif, A., Maes, D., 2009. Type and frequency of contacts between Belgian pig herds. *Prev. Vet. Med.* 88, 57-66.
- Ricard, M.A., Archibald, F.S., Niven, D.F., 1991. Isolation and identification of a putative porcine transferrin receptor from *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 1. *J. Gen. Microbiol.* 137, 2733-2740.
- 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. *Microb. Pathog.* 28, 279-289.
- Rodriguez, M.J., Sarraseca, J., García, J., Sanz, A., Plana-Durán, J., Ignacio Casal, J., 1997. Epitope mapping of the nucleocapsid protein of European and North American isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 78, 2269-2278.

- Rosendal, S., Carpenter, D.S., Mitchell, W.R., Wilson, M.R., 1981. Vaccination against pleuropneumonia of pigs caused by *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Can. Vet. J.* 22, 34-35.
- Rosendal, S., MacInnes, J.I., 1990. Characterization of an attenuated strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, serotype 1. *Am. J. Vet. Res.* 51, 711-717.
- Rosow, K.D., Bautista, E.M., Goyal, S.M., Molitor, T.W., Murtaugh, M.P., Morrison, R.B., Benfield, D.A., Collins, J.E., 1994. Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week-old pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 3-12.
- Rovira, A., Balasch, M., Segalés, J., García, L., Plana-Durán, J., Rosell, C., Ellerbrok, H., Mankertz, A., Domingo, M., 2002. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J. Virol.* 76, 3232-3239.
- Rowland, R.R., Kervin, R., Kuckleburg, C., Sperlich, A., Benfield, D.A., 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 Res.* 64, 1-12.
- Rowland, R.R., Robinson, B., Stefanick, J., Kim, T.S., Guanghua, L., Lawson, S.R., Benfield, D.A., 2001. Inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by interferon-gamma and recovery of virus replication with 2-aminopurine. *Arch. Virol.* 146, 539-555.
- Rowland, R.R., Schneider, P., Fang, Y., Wootton, S., Yoo, D., Benfield, D.A., 2003. Peptide domains involved in the localization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein to the nucleolus. *Virology* 316, 135-145.
- Rycroft, A.N., Cullen, J.M., 1990. Complement resistance in *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infection of swine. *Am. J. Vet. Res.* 51, 1449-1453.

- Sakano, T., Shibata, I., Samegai, Y., Taneda, A., Okada, M., Irisawa, T., Sato, S., 1993. Experimental pneumonia of pigs infected with Aujeszky's disease virus and *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J. Vet. Med. Sci. 55, 575-579.
- Salmon, S.A., Watts, J.L., Yancey, R.J., Jr., 1996. *In vitro* activity of ceftiofur and its primary metabolite, desfuroylceftiofur, against organisms of veterinary importance. J. Vet. Diagn. Invest. 8, 332-336.
- Sanchez, C., Domenech, N., Vazquez, J., Alonso, F., Ezquerro, A., Dominguez, J., 1999. The porcine 2A10 antigen is homologous to human CD163 and related to macrophage differentiation. J. Immunol. 162, 5230-5237.
- Sazer, S., Sherwood, S.W., 1990. Mitochondrial growth and DNA synthesis occur in the absence of nuclear DNA replication in fission yeast. J. Cell. Sci. 97, 509-516.
- Schaer, C.A., Schoedon, G., Imhof, A., Kurrer, M.O., Schaer, D.J., 2006. Constitutive endocytosis of CD163 mediates hemoglobin-heme uptake and determines the noninflammatory and protective transcriptional response of macrophages to hemoglobin. Circ. Res. 99, 943-950.
- Schaller, A., Kuhn, R., Kuhnert, P., Nicolet, J., Anderson, T.J., MacInnes, J.I., Segers, R.P., Frey, J., 1999. Characterization of *apxIVA*, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Microbiology 145, 2105-2116.
- Schimmel, D., Hass, R., 1983. [Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* strains]. Arch. Exp. Veterinarmed 37, 549-551.
- Schurrer, J.A., Dee, S.A., Moon, R.D., Deen, J., Pijoan, C.B., 2006. An evaluation of three intervention strategies for the control of insects on a commercial swine farm. J. Swine Health Prod. 14, 76-81.
- Schurrer, J.A., Dee, S.A., Moon, R.D., Murtaugh, M.P., Finnegan, C.P., Deen, J., Kleiboeker, S.B., Pijoan, C.B., 2005. Retention of ingested porcine reproductive and respiratory syndrome virus in houseflies. Am. J. Vet. Res. 66, 1517-1525.

- Seah, J.N., Kwang, J., 2004. Localization of linear cytotoxic and pro-apoptotic epitopes in RTX toxin ApxIII of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vaccine* 22, 1494-1497.
- Sebunya, T.N., Saunders, J.R., Osborne, A.D., 1983. Dose response relationship of *Haemophilus pleuropneumoniae* aerosols in pigs. *Can. J. Comp. Med.* 47, 54-56.
- Seo, S.H., Goloubeva, O., Webby, R., Webster, R.G., 2001. Characterization of a porcine lung epithelial cell line suitable for influenza virus studies. *J. Virol.* 75, 9517-9525.
- Serrano-Rubio, L.E., Tenorio-Gutiérrez, V., Suárez-Güemes, F., Reyes-Cortés, R., Rodríguez-Mendiola, M., Arias-Castro, C., Godínez-Vargas, D., de la Garza, M., 2008. Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovars 1 and 2 in pigs using a PCR assay. *Mol. Cell. Probes* 22, 305-312.
- Shakarji, L., Mikael, L.G., Srikumar, R., Kobisch, M., Coulton, J.W., Jacques, M., 2006. Fhva and HgbA, outer membrane proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: their role as virulence determinants. *Can. J. Microbiol.* 52, 391-396.
- Shibata, I., Okada, M., Urono, K., Samegai, Y., Ono, M., Sakano, T., Sato, S., 1998. Experimental dual infection of cesarean-derived, colostrum-deprived pigs with *Mycoplasma hyopneumoniae* and pseudorabies virus. *J. Vet. Med. Sci.* 60, 295-300.
- Shibata, I., Yazawa, S., Ono, M., Okuda, Y., 2003. Experimental dual infection of specific pathogen-free pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and pseudorabies virus. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 50, 14-19.
- 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. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 50, 19-27.
- Shimizu, M., Yamada, S., Murakami, Y., Morozumi, T., Kobayashi, H., Mitani, K., Ito, N., Kubo, M., Kimura, K., Kobayashi, M., et al., 1994. Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus from Heko-Heko disease of pigs. *J. Vet. Med. Sci.* 56, 389-391.

- Shin, M.K., Kang, M.L., Cha, S.B., Lee, W.J., Sung, J.H., Yoo, H.S., 2011. An immunosorbent assay based on the recombinant ApxIa, ApxIIa, and ApxIIIa toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its application to field sera. *J. Vet. Diagn. Invest.* 23, 736-742.
- Shin, S.J., Kang, S.G., Nabin, R., Kang, M.L., Yoo, H.S., 2005. Evaluation of the antimicrobial activity of florfenicol against bacteria isolated from bovine and porcine respiratory disease. *Vet. Microbiol.* 106, 73-77.
- Shope, R.E., 1964. Porcine contagious pleuropneumonia. I. Experimental transmission, etiology, and pathology. *J. Exp. Med.* 119, 357-368.
- Silva-Campa, E., Flores-Mendoza, L., Reséndiz, M., Pinelli-Saavedra, A., Mata-Haro, V., Mwangi, W., Hernández, J., 2009. Induction of T helper 3 regulatory cells by dendritic cells infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 387, 373-379.
- Silversides, D.W., Music, N., Jacques, M., Gagnon, C.A., Webby, R., 2010. Investigation of the species origin of the St. Jude Porcine Lung epithelial cell line (SJPL) made available to researchers. *J. Virol.* 84, 5454-5455.
- Sririnarumitr, T., Zhang, Y., Kluge, J.P., Halbur, P.G., Paul, P.S., 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*. *J. Gen. Virol.* 79, 2989-2995.
- Snijder, E.J., Meulenberg, J.J., 1998. The molecular biology of arteriviruses. *J. Gen. Virol.* 79, 961-979.
- Snijder, E.J., van Tol, H., Pedersen, K.W., Raamsman, M.J., de Vries, A.A., 1999. Identification of a novel structural protein of arteriviruses. *J. Virol.* 73, 6335-6345.
- Snijder, E.J., van Tol, H., Roos, N., Pedersen, K.W., 2001. Non-structural proteins 2 and 3 interact to modify host cell membranes during the formation of the arterivirus replication complex. *J. Gen. Virol.* 82, 985-994.

- Snijder, E.J., Wassenaar, A.L., Spaan, W.J., 1994. Proteolytic processing of the replicase ORF1a protein of equine arteritis virus. *J. Virol.* 68, 5755-5764.
- Spilman, M.S., Welbon, C., Nelson, E., Dokland, T., 2009. Cryoelectron tomography of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: organization of the nucleocapsid. *J. Gen. Virol.* 90, 527-535.
- Srikumar, R., Mikael, L.G., Pawelek, P.D., Khamessan, A., Gibbs, B.F., Jacques, M., Coulton, J.W., 2004. Molecular cloning of haemoglobin-binding protein HgbA in the outer membrane of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology* 150, 1723-1734.
- St Michael, F., Brisson, J.R., Larocque, S., Monteiro, M., Li, J., Jacques, M., Perry, M.B., Cox, A.D., 2004. Structural analysis of the lipopolysaccharide derived core oligosaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2, 5a and the genome strain 5b. *Carbohydr. Res.* 339, 1973-1984.
- Stark, G.R., Taylor, W.R., 2006. Control of the G2/M transition. *Mol. Biotechnol.* 32, 227-248.
- Stevenson, A., Macdonald, J., Roberts, M., 2003. Cloning and characterisation of type 4 fimbrial genes from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 92, 121-134.
- Stipkovits, L., Miller, D., Glavits, R., Fodor, L., Burch, D., 2001. Treatment of pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, and *Actinobacillus pleuropneumoniae* with various antibiotics. *Can. J. Vet. Res.* 65, 213-222.
- Suárez, P., Díaz-Guerra, M., Prieto, C., Esteban, M., Castro, J.M., Nieto, A., Ortín, J., 1996. Open reading frame 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as a cause of virus-induced apoptosis. *J. Virol.* 70, 2876-2882.
- Sugai, M., Kawamoto, T., Pérès, S.Y., Ueno, Y., Komatsuzawa, H., Fujiwara, T., Kurihara, H., Suginaka, H., Oswald, E., 1998. The cell cycle-specific growth-inhibitory factor produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is a cytolethal distending toxin. *Infect. Immun.* 66, 5008-5019.



- Sun, Y., Li, D., Giri, S., Prasanth, S.G., Yoo, D., 2014. Differential host cell gene expression and regulation of cell cycle progression by nonstructural protein 11 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Biomed. Res. Int.* 2014, 430508.
- Sur, J.H., Doster, A.R., Christian, J.S., Galeota, J.A., Wills, R.W., Zimmerman, J.J., Osorio, F.A., 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis. *J. Virol.* 71, 9170-9179.
- Sutherland, I., 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147, 3-9.
- Switzer, W.M., García, A.D., Yang, C., Wright, A., Kalish, M.L., Folks, T.M., Heneine, W., 2008. Coinfection with HIV-1 and simian foamy virus in West Central Africans. *J. Infect. Dis.* 197, 1389-1393.
- Tanigawa, M., Sawada, T., 2002. Effects of subminimal inhibitory concentrations of amoxicillin against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 49, 513-518.
- Tarasiuk, K., Pejsak, Z., Hogg, A., Carlson, M.P., 1994. Efficacy of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* bacterin against serotypes 1, 3, 5 and 9. *Can. Vet. J.* 35, 233-238.
- Taylor, D.J., 1999. *Actinobacillus pleuropneumoniae* (p. 343-354), in: Straw, B.E., D'Allaire, S., Megeling, W.I., Taylor, D.J. (Eds.), *Diseases of swine*. Wiley, 1999, Iowa State Press, p. 1209.
- Taylor, R.C., Cullen, S.P., Martin, S.J., 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 9, 231-241.
- Thacker, E.L., Halbur, P.G., Ross, R.F., Thanawongnuwech, R., Thacker, B.J., 1999. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 37, 620-627.

- Thanawongnuwech, R., Brown, G.B., Halbur, P.G., Roth, J.A., Royer, R.L., Thacker, B.J., 2000. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced increase in susceptibility to *Streptococcus suis* infection. *Vet. Pathol.* 37, 143-152.
- Thanawongnuwech, R., Halbur, P.G., Ackermann, M.R., Thacker, E.L., Royer, R.L., 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. *Vet. Pathol.* 35, 398-406.
- Thanawongnuwech, R., Thacker, B., Halbur, P., Thacker, E.L., 2004. Increased production of proinflammatory cytokines following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11, 901-908.
- Thanawongnuwech, R., Young, T.F., Thacker, B.J., Thacker, E.L., 2001. Differential production of proinflammatory cytokines: *in vitro* PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* co-infection model. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 79, 115-127.
- Thiry, É., 2004. [Virologie clinique du porc] (p. 26-36). Collection Virologie Clinique, Édition du point Vétérinaire, France. p. 188.
- Thwaites, R.N., Kadis, S., 1993. Purification of surface-exposed integral outer membrane proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and their role in opsonophagocytosis. *Am. J. Vet. Res.* 54, 1462-1470.
- Tian, K., Yu, X., Zhao, T., Feng, Y., Cao, Z., Wang, C., Hu, Y., Chen, X., Hu, D., Tian, X., Liu, D., Zhang, S., Deng, X., Ding, Y., Yang, L., Zhang, Y., Xiao, H., Qiao, M., Wang, B., Hou, L., Wang, X., Yang, X., Kang, L., Sun, M., Jin, P., Wang, S., Kitamura, Y., Yan, J., Gao, G.F., 2007. Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark. *PLoS One* 2, e526.

- Tobias, T.J., Bouma, A., Klinkenberg, D., Daemen, A.J., Stegeman, J.A., Wagenaar, J.A., Duim, B., 2012. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs by real-time quantitative PCR for the *apxIVA* gene. *Vet. J.* 193, 557-560.
- Tonpitak, W., Thiede, S., Oswald, W., Baltés, N., Gerlach, G.F., 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. *Infect. Immun.* 68, 1164-1170.
- Tremblay, Y.D.N., Hathroubi, S., Jacques, J., 2014. [Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique]. *Can. J. Vet. Res.* 78, 110-116.
- Tremblay, Y.D.N., Lévesque, C., Segers, R.P.A.M., Jacques, M., 2013. Method to grow *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilm on a biotic surface. *BMC Vet. Res.* 9, 213.
- Turni, C., Blackall, P.J., 2007. An evaluation of the *apxIVA* based PCR-REA method for differentiation of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 121, 163-169.
- Ueda, Y., Ohtsuki, S., Narukawa, N., 1995. Efficacy of florfenicol on experimental *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs. *J. Vet. Med. Sci.* 57, 261-265.
- Ueda, Y., Suenaga, I., 1995. *In vitro* antibacterial activity of florfenicol against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Vet. Med. Sci.* 57, 363-364.
- van Breedam, W., Delputte, P.L., van Gorp, H., Misinzo, G., Vanderheijden, N., Duan, X., Nauwynck, H.J., 2010a. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage. *J. Gen. Virol.* 91, 1659-1667.
- van Breedam, W., van Gorp, H., Zhang, J.Q., Crocker, P.R., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J., 2010b. The M/GP(5) glycoprotein complex of porcine reproductive and respiratory syndrome virus binds the sialoadhesin receptor in a sialic acid-dependent manner. *PLoS Pathog.* 6, e1000730.

- 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 der Linden, I.F., van der Linde-Bril, E.M., Voermans, J.J., van Rijn, P.A., Pol, J.M., Martin, R., Steverink, P.J., 2003. Oral transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by muscle of experimentally infected pigs. *Vet. Microbiol.* 97, 45-54.
- van Gorp, H., van Breedam, W., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J., 2008. Sialoadhesin and CD163 join forces during entry of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 89, 2943-2953.
- van Gorp, H., van Breedam, W., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J., 2009. The porcine reproductive and respiratory syndrome virus requires trafficking through CD163-positive early endosomes, but not late endosomes, for productive infection. *Arch. Virol.* 154, 1939-1943.
- van Gorp, H., van Breedam, W., van Doorselaere, J., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J., 2010. Identification of the CD163 protein domains involved in infection of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Virol.* 84, 3101-3105.
- van Nieuwstadt, A.P., Meulenberg, J.J., van Essen-Zanbergen, A., Petersen-den Besten, A., Bende, R.J., Moormann, R.J., 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. *J. Virol.* 70, 4767-4772.
- 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. *Vet. Microbiol.* 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. *Res. Vet. Sci.* 67, 47-52.

- van Reeth, K., Nauwynck, H., 2000. Proinflammatory cytokines and viral respiratory disease in pigs. *Vet. Res.* 31, 187-213.
- van Reeth, K., Nauwynck, H., Pensaert, M., 1996. Dual infections of feeder pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by porcine respiratory coronavirus or swine influenza virus: a clinical and virological study. *Vet. Microbiol.* 48, 325-335.
- van Reeth, K., Pensaert, M.B., 1994. Porcine respiratory coronavirus-mediated interference against influenza virus replication in the respiratory tract of feeder pigs. *Am. J. Vet. Res.* 55, 1275-1281.
- Vanderheijden, N., Delputte, P.L., Favoreel, H.W., vandekerckhove, J., van Damme, J., van Woensel, P.A., Nauwynck, H.J., 2003. Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages. *J. Virol.* 77, 8207-8215.
- Vanhee, M., Delputte, P.L., Delrue, I., Geldhof, M.F., Nauwynck, H.J., 2009. Development of an experimental inactivated PRRSV vaccine that induces virus-neutralizing antibodies. *Vet. Res.* 40, 63.
- Vanni, M., Merenda, M., Barigazzi, G., Garbarino, C., Luppi, A., Tognetti, R., Intorre, L., 2012. Antimicrobial resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from swine. *Vet. Microbiol.* 156, 172-177.
- Vashisht, K., Goldberg, T.L., Husmann, R.J., Schnitzlein, W., Zuckermann, F.A., 2008. Identification of immunodominant T-cell epitopes present in glycoprotein 5 of the North American genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* 26, 4747-4753.
- Verheije, M.H., Welting, T.J., Jansen, H.T., Rottier, P.J., Meulenberg, J.J., 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.

- Wallgren, P., Segall, T., Pedersen Morner, A., Gunnarsson, A., 1999a. Experimental infections with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs--I. Comparison of five different parenteral antibiotic treatments. Zentralbl. Veterinarmed B 46, 249-260.
- Wallgren, P., Segall, T., Pedersen Morner, A., Gunnarsson, A., 1999b. Experimental infections with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs--II. Comparison of antibiotics for oral strategic treatment. Zentralbl. Veterinarmed B 46, 261-269.
- Wang, C., Wang, Y., Shao, M., Si, W., Liu, H., Chang, Y., Peng, W., Kong, X., Liu, S., 2009. Positive role for rApxIVN in the immune protection of pigs against infection by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Vaccine 27, 5816-5821.
- Wang, X., Eaton, M., Mayer, M., Li, H., He, D., Nelson, E., Christopher-Hennings, J., 2007. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus productively infects monocyte-derived dendritic cells and compromises their antigen-presenting ability. Arch. Virol. 152, 289-303.
- Ward, C.K., Inzana, T.J., 1994. Resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to bactericidal antibody and complement is mediated by capsular polysaccharide and blocking antibody specific for lipopolysaccharide. J. Immunol. 153, 2110-2121.
- Wasilk, A., Callahan, J.D., Christopher-Hennings, J., Gay, T.A., Fang, Y., Dammen, M., Reos, M.E., Torremorell, M., Polson, D., Mellencamp, M., Nelson, E., Nelson, W.M., 2004. Detection of U.S., Lelystad, and European-like porcine reproductive and respiratory syndrome viruses and relative quantitation in boar semen and serum samples by real-time PCR. J. Clin. Microbiol. 42, 4453-4461.
- Wasteson, Y., Roe, D.E., Falk, K., Roberts, M.C., 1996. Characterization of tetracycline and erythromycin resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Vet. Microbiol. 48, 41-50.
- Webel, D.M., Finck, B.N., Baker, D.H., Johnson, R.W., 1997. Time course of increased plasma cytokines, cortisol, and urea nitrogen in pigs following intraperitoneal injection of lipopolysaccharide. J. Anim. Sci. 75, 1514-1520.

- Webel, D.M., Finck, B.N., Baker, D.H., and Johnson, R.W., 1997. Time course of increased plasma cytokines, cortisol, and urea nitrogen in pigs following intraperitoneal injection of lipopolysaccharide. *J. Anim. Sci.* 75, 1514-1520.
- Wensvoort, G., 1993. Lelystad virus and the porcine epidemic abortion and respiratory syndrome. *Vet. Res.* 24, 117-124.
- Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J.M., ter Laak, E.A., Bloemraad, M., de Kluyver, E.P., Kragten, C., van Buiten, L., den Besten, A., Wagenaar, F., Broekhuijsen, J.M., Moonen, M.P.L.J., Zetstra, T., de Boer, E.A., Tibben, H.J., de Jong, M.F., van 't Veld, P., Greenland, G.J.R., van Gennep, J.A., Voets, M.T., Verheijden, J.H.M., Braamskamp, J., 1991. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet. Q.* 13, 121-130.
- Wernike, K., Bonilauri, P., Dauber, M., Errington, J., LeBlanc, N., Revilla-Fernández, S., Hjulsager, C., Isaksson, M., Stadejek, T., Beer, M., Hoffmann, B., 2012. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: interlaboratory ring trial to evaluate real-time reverse transcription polymerase chain reaction detection methods. *J. Vet. Diagn. Invest.* 24, 855-866.
- Wiles, S., Bishop, A.L., 2013. Biostat decision tree. figshare <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.95778>.
- Wilke, M., Franz, B., Gerlach, G.F., 1997. Characterization of a large transferrin-binding protein from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7. *Zentralbl. Veterinarmed B* 44, 73-86.
- Wilson, H.E., Saslaw, S., Doan, C.A., Woolpert, O.C., Schwab, J.L., 1947. Reactions of monkeys to experimental mixed Influenza and *Streptococcus* infections : an analysis of the relative roles of humoral and cellular immunity, with the description of an intercurrent nephritic syndrome. *J. Exp. Med.* 85, 199-215.

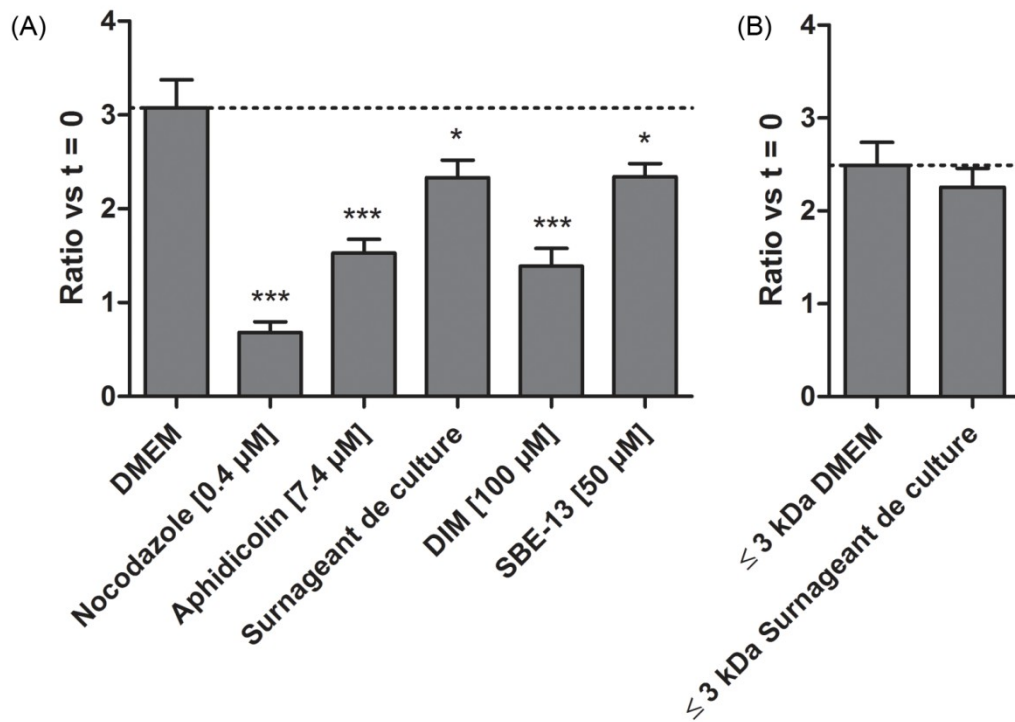
- Wissink, E.H., Kroese, M.V., van Wijk, H.A., Rijsewijk, F.A., Meulenber, J.J., Rottier, P.J., 2005. Envelope protein requirements for the assembly of infectious virions of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Virol.* 79, 12495-12506.
- Wootton, S.K., Nelson, E.A., Yoo, D., 1998. Antigenic structure of the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5, 773-779.
- Wootton, S.K., Yoo, D., 2003. Homo-oligomerization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein and the role of disulfide linkages. *J. Virol.* 77, 4546-4557.
- Wu, C., Labrie, J., Tremblay, Y.D., Haine, D., Mourez, M., Jacques, M., 2013. Zinc as an agent for the prevention of biofilm formation by pathogenic bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 115, 30-40.
- Wu, C.M., Chen, Z.W., Chen, T.H., Liao, J.W., Lin, C.C., Chien, M.S., Lee, W.C., Hsuan, S.L., 2011. Mitogen-activated protein kinases p38 and JNK mediate *Actinobacillus pleuropneumoniae* exotoxin ApxI-induced apoptosis in porcine alveolar macrophages. *Vet. Microbiol.* 151, 372-378.
- Wu, J., Li, J., Tian, F., Ren, S., Yu, M., Chen, J., Lan, Z., Zhang, X., Yoo, D., Wang, J., 2009. Genetic variation and pathogenicity of highly virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerging in China. *Arch. Virol.* 154, 1589-1597.
- Wu, W.H., Fang, Y., Farwell, R., Steffen-Bien, M., Rowland, R.R., Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., 2001. A 10-kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF2b. *Virology* 287, 183-191.
- Xu, M., Wang, S., Li, L., Lei, L., Liu, Y., Shi, W., Wu, J., Li, L., Rong, F., Xu, M., Sun, G., Xiang, H., Cai, X., 2010. Secondary infection with *Streptococcus suis* serotype 7 increases the virulence of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs. *Virol. J.* 7, 184.



- Yagihashi, T., Nunoya, T., Mitui, T., Tajima, M., 1984. Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection on the development of *Haemophilus pleuropneumoniae* pneumonia in pigs. J. Vet. Med. Sci. 46, 705-713.
- Yang, K., Li, Y., Duan, Z., Guo, R., Liu, Z., Zhou, D., Yuan, F., Tian, Y., 2013. A one-step RT-PCR assay to detect and discriminate porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in clinical specimens. Gene 531, 199-204.
- Yang, M., Xiang, Q., Zhang, X., Li, X., Sylla, S., Ding, Z., 2014. RNA interference targeting nucleocapsid protein inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in Marc-145 cells. J. Microbiol. 52, 333-339.
- Yoon, K.J., Wu, L.L., Zimmerman, J.J., Platt, K.B., 1997. Field isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vary in their susceptibility to antibody dependent enhancement (ADE) of infection. Vet. Microbiol. 55, 277-287.
- Yoon, K.J., Zimmerman, J.J., Chang, C.C., Cancel-Tirado, S., Harmon, K.M., McGinley, M.J., 1999. Effect of challenge dose and route on porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in young swine. Vet. Res. 30, 629-638.
- Yoon, K.J., Zimmerman, J.J., Swenson, S.L., McGinley, M.J., Eernisse, K.A., Brevik, A., Rhinehart, L.L., Frey, M.L., Hill, H.T., Platt, K.B., 1995. Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. J. Vet. Diagn. Invest. 7, 305-312.
- Yoshimura, H., Takagi, M., Ishimura, M., Endoh, Y.S., 2002. Comparative *in vitro* activity of 16 antimicrobial agents against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Vet. Res. Commun. 26, 11-19.
- Young, B., Dewey, C., Poljak, Z., Rosendal, T., Carman, S., 2010. Clinical signs and their association with herd demographics and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) control strategies in PRRS PCR-positive swine herds in Ontario. Can. J. Vet. Res. 74, 170-177.

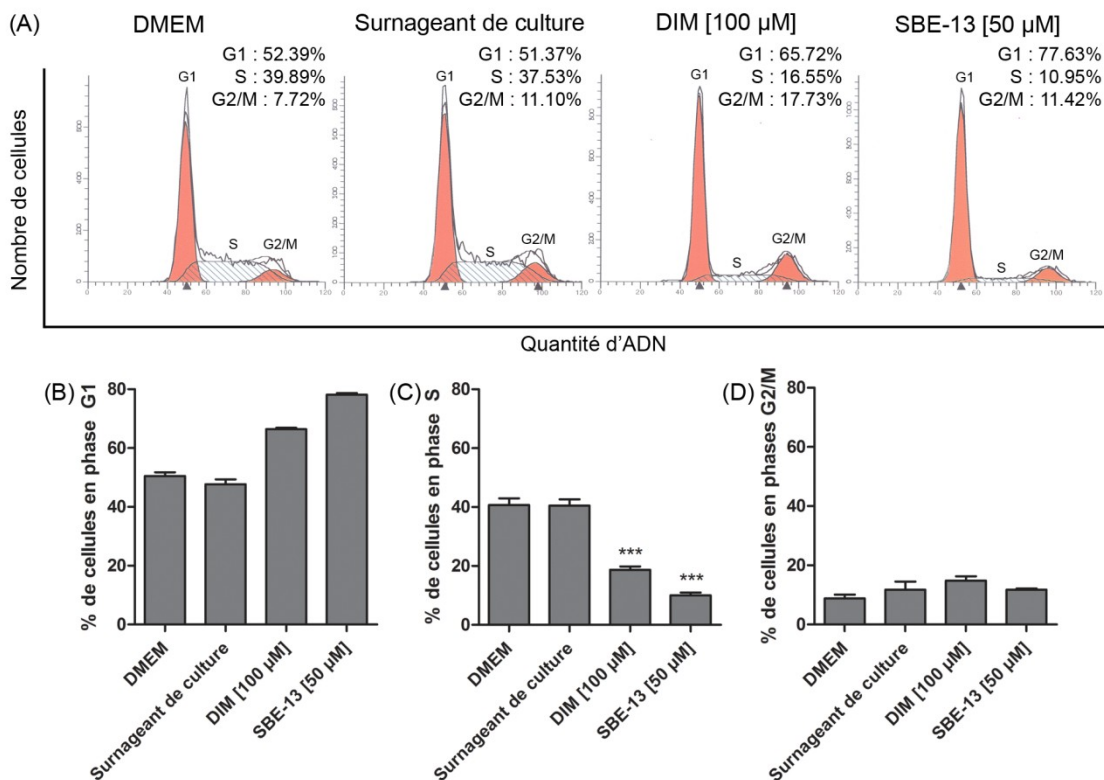
- Yuan, S., Murtaugh, M.P., Faaberg, K.S., 2000. Heteroclitite subgenomic RNAs are produced in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Virology* 275, 158-169.
- Yun, S.I., Lee, Y.M., 2013. Overview: Replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Microbiol.* 51, 711-723.
- Zhang, Y., Tennent, J.M., Ingham, A., Beddome, G., Prideaux, C., Michalski, W.P., 2000. Identification of type 4 fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 189, 15-18.

## **ANNEXES**



Annexe 1. Analyse de l'impact de différents traitements sur la prolifération cellulaire des cellules MARC-145.

Utilisation de comptages cellulaires comme indice de la prolifération, un ratio est alors fait par rapport aux comptages cellulaires après traitement. Des comptages cellulaires ont été effectués avant et après traitements. (A) Cellules traitées avec le nocodazole (connu pour induire l'apoptose), l'aphidicoline, le surnageant de culture d'*AppΔapxICΔapxIIC*, la DIM ou le SBE-13. (B) Cellules traitées avec l'ultrafiltrat  $\leq 3$  kDa du surnageant de culture d'*AppΔapxICΔapxIIC* ou du DMEM. Les astérisques indiquent des différences significatives entre les cellules non traitées (DMEM) et les cellules traitées.  $n \geq 2$ , \*\*\* $P \leq 0.0001$ , les valeurs sont présentées avec un écart-type des moyennes (SEM).



## Annexe 2. Modulation du cycle cellulaire des cellules MARC-145 par la DIM et le SBE-13.

(A) Histogrammes des l'analyses de cycles cellulaires; DMEM et surnageant de culture comme contrôles et comparés avec DIM et SBE-13. (B) Pourcentage de cellules en phase G1. (C) Pourcentage de cellules en phase S. (D) Pourcentage de cellules en phases G2/M. Les astérisques indiquent des différences significatives entre les cellules non traitées (DMEM) et les cellules traitées.  $n \geq 2$ ,  $***P \leq 0.0001$ , les valeurs sont présentées avec un écart-type des moyennes (SEM).

