

Université du Québec  
**INRS-Institut Armand-Frappier**

**Immunobiologie des protéines recombinantes P46, P65 et P97  
de *Mycoplasma hyopneumoniae***

PAR

**KANE CHEIKH SAAD BOUH**

**Thèse présentée pour l'obtention du grade de  
Philosophiae doctor (Ph.D) en virologie-immunologie**

**Jury d'évaluation**

Président du jury et membre interne	<b>Dr. Claude Daniel</b> INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	<b>Dr. Marcelo Gottschalk</b> Université de Montréal
Examineur externe	<b>Dr. Josée Harel</b> Université de Montréal
Directeur de recherche	<b>Dr. Serge Dea</b> INRS-Institut Armand-Frappier
Co-directeur de recherche	<b>Dr. François Shareck</b> INRS-Institut Armand-Frappier

©droits réservés de Kane Cheikh Saad Bouh, 2004.

**À mon Feu Père  
In memoriam**

**À ma Feue Grand-mère  
In memoriam**

**À ma mère  
Pour son soutien et son amour sans égal**

**À mon oncle et homonyme  
Pour son soutien durant toutes ses années**

**À ma tendre épouse Atou  
Pour son amour et sa compréhension**

**À mes frères et sœurs  
Pour leur amour**

**À mes parents et amis  
En souvenir des agréables moments**

**À tous ceux ou celles qui m'ont aimé et soutenu**

**Que ce travail symbolise l'expression de ma profonde gratitude**



## TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	II
LISTE DES TABLEAUX.....	V
LISTE DES FIGURES.....	VI
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	VIII
SOMMAIRE.....	IX
INTRODUCTION.....	1
<b>SECTION I</b>	
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
1. LE GENRE <i>MYCOPLASMA</i> .....	6
1.1 Généralités et structure.....	6
1.2 Pathologies à mycoplasmes chez l'Homme.....	8
1.3 Relation <i>Mycoplasma</i> -système immunitaire de l'hôte.....	10
2. LES DIFFÉRENTES ESPÈCES DE MYCOPLASMES PORCINS.....	11
3. <i>MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE</i> .....	13
3.1 Généralités.....	13
3.2 Taxonomie.....	13
3.3 Génome.....	16
3.4 Facteurs de virulence.....	17
3.4.1 L'adhésine P97.....	17
3.4.2 La protéine membranaire P46 .....	18
3.4.3 La protéine membranaire P65.....	18
3.4.4 La protéine membranaire P74.....	19
3.4.5 La protéine membranaire P54.....	19
3.4.6 La protéine cytosolique P36.....	19
3.4.7 Autres protéines.....	20
3.5 Pathogénie de l'infection à <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .....	20
3.5.1 Signes cliniques et lésions.....	20

3.5.2 Réponse immunitaire.....	22
3.5.2.1 Réponse humorale.....	22
3.5.2.2 Réponse cellulaire.....	23
3.6 Diagnostic de l'infection.....	24
3.6.1 Diagnostic immunohistochimique.....	24
3.6.2 Diagnostic sérologique.....	24
3.6.3 Diagnostic moléculaire.....	25
3.7 Antibiothérapie.....	26
4. Vaccination	
4.1 Généralités.....	27
4.2 Adjuvants.....	31
4.3 Vaccins contre <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .....	33
4.3.1 Vaccins conventionnels.....	33
4.3.2 Vaccins expérimentaux.....	34
<b>SECTION II</b>	
PUBLICATIONS.....	37
Publication 1. Monoclonal Antibodies to <i>Escherichia coli</i> -Expressed P46 and P65 Membranous Proteins for Specific Immunodetection of <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> in Lungs of Infected Pigs .....	38
Publication 2. Kinetics of the immune response in pigs to individual <i>E. coli</i> -expressed and authentic P46, P65 and P97 membrane-anchored proteins of <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .....	69
Publication 3. Immunization of pigs with P46, P65 and P97 <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> recombinant proteins and study of their potential as sub-unit vaccines .....	92
<b>SECTION III</b> .....	123
DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION.....	124
PERSPECTIVES.....	135
REMERCIEMENTS.....	137

BIBLIOGRAPHIE.....	138
ANNEXES.....	171
Annexe A. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	172
Annexe B. CLONAGE DU GÈNE P65 MUTÉ DANS pVAX1.....	175
Annexe C. CLONAGE ET EXPRESSION DES PROTÉINES RECOMBINANTES P97 <sub>N</sub> ET P97 <sub>C</sub> .....	179
Annexe D. PRODUCTION ET RÉACTIVITÉ DES ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI- P97 et P97 <sub>C</sub> .....	182

## LISTE DES TABLEAUX

### REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>Tableau 1</b>	Récapitulatif des grandes propriétés des trois ordres affectant les animaux.....	15
<b>Tableau 2</b>	Récapitulatif de la taille du génome et le pourcentage de G + C de <i>M. hyopneumoniae</i> et d'autres mycoplasmes dont le génome a été séquencé.....	16

### PUBLICATIONS

#### Publication 1

<b>Table 1</b>	: Les séquences des amorces de mutagenèse.....	63
<b>Table 2</b>	: Absorbance values ( $A_{450}$ ) of serum (dilution 1:8000) from pigs immunized by injection of individual or mixed P46 or P65 <sub>c</sub> recombinant proteins determined by ELISA using either recombinant protein as antigen.....	64

#### Publication 3

<b>Table 1</b>	: Primers for P46, P65 and P97 mutagenesis.....	115
<b>Table 2</b>	: Percentage of surface lesions compared to apparent non affected lung tissues.....	116

## LISTE DES FIGURES

## REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

**Figure 1.** Biosynthèse de la protéine P97.....17

## PUBLICATION 1.

**Figure 1** PCR amplification of the ORF encoding the P46 and P65 membranous proteins of *M. hyopneumoniae* (strain ATCC 25934).....65

**Figure 2** Expression of recombinant P46 and P65c and Western blotting patterns of specific monoclonal antibodies.....66

**Figure 3** Immunofluorescent staining by anti-P46 (A) and anti- P65<sub>c</sub> (B) MAbs of frozen sections of lungs from experimentally-infected pigs.....67

**Figure 4** Histological and immunohistochemical findings as observed in the lungs of experimentally-infected SPF-pigs.....68

## PUBLICATION 2

**Figure 1.** Macroscopic observation of infected and non-infected pigs Lungs.....86

**Figures.2.** Western blot analysis of infected pigs ( fig.2-A: pig#39; fig. 2-B: pig#40) sera by using the *M. hyopneumoniae* whole cell as antigenic preparation. The figures illustrate the kinetic of humoral response against P46, P65 and P97 proteins.....87

**Figure 3** Expression of recombinant P46 , P65 and P97 fusion proteins in *E. coli*.....88

**Figure 4 .** Kinetic of humoral response by ELISA of infected pigs # 39 (Fig. 4A) and # 40 (Fig. 4B) sera using P46, P65 and P97 recombinant proteins as antigens.....89

**Figure 5.** Kinetic of antibody response of pig # 39 and pig # 40 by Dako blocking ELISA.....90



**Figure 6** Western blot of hyperimmunized pigs sera by using *M. hyopneumoniae* as antigenic preparation. The reactivity has been followed for 37 days and the pigs were divided in 4 groups of 3 and 1 group of one pig.....91

### **PUBLICATION 3**

**Figure 1.** Kinetic of humoral response of P46, P65, P97 immunized pigs by ELISA using homologous recombinant proteins as antigens.....117

**Figure 2.** Ex vivo blastogenic response of porcine PBMCs following incubation in the presence of different concentrations of concanavalin A (conA) at day 37 post-immunization (Challenge-day).....118

**Figure 3.** Macroscopic observation of experimental pigs lungs.....119

**Figure 4.** Histological sections of lungs of control (A and D), infected pigs (B and E) and vaccinated pigs (C and F).....120

**Figure 5** Flow-cytometric profile of bronchoalveolar lavage (BAL) cells.....121

**Figure 6.** Gelatinolytic activity in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of experimental pigs, as determined by zymography analysis.....122

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>AcMo</b>	<b>anticorps monoclonal</b>
<b>ADN</b>	<b>acide desoxyribonucléique</b>
<b>ARN</b>	<b>acide ribonucléique</b>
<b>ARNm</b>	<b>ARN messenger</b>
<b>ATP</b>	<b>adénosine 5'-triphosphate</b>
<b>β-gal</b>	<b>β-galactosidase</b>
<b>BSA</b>	<b>albumine sérique bovine</b>
<b>DAB</b>	<b>3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride</b>
<b>DMEM</b>	<b>milieu Eagle modifié par Dulbecco</b>
<b>DMSO</b>	<b>diméthyl sulfoxyde</b>
<b>E. coli</b>	<b><i>Escherichia coli</i></b>
<b>ELISA</b>	<b>enzyme-linked immunosorbent assay</b>
<b>EtBr</b>	<b>bromure d'éthidium</b>
<b>FBS</b>	<b>sérum bovin foetal</b>
<b>HRP</b>	<b>péroxydase de raifort</b>
<b>IFI</b>	<b>immunofluorescence indirecte</b>
<b>IFN</b>	<b>interféron</b>
<b>IL</b>	<b>interleukine</b>
<b>IP</b>	<b>immunoperoxydase</b>
<b>IPTG</b>	<b>isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside</b>
<b>Kb</b>	<b>kilobases</b>
<b>kDa</b>	<b>kilodalton</b>
<b>LBA</b>	<b>lavage broncho-alvéolaire</b>
<b>Mab</b>	<b>anticorps monoclonal</b>
<b>MMPs</b>	<b>métalloprotéinases de la matrice</b>
<b>MWM</b>	<b>masse moléculaire</b>
<b>NK</b>	<b>cellules tueuses naturelles</b>
<b>ORF</b>	<b>cadre de lecture ouvert</b>
<b>pb</b>	<b>Paire de bases</b>
<b>PBS</b>	<b>solution saline tamponnée au phosphate</b>
<b>PCR</b>	<b>réaction de polymérisation en chaîne</b>
<b>PEG</b>	<b>polyéthylène-glycol</b>
<b>SDS</b>	<b>dodécylsulfate de sodium</b>
<b>SDS-PAGE</b>	<b>électrophorèse en gel de polyacrylamide avec sodium dodecyl sulfate</b>

## SOMMAIRE

*Mycoplasma hyopneumoniae* est l'agent causal de la pneumonie enzootique porcine qui affecte les porcs de tous âges. Cette pathologie est responsable de pertes économiques considérables à l'industrie porcine. Ces pertes sont dues, au retard de croissance, aux coûts de la prophylaxie préventive et à l'installation des infections secondaires.

Les mycoplasmes sont des bactéries sans paroi, par conséquent la plupart des antibiotiques utilisés en milieu vétérinaire sont inefficaces. *Mycoplasma hyopneumoniae* a une parenté antigénique avec d'autres espèces de mycoplasmes porcins comme *M. hyorhinitis*, *M. hyosynoviae* et *M. flocculare*. Cette communauté antigénique est responsable de beaucoup de réactions croisées, et en définitive des problèmes dans le diagnostic sérologique. Le diagnostic de cette infection est essentiellement immunohistochimique et sérologique. En effet, ces différents tests utilisent plus particulièrement les anticorps polyclonaux occasionnant un manque de spécificité et de sensibilité. La plupart des vaccins actuels contre *M. hyopneumoniae* sont des bactérines et ils n'empêchent pas l'infection de s'installer. La prophylaxie préventive et curative contre cette infection, est confrontée aux problèmes de l'antibiothérapie, du diagnostic et de la vaccination inefficace.

Mon projet avait pour but d'étudier l'immunobiologie des protéines recombinantes P46, P65 et P97 de *M. hyopneumoniae*. Pour ce faire, nous avons exprimé les protéines recombinantes P46, P65 et P97 chez *Escherichia coli* et étudié leurs applications dans le diagnostic des infections à *M. hyopneumoniae*. Deuxièmement, nous avons évalué le potentiel vaccinal des protéines recombinantes chez le porc.

Pour atteindre le premier objectif nous avons muté les codons TGA des gènes P46 (3), P65 (1) et P97 (4) en TGG et les produits mutés ont été clonés dans un vecteur procaryotique pGEX-4T1. Les protéines recombinantes totales ou tronquées, P46, P65, P65<sub>c</sub>, P97, P97<sub>c</sub> et P97<sub>N</sub> ont été exprimées en fusion avec la glutathione-S-transférase (GST). Des anticorps monoclonaux (AcMos) ont été produits contre les protéines recombinantes P46 et P65<sub>c</sub> après immunisation des souris BALB/c. Ces AcMos sont spécifiques à *M. hyopneumoniae* et réagissent aussi bien contre les protéines recombinantes que natives. La détection spécifique de *M. hyopneumoniae* dans les

poumons de porcs infectés a été effectuée à l'aide de ces AcMos par des tests d'immunofluorescence indirecte (IFI) et d'immunoperoxydase. Les protéines recombinantes P46 et P97 sont très fortement antigéniques, alors que la P65 recombinante est très faiblement antigénique.

Concernant le deuxième objectif, nous avons en premier lieu vérifié la cinétique d'apparition des anticorps contre ces protéines à la suite d'une infection par *M. hyopneumoniae* ou lors d'hyperimmunisation. Les résultats ont démontré que la chronologie de détection semble être, P46, P74 et P97 et enfin P65. Le potentiel vaccinal a été étudié en évaluant la protection conférée par une immunisation des porcelets avec les protéines, et en leur faisant subir une infection défi avec une souche virulente de *M. hyopneumoniae*. L'observation macroscopique des poumons de porcs vaccinés à la nécropsie trois semaines post-infection défi, montre une réduction très importante des lésions comparée à celles des poumons des porcs non vaccinés.

En conclusion, les protéines recombinantes ont été exprimées et les AcMos permettent une détection spécifique de *M. hyopneumoniae* par immunohistochimie. La P46 semble être un bon candidat comme antigène dans un test de diagnostic sérologique. Les protéines recombinantes protègent les porcs des lésions causées par *M. hyopneumoniae* et elles seraient de bons candidats pour un vaccin sous-unitaire.



Étudiant : Kane Cheikh Saad Bouh



Co-directeur de recherche :  
Dr. François Shareck

## **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

*M. hyopneumoniae* est l'agent étiologique de la pneumonie enzootique porcine, cette pathologie atteint généralement les porcs de tous âges avec un haut taux de morbidité et un faible taux de mortalité (Ross, 1973; Falk *et al.*, 1991; Ross, 1992; Maes *et al.*, 1996). Les premiers signes cliniques de la pneumonie enzootique porcine apparaissent habituellement après une période d'incubation de deux semaines (Ross, 1992; Sorensen *et al.*, 1997). La pneumonie causée par *M. hyopneumoniae* est de type bronchopneumonie catharrale et les lésions sont généralement localisées au niveau des lobes cardiaques et apicaux ainsi que dans la partie crâniale du lobe caudal du poumon (Kobisch et Friis, 1996). L'absence de paroi cellulaire rigide rend les mycoplasmes résistants aux antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactames, comme la pénicilline et ses analogues, et ils sont généralement résistants aux polymyxines, la rifampine et aux sulfonamides (Maes *et al.*, 1996).

La maladie est responsable de pertes économiques considérables pour l'industrie porcine. Aux Etats-Unis seulement, les pertes sont évaluées à plus de \$200 millions par année. Ces pertes sont dues, en particulier, au retard de croissance, à la complication par d'autres agents infectieux et aux coûts de la prophylaxie préventive (Yagihashi *et al.*, 1993; Blanchard et Kobisch, 1995; Van Alstine *et al.*, 1996). L'infection se transmet par aérosol, d'où sa dispersion rapide à l'ensemble des animaux du troupeau (Murphy *et al.*, 1993). Le génome de *M. hyopneumoniae* est de très petite taille (1100 kpb) avec un ADN circulaire double brin contenant un faible pourcentage de G + C (28%) (Maes *et al.*, 1996). Une particularité très importante chez certains gènes de *M. hyopneumoniae* est le fait que le codon TGA est traduit en tryptophane alors que c'est un codon d'arrêt universel (Dybvig et Voelker, 1996). D'où la nécessité pour exprimer des protéines recombinantes, de muter ces codons TGA.

Le diagnostic est essentiellement immunohistochimique et sérologique, plus particulièrement l'immunofluorescence indirecte et l'ELISA. Mais ces différents tests sont confrontés à des problèmes de sensibilité et de spécificité dus à l'utilisation d'anticorps polyclonaux (Freeman *et al.*, 1984a). Beaucoup de réactions croisées sont

observées lors du diagnostic sérologique, dues à la complexité étiologique de l'infection et l'existence d'une parenté antigénique entre *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* et *M. hyopneumoniae* (Freeman *et al.*, 1984a; Young et Ross, 1987; Scarman *et al.*, 1997). D'autre part, ces épreuves mettent en évidence dans le sérum sans distinction, des anticorps d'origine infectieuse, maternelle et vaccinale. Néanmoins, les techniques de diagnostic basées sur la détection d'anticorps contre les protéines immunodominantes de *M. hyopneumoniae* demeurent indispensables dans l'établissement des programmes d'épidémio-surveillance de la maladie.

Plusieurs protéines immunodominantes ont été identifiées chez *M. hyopneumoniae*, parmi ces protéines certaines sont réputées être impliquées dans les premières phases de l'infection, d'autres dans la réponse immune contre cet agent (Scarman *et al.*, 1997). Il s'agit notamment de la protéine cytosolique P36 qui est très immunogène et conservée entre les différentes souches de *M. hyopneumoniae* (Strasser *et al.*, 1991); les protéines membranaires P46, P65 et P74 qui sont impliquées dans la réponse immune spécifique (Kim *et al.*, 1990; Feld *et al.*, 1992; Futo *et al.*, 1995a); un facteur cytopathique P54 dont le rôle dans la pathogénicité n'est pas encore défini (Geary et Walczak, 1985); différentes adhésines comme la P97, la Mhp1 et la P110 et c'est essentiellement la P97 qui est à ce jour identifiée comme agent d'attachement aux cellules cibles (Zhang *et al.*, 1995; King *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998); et une protéine de choc thermique la Hsp 60 (Chou *et al.*, 1997).

La plupart des vaccins utilisés actuellement contre les infections à *M. hyopneumoniae* sont à base de cellules entières tuées (bactérines). Ces préparations sont administrées en les complexant avec un adjuvant. Elles ont démontré une capacité de protection partielle contre le développement de lésions pulmonaires dans des infections expérimentales; cependant, les porcs vaccinés ne semblent pas être protégés contre une infection naturelle (Kristensen *et al.*, 1981). Considérant les problèmes associés à la prophylaxie préventive et curative, par l'inefficacité de l'antibiothérapie et la protection mitigée induite par les vaccins actuels, il serait important d'explorer de nouvelles avenues afin de développer de nouveaux vaccins. Des recherches supplémentaires sont nécessaires en vue du

développement et l'évaluation de vaccins contre la pneumonie enzootique porcine. Entre autres, des études portant sur le clonage et la production des protéines recombinantes de *M. hyopneumoniae*, sur la variabilité antigénique et génétique de ces protéines immunodominantes seraient nécessaires. L'étude du potentiel vaccinal de ces protéines recombinantes est un pré-requis indispensable au développement de vaccins sous-unitaires efficaces.

La parenté antigénique existant entre *M. hyopneumoniae* et d'autres espèces de mycoplasmes serait à l'origine des problèmes associés aux réactions croisées lors du diagnostic. D'autre part, la protection mitigée conférée par les vaccins existants complique davantage la prophylaxie préventive. Il est judicieux d'explorer d'autres avenues dans la lutte contre cette mycoplasmosse porcine.

Durant cette étude, nous avons ciblé les protéines P46, P65 et P97 de *M. hyopneumoniae*, du fait que ce sont des protéines immunodominantes et qu'elles semblent jouer un rôle important dans la pathogénie de l'infection. Pour ce faire, les codons TGA contenus dans les gènes P46 (3), P65 (1) et P97 (4) ont été mutés en TGG par PCR de chevauchement. Des anticorps monoclonaux ont été produits et leur utilisation potentielle dans le diagnostic des infections à *M. hyopneumoniae* a été étudiée. Suite à cela l'immunogénicité de ces protéines chez le porc et le suivi de la cinétique d'apparition des différents anticorps ont été analysés. De même, nous avons évalué la candidature potentielle de l'une ou des protéines comme antigène(s) dans un test de diagnostic sérologique. Finalement, nous avons étudié le potentiel vaccinal sous-unitaire des différentes protéines recombinantes chez le porc.

Cette thèse est divisée en trois sections :

section I qui traite de la revue bibliographique

section II qui contient les trois publications discutées dans cette thèse

section III qui comprend la discussion générale, les conclusions et les perspectives



**SECTION I**  
**REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1. LE GENRE *MYCOPLASMA*

### 1.1 Généralités et structure

Les mycoplasmes sont les plus petits microorganismes à réplication autonome avec de très petits génomes de 580 à 2220 kpb et ils appartiennent à la classe des mollicutes (*mollis* : mou; *cutis* : peau). Parmi leurs propriétés, on peut citer un petit nombre d'opérons pour l'ARN<sub>r</sub> et des gènes de l'ARN<sub>t</sub>, et des activités métaboliques limitées (Bove, 1993). La petite taille de leur génome fait que les mycoplasmes n'utilisent que certaines voies enzymatiques pour le métabolisme cellulaire. À titre d'exemples, ils manquent d'enzymes initiant la production de la paroi ou celles nécessaires à la synthèse *de novo* des acides puriques et pyrimidiques (Baseman et Tully, 1997). De plus, ils ne possèdent pas de cycle TCA (Tricarboxylic Acid Cycle) fonctionnel et de cytochromes (Dybvig et Voelker, 1996). Les mycoplasmes sont des bactéries anaérobies facultatives qui ont un système de transport d'électrons dont la cascade se termine par une flavine tronquée et qui n'implique pas de quinones et de cytochromes (Dybvig et Voelker, 1996).

Leur ADN a un contenu extrêmement faible en cytosine et guanine, soit de 23 à 41%. La plupart des mycoplasmes ont un pourcentage en G+C inférieur à 30% et seulement *M. pneumoniae* a un contenu G+C pouvant atteindre 41%. Les mycoplasmes sont des organismes sans paroi cellulaire, nécessitant le cholestérol pour leur croissance. De plus, les gènes contiennent des codons TGA (normalement un codon d'arrêt) pour l'incorporation du tryptophane dans les protéines et cela dix fois plus souvent que le TGG (Bove, 1993; Baseman et Tully, 1997). Le pourcentage élevé d'adénine et de thymine dans l'ADN des mycoplasmes expliquerait cette plus grande utilisation du TGA comparé au TGG (Dybvig, 1990).

L'absence de paroi rigide et le manque de coordination entre la réplication génomique et la division cellulaire sont à l'origine de leur pléïomorphie (Razin *et al.*, 1984a; Razin, 1985). Seule la membrane plasmique joue le rôle dans les interactions physiques et les

fonctions de transport (Bove, 1993). La membrane est typique des membranes plasmiques des autres bactéries, elle est composée de phospholipides, de stérols, de glycolipides, de lipoglycans et de protéines, surtout des lipoprotéines. En effet chez les bactéries Gram négatives qui sont entourées de deux membranes, le système de transport impliqué dans l'attachement des protéines est situé au niveau du périplasme. À ce jour ce système n'a pas été mis en évidence chez les mollicutes (Bove, 1993). Le manque de paroi rigide expose les mycoplasmes aux changements environnementaux, plus particulièrement aux changements osmotiques (Razin, 1985; Bove, 1993), à la lyse par les détergents, les alcools, les anticorps spécifiques et le complément (Marshall *et al.*, 1995). Les mycoplasmes sont résistants à l'action de certaines familles d'antibiotiques comme les  $\beta$ -lactames qui agissent au niveau de la synthèse de la paroi rigide. La plupart des mycoplasmes sont dépourvus d'organes de mouvements à l'exception de *M. pneumoniae* et *M. penetrans*, qui peuvent glisser ou s'attacher aux cellules cibles en utilisant une organelle spécialisée (Razin, 1985). Cette dernière jouerait un rôle possible de cytosquelette primitif (Kirchhoff et Rosengarten, 1984a; Baseman et Tully, 1997). Néanmoins, les spiroplasmales peuvent se déplacer par rotation et fléchissement dans des milieux liquides ou semi-solides (Razin, 1985).

Les *Mollicutes* sont des parasites obligatoires à cause de leur dépendance en nutriments et en précurseurs biologiques vis à vis de leur hôte (Baseman et Tully, 1997). Leur culture est fastidieuse et ils ne peuvent croître essentiellement que dans des milieux synthétiques très riches, tels les milieux utilisés pour la culture cellulaire et tissulaire. Il existe des milieux très spécialisés pour certaines espèces de mycoplasmes (Dybvig et Voelker, 1996).

Toutes ces particularités physiques, chimiques et biologiques sont à l'origine de l'ambiguïté historique dans leur classification (Bove, 1993; Chastel, 1995). Tout comme les virus, les mycoplasmes passent à travers les filtres biologiques de porosité inférieure à 0,2  $\mu\text{m}$ , sont des parasites obligatoires, quoique généralement extracellulaires, peuvent croître sur des cultures cellulaires et sont inhibés par des anticorps spécifiques. Par contre, ils se divisent par fission et subdivision du cytoplasme, ils poussent sur des milieux

synthétiques, forment des colonies sur gélose et sont inhibés par certains antibiotiques, tout comme les bactéries (Dybvig, 1990; Bove, 1993; Dybvig et Voelker, 1996). Les mycoplasmes peuvent affecter aussi bien l'homme que différentes espèces animales, parmi lesquelles on retrouve l'espèce porcine.

### 1.2 Les pathologies à mycoplasmes

Les différentes espèces du genre *Mycoplasma* connues à ce jour ont une certaine prédilection pour les tractus respiratoire et urogénital, la glande mammaire, les jonctions articulaires et les membranes séreuses (Nicolet, 1996). Les mycoplasmes ont été associés à certaines maladies chroniques comme le syndrome de la fatigue chronique, le syndrome fibromyalgique, le syndrome de la guerre du golfe, l'arthrite rhumatoïde, toutefois leur implication directe n'est pas clairement démontrée. Les mycoplasmes et plus spécifiquement *M. pneumoniae* est responsable chez l'homme de complications comme l'exanthème vésiculaire, la stomatite ulcérate, la conjonctivite, l'anémie hémolytique, la péricardite invasive et l'arthrite. *M. hominis* et *Ureaplasma urealyticum* sont impliqués dans des affections du tractus génito-urinaire de l'homme et il s'agit essentiellement de l'urétrite non gonococcique, des affections pulmonaires du nouveau-né, des prostatites et vaginites. Également chez des patients atteints du SIDA, on isole souvent des espèces comme *M. fermentans*, *M. penetrans* ou *M. pirium* et leurs rôles dans l'infection ne sont pas encore définis (Blanchard *et al.*, 1992a; Lo *et al.*, 1992).

Les espèces de la classe des mollicutes causent diverses pathologies autant bien qu'elles diffèrent dans leur organisation génomique que dans leurs voies métaboliques. Certaines espèces de mycoplasmes produisent des superantigènes qui sont connus pour avoir un effet sur les lymphocytes, les macrophages et les cellules NK et jouer un rôle dans des maladies comme la sclérose en plaques, l'arthrite rhumatoïde et le SIDA (Baccala *et al.*, 1992; Baseman et Tully, 1997). Chez l'homme, *M. pneumoniae* cause une pneumonie atypique affectant des individus de 5-20 ans d'âge. Les symptômes associés à cette infection peuvent aller d'une affection du tractus respiratoire supérieur à un syndrome de détresse respiratoire chez l'adulte. En effet, les mycoplasmes affecte le système immunitaire en induisant soit une suppression ou une activation polyclonale des cellules

T et B avec une sécrétion de cytokines. D'autre part, ils peuvent augmenter la cytotoxicité des macrophages, des cellules NK et des cellules T. En effet, ces actions collatérales leur confère l'habilité de moduler la réponse immune de l'hôte leur permettant soit de s'évader ou de supprimer les mécanismes de défense de l'hôte.

La plupart des mycoplasmes pathogènes s'attachent aux cellules cibles par le biais de structures filamenteuses ou organelles. En effet, ces dernières sont composées d'un réseau de protéines interactives dénommées adhésines ou protéines accessoires d'adhérence (Kirchhoff et Rosengarten, 1984a; Baseman *et al.*, 1996). La coopération structurelle et fonctionnelle de ces protéines permet la mobilisation et la concentration des adhésines au niveau polaire et facilite indirectement la colonisation par le biais de récepteurs sialoglycoconjugués ou glycolipides sulfatés. Malgré le fait que leur génome soit très petit, les mycoplasmes peuvent présenter au niveau de leur ADN des séquences génomiques répétées. Ces dernières permettent une diversité génétique et une maximisation de leur potentiel codant. Les domaines riches en proline joueraient un rôle important dans l'adhésion cellulaire et la virulence des mycoplasmes (Su *et al.*, 1987; Jacobs *et al.*, 1991; Dallo *et al.*, 1996). Certaines adhésines de mycoplasmes présentent des homologies de séquences d'acides aminés avec le CD4 humain et les molécules CMH de classe II, ce phénomène serait à l'origine d'anticorps autoréactifs et d'immunosuppression (Root-Bernstein et Hobbs, 1991; Bisset, 1992).

Les mycoplasmes peuvent servir comme mitogènes pour les cellules T et B en induisant des maladies autoimmunes par l'activation des cellules T anti-soi ou des cellules B polyclonales. De même, les mycoplasmes induisent la production d'une grande variété de cytokines et ont des effets directs sur les macrophages, cellules B et T. En effet, la production de cytokines et l'activation lymphocytaire peuvent aussi bien freiner la maladie par la promotion des mécanismes de défense de l'hôte, qu'exacerber la maladie par le développement des lésions (Baseman *et al.*, 1995; Cole *et al.*, 1996; Rawadi et Roman-Roman, 1996). Les mycoplasmes présentent différentes propriétés qui influent sur leur virulence et il s'agit notamment de la production de peroxyde d'hydrogène et de radicaux super oxydes par les mycoplasmes adhérents et par conséquent entraînant un

stress oxydatif; une fréquence élevée de variations antigénique et de phase résultant sur une diversité de surface et permettant d'échapper à l'immunité protectrice de l'hôte; la compétition avec la cellule hôte pour les nutriments et des précurseurs de la biosynthèse entraînant la dérégulation de la fonction cellulaire; la sécrétion d'enzymes comme les phospholipases, ATPases, hémolysines, protéases et nucléases dans le milieu cellulaire causant une désorganisation et des aberrations chromosomiques (Baseman *et al.*, 1995; Theiss *et al.*, 1996).

Certains mycoplasmes et plus particulièrement *Mycoplasma fermentans* agissent comme co-facteurs du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA). Il a été démontré que *M. fermentans* pouvait induire un effet synergique avec le VIH dans son action cytopathique sur les lymphocytes CD4+ (Wang *et al.*, 1993; Grau *et al.*, 1995). Des études *in vitro* ont démontré que la plupart des mycoplasmes peuvent résister à la phagocytose en absence d'opsonines et plus particulièrement des anticorps spécifiques. En effet, ces mycoplasmes peuvent s'attacher à la surface des phagocytes sans pour autant être ingérés (Marshall *et al.*, 1995). D'autres études ont également montré *in vitro*, que le complément était moins efficace que les anticorps spécifiques dans l'induction de la phagocytose des mycoplasmes par les macrophages alvéolaires provenant de souris infectées par *M. pulmonis* (Jones et Hang, 1977; Howard, 1980). En effet, il se pourrait que les mycoplasmes utilisent ce système d'échappement au complément comme facteur de virulence.

### **1.3 Relation *Mycoplasma*-système immunitaire de l'hôte**

La réponse de l'hôte par rapport à une infection à *Mycoplasma* implique aussi bien une réponse immune spécifique que non spécifique. Les moyens de défense spécifiques sont essentiellement basés sur la réponse humorale systémique et locale, de même que l'immunité à médiation cellulaire. Le pouvoir des mycoplasmes d'agir sur la réponse immune de l'hôte, leur permet d'augmenter leur pathogénicité, d'échapper aux défenses de l'hôte ou d'établir une infection persistante. L'induction de l'immunosuppression par *Mycoplasma* peut se faire par différentes voies parmi lesquelles les plus importantes sont:

- L'induction de la sécrétion de l'IL-10 qui est une cytokine immunosuppressive produite par les cellules Th2 CD4+ et les macrophages. En effet, l'IL-10 inhibe les fonctions accessoires des cellules présentatrices d'antigène (CPA) et la production par les cellules mononucléaires de cytokines comme l'IL-1, le TNF- $\alpha$ , les chemokines et l'IL-12. D'autre part, l'IL-10 a un effet inhibiteur sur les cellules Th1 CD4+ qui produisent de l'INF- $\gamma$ . En définitive l'IL-10 régule à la baisse l'activation des cellules T et médie le passage du phénotype Th1 au développement d'une sous-population Th2 entraînant un changement de répertoire des cellules T. Cette observation a été confirmée en analysant l'expression de l'ARN<sub>m</sub> de l'IL-10 au niveau de la langue de souris infectées par *M. pneumoniae*. Une corrélation négative a été remarquée entre l'expression à la hausse des ARN<sub>m</sub> de l'IL-10 et celle des ARN<sub>m</sub> de l'IL-2 (Cole *et al.*, 1993; Pietsch *et al.*, 1994).

- L'induction de la production de l'IL-13 a également été démontrée par l'expression des ARN<sub>m</sub> de cette cytokine dans les cultures cellulaires infectées par un mycoplasme. En effet, il est connu que cette cytokine est régulatrice négative de l'activité des macrophages et elle est produite par les cellules Th2 CD4+, les cellules T CD8+ et les neutrophiles. L'IL-13 bloque la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages et inhibe la production de l'oxyde nitrique (NO) également (Zurita-Salinas *et al.*, 1996).

- La sécrétion dans le surnageant de culture cellulaire infectée d'un facteur de 200-kDa qui inhibe l'induction de l'IL-2 par les cellules T cytotoxiques lors d'une infection par *M. hyorhinis* par exemple (Teh *et al.*, 1988).

## 2. LES DIFFÉRENTES ESPÈCES DE MYCOPLASMES PORCINS

Il existe trois espèces de mycoplasmes répertoriées comme responsables de maladies porcines et il s'agit de *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* et *M. hyopneumoniae* (Friis, 1973).

*M. hyorhinis* est généralement transmis par les truies aux porcelets par les sécrétions nasales et certaines souches causent une arthrite et une polysérosite sérofibrineuse (Kobisch et Friis, 1996). *M. hyorhinis* est retrouvé au niveau du nasopharynx porcin et c'est surtout un contaminant des cultures cellulaires. Les porcs sains sont résistants à l'invasion par *M. hyorhinis* qui est une espèce de mycoplasme sensible à certains antibiotiques comme la lincomycine, la tiamuline et la tylosine (Pijoan, 1975; Williams et Gallagher, 1981).

*M. hyosynoviae* a une grande affinité pour les jonctions articulaires et il est généralement localisé au niveau des amygdales. Les porcelets sont infectés par leur mère et une fois en contact avec d'autres porcs l'infection se propage (Ross et Spear, 1973; Friis *et al.*, 1991). Suite à l'infection des amygdales, on observe une atteinte du pharynx et des muqueuses nasales. En effet, à partir du réservoir que sont les amygdales, l'infection suit le tractus respiratoire et après une dissémination systémique, la bactérie se localisera essentiellement au niveau des membranes synoviales des jonctions articulaires (Gois *et al.*, 1975; Jensen *et al.*, 1995). Dans les cas chroniques, la membrane synoviale est souvent atteinte et on peut isoler la bactérie au niveau des jonctions articulaires (Kobisch et Friis, 1996). Toutefois cet isolement n'est réalisable que pendant la phase aiguë de l'arthrite (Ross, 1973; Ross et Spear, 1973).

*M. hyopneumoniae* est l'agent causal de la pneumonie enzootique porcine qui atteint les porcs de tous âges mais avec une prédilection pour ceux de 8 à 12 semaines. Les lésions pulmonaires généralement observées chez les porcelets sont caractérisées par une hyperplasie des cellules épithéliales et une infiltration par les cellules mononucléaires dans les régions périvasculaire et péribronchiolaire (Kobisch et Friis, 1996).



### 3. MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE

#### 3.1 Généralités

*M. hyopneumoniae* a été l'un des premiers mycoplasmes à avoir été observé dans les années 1950 au microscope (CJ. et Switzer, 1965). L'identification de *M. hyopneumoniae* a été effectuée pour la première fois en même temps en Angleterre et aux Etats-Unis en 1965 (CJ. et Switzer, 1965; Goodwin *et al.*, 1965). *M. hyopneumoniae* est une bactérie de forme ronde ou ovoïde avec un diamètre moyen de 0,20 µm qui est composée d'une membrane plasmique et une coloration au rouge de ruthénium permet d'observer une couche d'homopolymères de sucres (Tajima et Yagihashi, 1982). La cellule contient des ribosomes et un ADN circulaire double brin et les colonies formées sur milieu solide ont un diamètre de 0,5 mm et ne sont observables qu'à l'aide d'un stéréoscope (Ross, 1992; Maes *et al.*, 1996). La croissance de *M. hyopneumoniae* en milieu liquide enrichi peut prendre jusqu'à 30 jours alors que ce délai est de 2 à 15 jours sur milieu solide (Ross, 1992; Maes *et al.*, 1996). À l'œil nu la croissance en milieu liquide se traduit par la turbidité et l'acidification du milieu (Friis, 1973). En effet, les milieux synthétiques nécessitent l'ajout de plusieurs facteurs de croissance, tels que l'extrait de levure frais, du sérum de porc et/ou de cheval ajoutés jusqu'à un volume de 20% comme source de cholestérol avec une grande concentration d'antibiotiques..

#### 3.2 TAXONOMIE

*M. hyopneumoniae* appartient à la classe des *Mollicutes* et à la division des *Ténéricutes* (bactéries sans paroi rigide). Dans la nature il existe quatre divisions dans le règne des procaryotes: les *Ténéricutes*, les *Firmicutes* (bactéries Gram-positives), les *Gracilicutes* (bactéries Gram-négatives) et les *Mendosicutes* (archéobactéries) (Razin, 1985; Taschke et Herrmann, 1986). Dans la classe *Mollicutes* on retrouve quatre ordres que sont les *Mycoplasmatales*, les *Acholeplasmatales*, les *Anaeroplasmatales* et les *Entomoplasmatales*. Ce sont essentiellement les trois premiers qui comprennent des espèces affectant les animaux.

L'ordre des *Mycoplasmatales* comprend une famille: les *Mycoplasmataceae* qui quand à elle est subdivisée en deux genres: *Mycoplasma* et *Ureaplasma* avec des espèces pouvant infecter les humains, les animaux, les plantes et les insectes (Razin, 1985). Le genre *Mycoplasma* comprend plus de quatre-vingt neuf espèces répertoriées et qui se différencient des espèces du genre *Ureaplasma* par leur capacité d'hydrolyse de l'urée. Toutes les espèces connues des *Mycoplasmataceae* ont besoin de cholestérol pour survivre et se reproduire (Razin *et al.*, 1984b; Maniloff, 1988).

L'ordre des *Acholeplasmatales* ne contient qu'une seule famille, *Acholeplasmataceae*, avec un genre, *Acholeplasma* (Freundt et Winkelmann, 1984; Razin *et al.*, 1984a). Comme l'indique leur nom, les acholéplasmes n'ont pas besoin de cholestérol pour croître. Ils sont retrouvés chez les animaux, les plantes et les insectes (Freundt et Winkelmann, 1984; Tully, 1993).

Le dernier ordre est celui des *Anaeroplasmatales*. Ces microorganismes sont des anaérobies obligatoires et on les a retrouvés dans le rumen des bovins et des ovins. Deux genres sont présentement connus dans la famille des *Anaeroplasmataceae*: les *Anaeroplasma*, qui ont besoin de cholestérol, et les *Asteroplasma*, qui n'en requièrent pas (Razin *et al.*, 1984a; Maniloff, 1988; Tully, 1993).

**Tableau # 1. Grandes propriétés des trois ordres affectant les animaux**

CLASSIFICATION	Nombre d'espèces	Grandeur du génome <sup>b</sup> (kpb)	% G + C dans l'ADN	Besoin en cholestérol	Propriétés distinctives	Habitat
<b>Ordre I: <i>Mycoplasmatales</i></b>						
<b>Famille I:</b>						
<b><i>Mycoplasmataceae</i></b>						
Genre I: <i>Mycoplasma</i>	89	580-1300	23-41	+		Humains, animaux, plantes, insectes
Genre II: <i>Ureaplasma</i>	5	730-1160	27-30	+	Uréase positif	Humains, animaux
<b>Ordre II:</b>						
<b><i>Entomoplasmatales</i></b>						
<b>Famille I:</b>						
<b><i>Entomoplasmataceae</i></b>						
Genre I: <i>Entomoplasma</i>	1	790-1140	27-30	+		Insectes
Genre II: <i>Mesoplasma</i>	2	870-1100	26-30	-		Plantes, Insectes
<b>Ordre II: <i>Acholeplasmatales</i></b>						
<b>Famille I:</b>						
<b><i>Acholeplasmataceae</i></b>						
Genre I: <i>Acholeplasma</i>	12	Environ 1600 <sup>c</sup>	27-36	-		Animaux, plantes, insectes
<b>Ordre III:</b>						
<b><i>Anaeroplasmatales</i></b>						
<b>Famille I:</b>						
<b><i>Anaeroplasmataceae</i></b>						
Genre I: <i>Anaeroplasma</i>	4	Environ 1600 <sup>c</sup>	29-33	+	Anaérobies obligatoires	Rumen des ovins et bovins

<sup>a</sup> adapté à partir du mémoire de maîtrise de Judith Caron (Caron, 1999)

<sup>b</sup> Données obtenues par expériences de PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) excepté où indiqué

<sup>c</sup> Données obtenues par expériences de cinétique de renaturation

### 3.3 Génome

Le séquençage du génome de *M. hyopneumoniae* est complété, toutefois cette séquence n'a pas encore été rendue public dans Genbank. Néanmoins certaines informations sommaires seront présentées dans ce paragraphe. Le génome de cette bactérie est de très petite taille (903,350 pb) constitué d'un ADN circulaire double brin et par conséquent *M. hyopneumoniae* code essentiellement pour le nombre minimum de protéines nécessaires à sa réplication et sa division (Maes *et al.*, 1996). Ce génome comprend 766 cadres de lecture ouverts (ORFs) potentiels parmi lesquels seulement 392 ORFs (51%) codent pour des protéines fonctionnelles. L'analyse des ORFs codant pour les protéines potentielles montre que 64 ORFs (17 %) correspondent à des séquences conservées connues et 311 ORFs (83 %) à des séquences uniques de *M. hyopneumoniae*. Le pourcentage de G + C est de 28,6 % et le codon d'arrêt universel, TGA, est utilisé pour le tryptophane dans certains gènes (Dybvig et Voelker, 1996).

**Tableau # 2. Récapitulatif de la taille du génome et le pourcentage de G + C de *M. hyopneumoniae* et d'autres mycoplasmes dont le génome a été séquencé :**

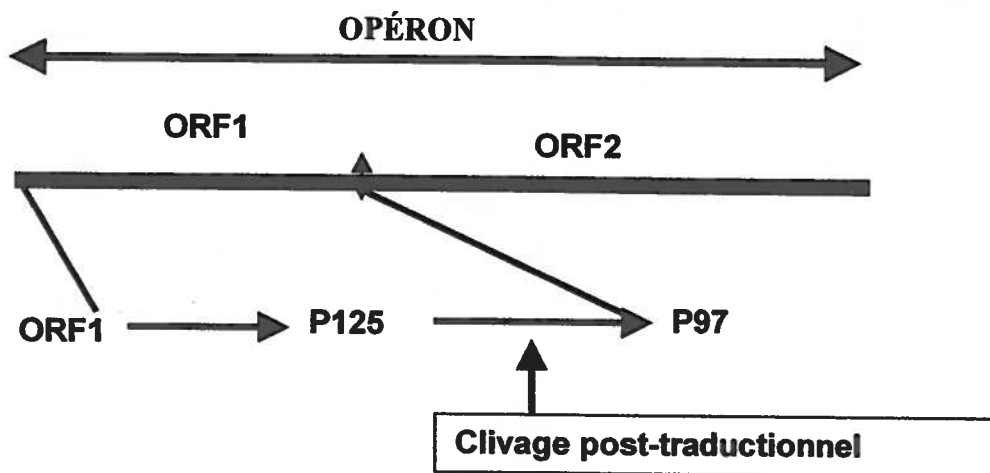
Microorganisme	Taille du génome (pb)	G + C
<i>M. hyopneumoniae</i>	903,350	28,6 %
<i>M. genitalium</i>	580,074	32 %
<i>M. pneumoniae</i>	816,394	40 %
<i>M. pulmonis</i>	963,879	26,6 %
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	751,719	25,5 %

### 3.4 Facteurs de virulence

La colonisation du tractus respiratoire par *M. hyopneumoniae* est essentiellement médiée par l'attachement de l'adhésine aux récepteurs des cellules ciliées. En plus, lors de la réponse immune contre *M. hyopneumoniae*, les anticorps sont quantitativement dirigés contre des protéines majeures de cet agent. Par conséquent, la virulence de *M. hyopneumoniae* semble intimement associée à différentes protéines, parmi lesquelles :

#### 3.4.1 L'adhésine P97

Le gène P97 est un ORF de 3327pb avec 4 codons TGA pour le tryptophane. L'ORF P97 est contenu dans un opéron de deux ORFs, un codant pour la biosynthèse de la protéine P97 et l'autre pour une protéine de 102.3 kDa dénommée P102 (Hsu et Minion, 1998). Le gène codant pour P97 est présent en une seule copie dans le chromosome alors que celui de la P102 est en copies multiples.



**Figure 1. Biosynthèse de la protéine P97 après clivage post traductionnel de la protéine P125 codée par l'ORF1.**

À ce jour, c'est l'adhésine la mieux caractérisée de *M. hyopneumoniae* et elle entraîne une réponse immune spécifique (Zhang *et al.*, 1995). Selon certains travaux, cette protéine est essentiellement exprimée *in vivo* (Young *et al.*, 1987). Des études ont montré qu'à l'extrémité C-terminale de la protéine, on retrouve des séquences répétées d'acides

aminés organisées soient en neuf tandems (RR1) ou en 5 tandems (RR2). Les séquences sont A(T)-K-P-E(V)-A(T) et G-A(E,S)-P-N(S)-Q-G-K-K-A-E pour RR1 et RR2 respectivement. Ces régions répétées semblent jouer un rôle majeur dans la pathogénicité et la virulence de *M. hyopneumoniae*. Le nombre de ces régions répétées semble être important, car toutes les souches pathogènes en ont plus que 12 (Wilton *et al.*, 1998). Ces régions faciliteraient l'attachement de la bactérie aux récepteurs cellulaires par l'intermédiaire de la protéine P97, la colonisation et l'infection subséquente. L'adhésine P97 de *M. hyopneumoniae* différencierait des adhésines des autres mycoplasmes par sa conformation et par les acides aminés localisés au niveau de son extrémité N-terminale (Hsu *et al.*, 1997; Wilton *et al.*, 1998). En effet, toutes les adhésines de mycoplasmes se ressemblent par la conformation et la localisation de leurs épitopes majeurs (Razin et Jacobs, 1992).

#### 3.4.2 La protéine membranaire P46

Le gène codant pour la protéine P46 est un cadre de lecture ouvert (ORF) de 1260 pb contenant trois codons TGA qui codent pour le tryptophane (Futo *et al.*, 1995a). C'est une protéine membranaire de nature lipoprotéique du fait que la séquence de tête correspond au peptide signal des lipoprotéines procaryotiques (Suzuki *et al.*, 1988; Futo *et al.*, 1995a). La protéine P46 induit une réponse immune précoce et spécifique à *M. hyopneumoniae* et les anticorps peuvent être détectés aussi rapidement qu'à 14 jours suivant une infection (Mori *et al.*, 1988). Par ailleurs, cette protéine a été utilisée comme antigène dans la mise au point d'un test ELISA double sandwich pour le diagnostic des infections à *M. hyopneumoniae* (Futo *et al.*, 1995b).

#### 3.4.3 La protéine membranaire P65

Le gène codant pour cette protéine est un ORF de 1803 pb avec un codon TGA traduit en tryptophane. Le produit du gène est une lipoprotéine de 65 kDa (P65). Cette protéine est très immunogénique et son domaine d'immunogénicité semble relié à sa partie C-terminale. Ce domaine et la majorité de la région adjacente de la P65 sont présents et accessibles à la surface externe de la membrane plasmique de *M. hyopneumoniae* (Kim *et*

*al.*, 1990). En effet, cette protéine comme toutes les autres lipoprotéines de *M. hyopneumoniae* peut être séparée des préparations membranaires par des traitements avec des détergents, tel le Triton X-114 (Wise et Kim, 1987).

#### **3.4.4 La P74: protéine membranaire**

La protéine de surface P74 a été rapportée comme une protéine spécifique à *M. hyopneumoniae* (Feld *et al.*, 1992) mais une étude plus récente démontre qu'elle partage des déterminants antigéniques avec *M. hyorhinis* et, surtout, *M. flocculare* (Scarman *et al.*, 1997). La protéine P74 a un poids moléculaire de 74,5 kDa et elle induit la production d'anticorps neutralisants rapidement lors de l'infection. Elle partage des similarités de séquences avec certaines protéines induisant le choc thermique (Feld *et al.*, 1992). Cette protéine de surface est utilisée comme antigène dans une épreuve ELISA de compétition disponible commercialement, utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre un épitope spécifique à cette protéine (Feld *et al.*, 1992).

#### **3.4.5 La protéine membranaire P54**

La protéine membranaire P54 a été caractérisée comme étant un facteur cytopathique en se basant sur les dommages qui sont causés par les extraits membranaires de *M. hyopneumoniae* sur des cellules fibroblastiques de poumon humain MRC-5 en culture (Geary et Walczak, 1985). Des études complémentaires seraient nécessaires pour élucider son implication dans l'immunogénicité et la pathogénicité de *M. hyopneumoniae*.

#### **3.4.6 La protéine cytosolique P36**

Le gène P36 est un ORF de 947 pb codant pour une protéine de 36 kDa qui démontre de l'homologie de séquence avec des lactate déshydrogénases (Haldimann *et al.*, 1993). C'est une protéine très immunogène induisant des anticorps en deux phases (Strasser *et al.*, 1991; Frey *et al.*, 1994). La protéine P36 est très conservée au sein des différentes souches de *M. hyopneumoniae*, par contre son implication dans la pathogénicité n'a pas encore été élucidée (Haldimann *et al.*, 1993; Caron *et al.*, 2000b). En effet, les anticorps dirigés contre la protéine P36 peuvent être détectés dans les sérums de porcs infectés expérimentalement dès la 4<sup>ème</sup> semaine et ce jusqu'à 12 semaines et plus post-infection

(Frey *et al.*, 1994). D'autre part, c'est une protéine très spécifique à *M. hyopneumoniae* car les anticorps dirigés contre cette protéine ne démontrent aucune réactivité croisée avec les autres espèces de mycoplasmes porcins tels que *M. hyorhinis* ou *M. flocculare* (Strasser *et al.*, 1991; Haldimann *et al.*, 1993; Scarman *et al.*, 1997).

### 3.4.7 Autres protéines

Une autre adhésine potentielle présente chez *M. hyopneumoniae* est une protéine membranaire de 124 kDa appelée Mhp1. Le clonage du gène Mhp1 a permis de produire une protéine recombinante utilisée dans des essais vaccinaux. Certains auteurs suggèrent que Mhp1 et P97 serait la même adhésine, de part l'homologie de leurs séquences et les données immunologiques obtenues au cours des études (King *et al.*, 1997). En plus de cette adhésine probable, une glycoprotéine de 110 kDa (P110) dénommée « adhesin-like » a été identifiée et elle semble se subdiviser en trois unités, une de 54 kDa et deux de 28 kDa (Chen *et al.*, 1998). Par contre le rôle de cette adhésine dans la pathogénicité de *M. hyopneumoniae* n'est pas encore connu (Chen *et al.*, 1998).

Parmi les protéines nouvellement identifiées, il existe une protéine de choc thermique de 42 kDa appelée Hsp60. Le gène codant pour cette protéine semble être une partie du gène P65 et elle appartiendrait à la famille des protéines HSP70 qui sont retrouvées aussi bien chez les bactéries, les plantes que les humains. Des anticorps monospécifiques dirigés contre cette protéine sont capables d'inhiber la croissance de *M. hyopneumoniae* en milieu solide et liquide (Chou *et al.*, 1997). D'autres études ont montré que cette protéine pouvait être immunogénique lors d'une infection naturelle (Scherm *et al.*, 2002).

## 3.5 Pathogénie de l'infection à *Mycoplasma hyopneumoniae*

### 3.5.1 Signes cliniques et lésions



L'infection à *M. hyopneumoniae* cause une toux sèche et non productive observée 10 à 14 jours post-infection avec un retard de croissance et une morbidité élevée (Ross, 1992; Thacker, 2001). Des signes moins constants comme l'abattement, l'anorexie ou la fièvre peuvent être observés (Thacker *et al.*, 1999). *M. hyopneumoniae* est un composant majeur dans les maladies respiratoires porcines et il est à l'origine de l'installation d'autres infections respiratoires secondaires telles que : la pleuropneumonie porcine à *Actinobacillus pleuropneumoniae*, la pasteurellose à *Pasteurella multocida* ou le syndrome reproducteur et respiratoire porcin causé par le virus du même nom (VSRRP) (Yagihashi *et al.*, 1984; Ciprian *et al.*, 1988; Thacker *et al.*, 1999). Durant la première phase de colonisation, *M. hyopneumoniae* s'attache intimement aux cils des cellules épithéliales de la trachée et des poumons (Zielinski et Ross, 1993; DeBey et Ross, 1994; Zhang *et al.*, 1994b). Les premiers signes cliniques de la pneumonie enzootique porcine apparaissent habituellement après une période d'incubation de deux semaines (Ross, 1992; Sorensen *et al.*, 1997).

La pneumonie causée par *M. hyopneumoniae* est de type bronchopneumonie catharrale et les lésions sont généralement localisées au niveau des lobes cardiaques et apicaux ainsi que dans la partie crâniale du lobe caudal du poumon (Kobisch et Friis, 1996). La chronicité de l'infection entraîne des lésions de type bronchite-bronchiolite lymphofolliculaire. Ce type de lésion chronique est due à une prolifération lymphocytaire et plasmocytaire autour de la paroi des voies respiratoires. En effet, les symptômes deviennent plus sévères quand des agents secondaires comme *Actinobacillus pleuropneumoniae* ou *Pasteurella multocida* sont associés à cette mycoplasmosse (Ross, 1992; Kobisch et Friis, 1996).

A la suite de l'attachement de *M. hyopneumoniae* aux cils, on remarque une perte des cils des cellules épithéliales de la trachée, des bronches et des bronchioles. Cette perte de cils pourrait être due à une action de ce pathogène sur les voies de signalisation (Debey *et al.*, 1993). L'hypothèse la plus plausible, serait que *M. hyopneumoniae* active les récepteurs qui sont couplés aux protéines G<sub>i</sub> et G<sub>o</sub>, qui à leur tour, activent la voie de la phospholipase C (PLC) et entraînant ainsi le relarguage du calcium endoplasmique (Park *et al.*, 2002). L'infection est essentiellement caractérisée sur le plan microscopique par

des infiltrations de cellules mononucléaires dans les régions pérbronchiolaires et périvasculaires (Thacker *et al.*, 2001).

L'adhérence se fait par l'intermédiaire de l'adhésine P97 en utilisant les récepteurs des cils qui sont de nature glycolipides sulfatés et plus exactement les récepteurs sont de type sulfatide, globoside et monosialoganglioside GM3 (Zhang *et al.*, 1994a; Hsu *et al.*, 1997). Le mécanisme d'adhésion n'est pas encore parfaitement élucidé, mais il est connu que *M. hyopneumoniae* se multiplie d'abord dans les bronchioles et les espaces alvéolaires (Kobisch et Friis, 1996).

### 3.5.2 Réponse immunitaire

*M. hyopneumoniae* induit une réponse immune efficace se traduisant par une séroconversion pouvant être lente et un faible taux d'anticorps dans le tractus respiratoire (Djordjevic *et al.*, 1997; Thacker *et al.*, 2000a).

#### 3.5.2.1 Réponse humorale

La séroconversion lors d'une infection à *M. hyopneumoniae* est généralement détectée par des tests quantifiant uniquement les immunoglobulines G (IgG) par conséquent la réponse secondaire. Le fait qu'une souche de *M. hyopneumoniae* soit peu ou pas invasive pourrait justifier certaines variations dans la réponse humorale en IgG (Suter *et al.*, 1985; Young et Ross, 1987; Sorensen *et al.*, 1993; Sitjar *et al.*, 1996). Des études ont montré que lors de la réponse immune contre *M. hyopneumoniae*, les anticorps IgA bloqueraient l'adhérence alors que les IgG joueraient un rôle d'opsonines (Sheldrake, 1990; Zhang *et al.*, 1995). En effet, dans le tissu pulmonaire, 80 à 90 % des cellules B produisent des IgG, alors qu'au niveau de la trachée 70 à 80 % de ces cellules sécrètent des IgA (Sheldrake *et al.*, 1993). D'autre part, le titre en IgG diminue à quatre semaines post-infection et cette chute s'expliquerait par la formation de complexes immuns avec le microorganisme dans les poumons (Taylor et Howard, 1980; Okada *et al.*, 2000).

### 3.5.2.2 Réponse cellulaire

Dans les poumons de porcs infectés par *M. hyopneumoniae* il y a une grande infiltration de macrophages, de neutrophiles et de lymphocytes (Blanchard *et al.*, 1992b). Les lavages bronchoalvéolaires (LBA) des poumons de porcs infectés, dénotent une sécrétion de TNF- $\alpha$  qui est en corrélation positive avec l'augmentation des macrophages et des neutrophiles. En effet, TNF- $\alpha$  agit sur la migration des neutrophiles et induit la production de cytokines de la famille des interleukines 8 (IL-8) (Ulich *et al.*, 1991). D'autre part, les ARN<sub>m</sub> de TNF- $\alpha$  ont été détectés dans les LBA de souris infectées par *M. pulmonis*. Ces derniers résultats suggèrent que les macrophages et les neutrophiles joueraient un rôle central dans la sécrétion de TNF- $\alpha$  (Nishimoto *et al.*, 1994). Une augmentation de la concentration de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 dans les LBA a également été observée lors d'une infection à *M. hyopneumoniae*. Le principal type de cellules retrouvées dans les LBA sont essentiellement des macrophages alvéolaires présents à quatorze jours post-infection. À trente sept jours post-infection, on retrouve un mélange de macrophages, de cellules polymorphonucléaires et de lymphocytes. La sécrétion de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 dans le système respiratoire des porcs infectés jouerait le rôle de facteur d'activation des lymphocytes T et par conséquent un rôle dans la pathogénèse de l'infection à *M. hyopneumoniae* (Asai *et al.*, 1993). Des études récentes ont montré que les cellules T activées produisant l'INF- $\gamma$  seraient importantes dans la lutte contre la pneumonie à *M. hyopneumoniae* (Thacker *et al.*, 2000a). En effet, la composante majeure de la pneumonie enzootique à *M. hyopneumoniae* est la production de cytokines proinflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  (Caruso et Ross, 1990; Asai *et al.*, 1993; Asai *et al.*, 1994)

En conclusion, la pathogénèse de *M. hyopneumoniae* est encore obscure due au fait que sa culture est fastidieuse et qu'il est difficile de reproduire l'infection avec les souches adaptées en laboratoire (DeBey *et al.*, 1992; Zielinski et Ross, 1993)

### 3.6 Diagnostic de l'infection

#### 3.6.1 Diagnostic immunohistochimique

La technique la plus couramment utilisée dans le diagnostic des infections à *M. hyopneumoniae* est l'immunofluorescence indirecte (IFI) réalisée sur des coupes de poumon congelé, à l'aide d'anticorps polyclonaux (Armstrong *et al.*, 1984; Maes *et al.*, 1996). L'immunopéroxydase sur des coupes paraffinées de poumon infecté fixé au formol a été également utilisée (Kobisch et Friis, 1996). Toutefois, ces deux tests sont confrontés à des problèmes de sensibilité et de spécificité car l'usage des anticorps polyclonaux est à l'origine de réactions antigéniques croisées avec *M. hyorhinis* et *M. flocculare* (Freeman *et al.*, 1984b; Stemke *et al.*, 1994).

#### 3.6.2 Diagnostic sérologique

Le diagnostic sérologique de la pneumonie enzootique à *M. hyopneumoniae* est essentiellement basé sur l'hémagglutination indirecte, la fixation du complément, l'agglutination rapide sur lame et l'ELISA (Kobisch et Friis, 1996; Maes *et al.*, 1996). Le problème majeur de ces tests de diagnostic classique est la communauté antigénique qui existe entre *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* et *M. flocculare* et des réactions antigéniques croisées qui en découlent (Scarman *et al.*, 1997). Ce problème justifie l'intérêt d'avoir des antigènes et des anticorps très spécifiques à *M. hyopneumoniae*. Il existe actuellement différents tests ELISA notamment :

- un test ELISA double "sandwich", basé sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal reconnaissant spécifiquement la protéine membranaire P46, a été développé et ce test peut détecter des anticorps deux semaines post-infection (Mori *et al.*, 1987).

- un test ELISA de compétition utilisant la protéine membranaire P74 comme antigène et son anticorps monoclonal comme agent compétitif (Feld *et al.*, 1992), mais la non spécificité de cette protéine rend ce test difficile à évaluer.

-un test ELISA de blocage utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre une protéine native de 40 kDa de *M. hyopneumoniae*. En effet, cette protéine de 40 kDa semble détectable de deux semaines jusqu'à vingt semaines post-infection (Le Potier *et al.*, 1994). Toutefois ce test utilise la protéine native de *M. hyopneumoniae* d'où les problèmes de pureté d'antigènes et de standardisation.

Des extraits de membranes provenant du traitement de la bactérie par différents types de détergents notamment le Tween 20 ont été utilisés dans un ELISA et la spécificité semble être augmentée (Nicolet *et al.*, 1980). D'autres groupes ont utilisé le colostrum de truies pour faire le suivi sérologique de l'infection à *M. hyopneumoniae* par ELISA, l'avantage est qu'un échantillon peut être collecté par les éleveurs de porcs et se conserver facilement tout en contenant plus d'anticorps anti-mycoplasmes que le sérum (Sorensen *et al.*, 1993).

La protéine recombinante P46 fusionnée soit à une protéine s'attachant au maltose (MBP) ou à une queue histidine (His-tag) a été utilisée dans un test ELISA double-« sandwich » pour le diagnostic de la pneumonie enzootique (Futo *et al.*, 1995b).

### 3.6.3 Diagnostic moléculaire

La biologie moléculaire et ses techniques ont grandement amélioré le diagnostic des infections à *M. hyopneumoniae* par l'amplification de certains gènes spécifiques à ce microorganisme ou communs aux mycoplasmes porcins. Cette détection peut se faire essentiellement par la réaction de polymérase en chaîne (PCR) ou d'hybridation *in situ* (Artiushin *et al.*, 1993; Boye *et al.*, 2001). Ces techniques utilisent des sondes moléculaires discriminant les espèces de mycoplasmes porcins ou *M. hyopneumoniae* par rapport aux autres espèces de mycoplasmes porcins (Ahrens et Friis, 1991; Abiven *et al.*, 1992; Boye *et al.*, 2001). Le diagnostic moléculaire peut se faire soit, sur les lavages trachéobronchiques de porcs infectés expérimentalement, sur les écouvillons nasaux ou sur les homogénats de poumon de porcs infectés (Mattsson *et al.*, 1995; Baumeister *et al.*, 1998). La détection se fait soit en ciblant l'ARN ribosomal 16S ou en utilisant l'ADN génomique comme matrice (Artiushin *et al.*, 1993; Mattsson *et al.*, 1995; Baumeister *et al.*, 1998). Un "nested PCR" qui utilise deux paires d'amorces à partir de l'ARN

ribosomal 16S a été développé ces dernières années (Calsamiglia *et al.*, 1999). De même un test d'hybridation *in situ* ciblant l'ARN ribosomal 16S a été mis au point sur des coupes de tissus porcins fixés au formol. Cette technique permet d'identifier *M. hyopneumoniae* lors d'une co-infection avec *M. hyorhinis* et *M. hyosynoviae* (Boye *et al.*, 2001). Un PCR multiplex utilisant simultanément deux paires d'amorces spécifiques au gène P36 et deux autres spécifiques au gène P46, a été mis au point. Cette technique a permis d'augmenter la spécificité et d'améliorer la sensibilité du diagnostic par PCR des infections à mycoplasmes (Caron *et al.*, 2000a).

### 3.7 Antibiothérapie

L'absence de paroi cellulaire rigide rend les mycoplasmes résistants aux antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactames, comme la pénicilline et ses analogues, et ils sont généralement résistants aux polymyxines, à la rifampine et aux sulfonamides (Maes *et al.*, 1996). Présentement, les antibiotiques les plus performants pour traiter les infections causées par *M. hyopneumoniae* sont les tétracyclines, les macrolides et quelques fluoroquinolones (Kobisch et Friis, 1996). Les aminoglycosides et le chloramphénicol, sont moins puissants, et le pathogène peut malgré tout coloniser et infecter le porc (Kobisch et Friis, 1996; Maes *et al.*, 1996). Certains chercheurs ont remarqué la résistance de *M. hyopneumoniae* à certains médicaments comme, le SDZ PMD 296, la tiamuline, la tylosine et l'oxytétracycline (Hannan, 1996). Par ailleurs, toutes les souches ne sont pas sensibles de la même manière face aux antibiotiques. Seules les quinolones semblent être très efficaces *in vitro* et *in vivo* et elles inhibent toutes les souches de *M. hyopneumoniae* testées, et aucune résistance ne leur a été attribuée (Hannan *et al.*, 1989; Kobisch et Friis, 1996; Maes *et al.*, 1996). Une nouvelle fluoroquinolone dénommée Morofloxacin semble plus efficace que l'amoxicilline contre les infections combinées de *M. hyopneumoniae* + *Actinobacillus pleuropneumoniae* et ce à une dose de 2mg/kg pendant trois à quatre jours d'administration intramusculaire (Thomas *et al.*, 2000). En effet, ces fluoroquinolones démontrent une certaine efficacité parce qu'elles agissent en inhibant la synthèse de l'ADN bactérien par le biais du blocage de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV (Drlica et Zhao, 1997; Hooper, 2000).

Des alternatives connexes ont été développées pour empêcher ou ralentir les infections à *M. hyopneumoniae* et ce par ajout d'agents antimicrobiens dans les aliments. Une technique dénommée "MEW" (Medicated Early Weaning) ou sevrage hâtif médicamenteux qui consiste en une antibiothérapie intense durant la gestation des truies et les jours suivant la mise-bas (Alexander *et al.*, 1980). Les porcelets sont séparés des mères avant même la prise du colostrum et maintenus sous allaitement ou alimentation contrôlée en même temps qu'on leur administre des doses élevées d'antibiotiques. Les porcs des élevages appliquant le « MEW » peuvent être exempts de *M. hyopneumoniae* jusqu'à la fin de leur vie (Ross, 1992). Une autre méthode consiste à séparer les porcelets des porcs plus âgés, et de donner de la nourriture contenant de la tiamuline ou de la chlortétracycline/tylosine/sulfadimidine aux truies (Ross, 1992).

#### 4. Vaccination

##### 4.1 Généralités

Dans le domaine de la vaccinologie, il est toujours primordial de considérer des facteurs comme la pathogénie, l'épidémiologie et l'immunobiologie de l'infection ou de la maladie avant de choisir une stratégie de vaccination (Ellis, 1999). Depuis une dizaine d'année, les approches technologiques et immunologiques pour mettre au point de nouveaux vaccins ont pris un grand essor. On distingue en général trois catégories de vaccins :

- les vaccins vivants : capables de se répliquer à l'intérieur de l'organisme et dont la pathogénicité est atténuée. Ces vaccins ont l'avantage d'induire une bonne réponse immunitaire ne nécessitant pas beaucoup de rappels et pouvant conférer une protection durable.

- Les vaccins sous-unitaires : généralement incapables de se répliquer dans l'hôte. Ils permettent de limiter les risques de réversion et un meilleur contrôle de la technicité. L'immunogénicité de ces vaccins est en général reliée au type d'adjuvant ou au mode d'administration (Vogel, 1995).

-Les vaccins génétiques : la stimulation de la synthèse antigénique se fait au niveau cellulaire. Cette méthode permet surtout de promouvoir une réponse immunitaire cellulaire et un meilleur contrôle de la production de vaccins (Ellis, 1999).

L'avènement de l'ingénierie génétique et de la biologie moléculaire ont révolutionné la vaccinologie. En effet, ces techniques nouvelles sont essentiellement basées sur le clonage des gènes microbiens dans des vecteurs recombinants permettant l'expression des immunogènes désirés; l'utilisation de vecteurs atténués avec des gènes délétés permettant l'insertion de transgènes; la mise au point de vaccins multivalents par la combinaison de différents antigènes protecteurs qui permet de réduire le nombre de vaccins différents à administrer; des vaccins polynucléotidiques utilisant l'ADN plasmidique (Kurstak, 1999). Toutefois un vaccin idéal doit rencontrer les critères suivants : 1) efficacité supérieure à 90% ; 2) conférer une immunité durable ; 3) ne nécessitant pas plus d'une dose ; 4) induction d'une réponse immunitaire mucosale, humorale et cellulaire ; 5) pouvant être administré oralement ; 6) coûts faibles ; 7) stable génétiquement et thermiquement ; 8) pas de risque de réversion ; 9) compatible à une co-administration avec d'autres vaccins (Babiuk, 1999).

Les vaccins sous-unitaires contiennent des antigènes purs ou semi-purs et il est crucial d'identifier lesquels sont responsables spécifiquement de la protection. En effet, cette sélection permettra d'éliminer les protéines contenues dans la cellule entière et qui auraient un rôle immunosuppressif potentiel. Toutefois, l'intérêt de ce type de vaccin est dans l'amélioration de la sécurité, la réduction de la compétition antigénique, la possibilité de différencier les individus vaccinés des non vaccinés et de pouvoir orienter le vaccin au site de prédilection (Babiuk, 1999). Au lieu d'exprimer une seule protéine, il est possible de développer des gènes chimères contenant les épitopes majeurs de différents pathogènes et ce concept est dénommé 'String of beads vaccine' (Whitton *et al.*, 1993). De même en plus de la combinaison d'épitopes, d'autres molécules peuvent être greffées par exemple des immunomodulateurs comme les cytokines (Interféron gamma, IL-2 et autres) (Hughes et Babiuk, 1992).

Également, un vaccin sous-unitaire peut être produit par synthèse chimique de courtes chaînes polypeptidiques. En effet, cette dernière technique présente des avantages qui



consistent en une meilleure stabilité physique et chimique, une facilité de production et une diminution des contraintes de biosécurité. Néanmoins le grand facteur limitant de ce type de vaccin peptidique est leur faible immunogénicité et leur rapidité de dégradation in vivo (Babiuk, 1999).

Les vaccins vivants peuvent être produits en sélectionnant des mutants avirulents capables de causer une infection mais pas la maladie. Ces mutations sont obtenues par traitement des microorganismes à l'aide d'agents chimiques, de la chaleur ou des passages in vivo ou in vitro (Babiuk, 1999). Cette méthodologie présente des désavantages par le fait qu'on ne peut contrôler le nombre de mutations et le risque élevé de réversion. Néanmoins le problème du ciblage du lieu ou des lieux de mutation(s) peut être amélioré par les techniques de biologie moléculaire.

Depuis quelques années l'immunisation polynucléotidique prend de l'envol. Cette immunisation est basée sur des vaccins à ADN qui permettent l'expression des gènes d'intérêt dans les cellules transfectées (Wolff *et al.*, 1990). En effet, cette vaccination permettrait de diminuer les coûts, d'amoindrir les risques de réversion, de respecter la conformation antigénique normale, d'induire aussi bien une réponse immunitaire cellulaire que humorale et la protection conférée serait durable (Gilkeson *et al.*, 1995; Lewis *et al.*, 1997). Actuellement plusieurs protocoles cliniques sont en cours aussi bien chez l'homme que chez les différentes espèces animales. La vaccination constitue le meilleur moyen de lutte dans la prophylaxie contre les maladies infectieuses. Toutefois la plupart des microorganismes infectent ou traversent les muqueuses durant les premières phases de l'infection, d'où l'intérêt de la réponse immune mucoale pour contrer ce genre d'infection. En effet, pour activer cette immunité mucoale plusieurs stratégies sont possibles, parmi lesquelles l'utilisation de vecteurs bactériens et notamment les vecteurs bactériens vivants (Medina et Guzman, 2000a).

Parmi les bactéries utilisées, on peut citer entre autres:

*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp, *Yersinia enterocolitica*, des bactéries commensales comme les *Lactobacillus*, *Mycobacterium bovis*, *Bacillus anthracis*...

Le type de microorganisme choisi comme vecteur a une grande importance sur la nature de la sous population de cellules T stimulées suivant la vaccination. En effet, il est connu que l'infection par *Listeria monocytogenes* stimule essentiellement la population cellulaire T CD8 + alors que l'infection à Salmonelles induit les cellules T CD4 + (Flynn *et al.*, 1990; Nauciel, 1990). Cette caractéristique qu'a *Listeria* comme vecteur vivant est reliée au fait qu'en infectant les cellules, cette bactérie se localise essentiellement dans le cytoplasme et par conséquent ses antigènes seront présentés de la même manière que les protéines endogènes au CMH de classe I (Kaufmann, 1993; Shirai *et al.*, 1994). Pour ce qui est de *Salmonella typhimurium*, il semble que chez le porc cette espèce infecte les plaques de Peyer puis colonise l'intestin et les nœuds lymphatiques mésentériques (Stabel *et al.*, 1993). En plus du choix de vecteur, la nature de la ou des mutations sur le vecteur et le type de promoteur influencent fortement la réponse immune en aval (VanCott *et al.*, 1998; Medina *et al.*, 1999; Medina *et al.*, 2000b). Toutefois ces vecteurs vivants présentent des désavantages notamment: les risques élevés de réversion, la stabilité relative du phénotype recombinant, le transfert horizontal de gène et la présence d'une immunité préexistante (Diaz *et al.*, 1994; Attridge *et al.*, 1997; Klee *et al.*, 1997).

Cependant les souches atténuées de bactéries intracellulaires sont des candidates idéales pour stimuler l'immunité à médiation cellulaire. Il est convenu qu'en général, les antigènes bactériens qui restent dans le phagosome sont en premier présentés par le CMH de classe II aux cellules T CD4. Par contre lors de la division bactérienne dans le cytosol des cellules infectées, ces antigènes sont présentés aux cellules T CD8+ par le CMH de classe I (Kaufmann, 1993; Gentshev *et al.*, 2001).

Les mécanismes de protection contre les infections respiratoires des muqueuses sont à ce jour mal cernés. Pour la plupart des auteurs la classe des anticorps IgA sécrétoires (sIgA) est l'isotype prédominant dans les éléments de protection contre les infections mucosales. La voie intrapéritonéale peut induire une mémoire immunologique sous forme de cellules mémoires IgA spécifiques à l'antigène. Toutefois en fonction de l'antigène, de la voie d'administration et du protocole, les cellules mémoires IgA peuvent migrer via le système lymphoïde pour atteindre des sites distants (Malech et Gallin, 1987; Medina et Guzman, 2000a).

## 4.2 Adjuvants

Le terme adjuvant vient du latin « *adjuvare* » qui peut être traduit littéralement par « aider ». De nos jours le terme « adjuvant » désigne tout matériel qui augmente d'une manière spécifique la ou les réponse(s) humorale et/ou cellulaire aux antigènes. Toutefois certains activateurs non spécifiques de la réponse immune peuvent être considérés comme « adjuvant » dès lors que l'administration simultanée avec un antigène permet une augmentation de la réponse immune spécifique. Parmi ces activateurs non spécifiques pouvant agir comme adjuvants fonctionnels on peut citer : les lipopolysaccharides (LPS), le diphosphoryl lipide A (DPL), les cellules entières de différentes espèces de *Mycobacterium*, la toxine de *Bordetella pertussis* et autres (Dalsgaard *et al.*, 1990; Cox et Coulter, 1997; Grdic *et al.*, 1999).

Les adjuvants jouent un rôle très important dans l'efficacité des vaccins et ils sont de plus en plus purifiés. Les adjuvants à base de protéines recombinantes ou de peptides de synthèse sont plus sécuritaires que ceux faits avec des microorganismes entiers inactivés, cependant ils sont moins immunogéniques. Plusieurs molécules ont les propriétés d'adjuvants et on pourrait les classer selon leur propriété particulière ou non, de même que selon leur origine. Les différentes sources d'adjuvant peuvent être : végétale comme l'extrait de glycan, bactérienne comme la toxine cholérique ou les lipopolysaccharides, chimique comme l'hydroxyde d'alumine ou les surfactants et nouvellement une quatrième catégorie comprenant les cytokines comme l'INF-gamma et les hormones comme la dihydroxyepiandrosterone (DHEA) (Audibert et Lise, 1993; Cox et Coulter, 1997; Aucouturier *et al.*, 2001). En effet, le bon adjuvant permet de réduire la dose à administrer ou de diminuer la concentration de l'antigène et indirectement entraîner un coût moins élevé du vaccin.

La plupart des adjuvants pour les vaccins vétérinaires sont sous forme d'émulsions. Dans la formulation des vaccins, on retrouve deux phases : une aqueuse (milieu contenant l'antigène) et une autre phase qui est huileuse. Pour stabiliser parfois les émulsions, des composés contenant un groupe polaire hydrophile et un autre groupe non polaire hydrophobe appelés surfactants peuvent être utilisés (Dalsgaard *et al.*, 1990). Toutefois, il

n'y a pas d'adjuvant idéal et il faudra l'adapter tout en maintenant un équilibre entre l'innocuité et l'efficacité. Les huiles minérales peuvent être utilisées avec les antigènes non réactifs comme les protéines purifiées ou les peptides synthétiques. Pour ce qui est des huiles non minérales, il est préférable de les utiliser avec les antigènes réactifs comme les bactéries entières (Barnett *et al.*, 1996; Aucouturier *et al.*, 2001). On retrouve également d'autres types d'adjuvants à l'état expérimental et il s'agit notamment de:

-L'ADN contenant des dinucléotides CpG non méthylés qui a un potentiel immunostimulateur. Ces motifs consistent en des dinucléotides CpG non méthylés ayant deux purines en 5' et deux pyrimidines en 3'. La stimulation du système immunitaire par les motifs CpG se caractérise par la production de cytokines de type Th1 (Gallichan *et al.*, 2001; McCluskie *et al.*, 2001). Les oligodeoxynucléotides (ODN) contenant des motifs CpG (CpG ODN) peuvent être de bons adjuvants s'ils sont administrés par voie mucoale (intranasale, orale ou intrarectale). En effet, ces CpG ODN permettent la stimulation de la prolifération des cellules B qui sécréteront des immunoglobulines et des cytokines (IL-6 et IL-12). D'autre part, ces adjuvants activent les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques qui à leur tour sécréteront diverses cytokines et chémokines (McCluskie et Davis, 1999; McCluskie *et al.*, 2000a; McCluskie et Davis, 2000b). En effet, ces CpG ODN agissent par le biais de récepteurs d'immunoglobulines se trouvant à la surface des cellules B et des macrophages, entraînant une activation polyclonale des cellules B et la translocation nucléaire de NF $\kappa$ B qui contrôle l'induction des ARN<sub>m</sub> de TNF- $\alpha$  au niveau des macrophages (Lipford *et al.*, 1997; Sparwasser *et al.*, 1997; Rykova *et al.*, 1999). Il a été démontré depuis, que parmi les récepteurs impliqués on retrouve les Toll-like receptors (TLR) et plus exactement le TLR9 qui est exprimé d'une manière intracellulaire chez les cellules B et dendritiques de l'homme, alors que ce récepteur peut se retrouver au niveau des monocytes et des macrophages chez la souris (Latz *et al.*, 2004; Vollmer *et al.*, 2004).

### 4.3 Vaccination contre *Mycoplasma hyopneumoniae*

Les vaccins actuels ne procurent qu'une protection partielle contre les lésions à *M. hyopneumoniae* et par conséquent sont incapables de prévenir l'infection pulmonaire (Thacker *et al.*, 1999).

#### 4.3.1 Vaccins conventionnels

La plupart des vaccins utilisés actuellement contre les infections à *M. hyopneumoniae* sont à base de cellules entières tuées (bactérines). Ces préparations sont administrées après les avoir mélangées avec un adjuvant. Elles ont démontré une capacité de protection partielle contre le développement de lésions pulmonaires lors d'infections expérimentales; cependant, les porcs vaccinés ne semblent pas être protégés contre une infection naturelle (Kristensen *et al.*, 1981). D'autre part, cette efficacité relative n'est observée que si deux doses de vaccin sont administrées à la première et quatrième semaine d'âge (Kyriakis *et al.*, 2001). Les vaccins à base de bactérine peuvent induire une réponse humorale et cellulaire avec une composante mucosale locale (Thacker *et al.*, 2000a). Une combinaison de deux bactérines de *M. hyopneumoniae* et d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* comme vaccin permet une réduction des lésions de la pneumonie enzootique mais pas celles de la pleuropneumonie (Wongnarkpet *et al.*, 1999). Des résultats similaires à ceux obtenus avec les bactérines ont été rapportés en utilisant un vaccin inactivé fait à partir d'un surnageant de milieu de culture de *M. hyopneumoniae* (Okada *et al.*, 1999). Néanmoins, malgré l'induction par ces vaccins d'une immunité humorale, la protection conférée est limitée et ils ne peuvent prévenir la colonisation du tractus respiratoire par *M. hyopneumoniae* (Thacker *et al.*, 1998).

Pour pouvoir cibler l'immunité mucosale et administrer ces vaccins par voie orale, des véhicules appelés microsphères sont utilisés dans certaines études. En effet, cette méthode d'administration des vaccins par voie orale utilisant les microsphères comme véhicule permet également de contrôler la dose à administrer (Akiyama Y, 1994). L'intérêt pour cette méthode d'administration est motivé par l'hypothèse que l'immunité mucosale

pourrait avoir un rôle important de défense dans les infections à *Mycoplasma hyopneumoniae*, du fait que la première phase de colonisation se fait au niveau des cellules épithéliales ciliées (DeBey *et al.*, 1992; Thacker *et al.*, 2000a). En plus, certaines études ont déjà démontré, que l'administration par voie orale d'un vaccin pourrait stimuler le système GALT (gut-associated lymphoid tissues) et par conséquent promouvoir la sécrétion d'immunoglobulines A (IgA) (Liao *et al.*, 2001)

Des vaccins à base de fractions membranaires sont utilisés et ceci après avoir dénaturé les cellules entières dans un tampon de dénaturation. Cependant des porcs immunisés avec un complexe de protéines allant de 70 à 80 kDa ont montré une réduction du pourcentage de lésions par rapport au contrôle mais l'analyse sérologique rend les conclusions mitigées (Djordjevic *et al.*, 1997).

Une étude portant sur quatre vaccins commerciaux à base de bactéries tuées a montré que ces derniers induisaient une protection contre les infections expérimentales et que cette protection est fonction du type de vaccin et de l'individu (Thacker *et al.*, 1998). De même, la cinétique d'apparition des anticorps était très variable et la spécificité contre les protéines immunodominantes également, pouvant aller jusqu'à la non reconnaissance de certaines protéines par les sérums convalescents (Thacker *et al.*, 1998). Ces variations probables cautionnent la nécessité d'avoir d'autres vaccins plus efficaces et constants dans la réponse induite.

#### **4.3.2 Vaccins expérimentaux**

L'incapacité des vaccins conventionnels à empêcher la colonisation du tractus respiratoire et le problème lié à la difficulté de pouvoir discriminer entre animaux vaccinés et infectés, justifient l'orientation vers de nouvelles mises au point de vaccins. En effet, l'affinement des techniques de biologie moléculaire et celles de production de protéines recombinantes sont à l'origine de cette nouvelle génération de vaccins.

Une nouvelle méthode pour cibler la stimulation de l'immunité mucoale est l'utilisation de bactéries atténuées comme vecteurs. Ces vaccins sont basés sur le clonage des gènes d'intérêt potentiellement impliqués dans la protection contre *M. hyopneumoniae* dans un vecteur bactérien Gram positif ou Gram négatif. Concernant *M. hyopneumoniae*, il s'agit essentiellement de *Salmonella typhimurium* et de *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Fagan *et al.*, 1997; Shimoji *et al.*, 2002).

La portion C-terminale du gène P97 de *M. hyopneumoniae* a été cloné dans la souche *E. rhusiopathiae* YS-19 mais la protection conférée par ce vaccin lors d'une infection-défi expérimentale est très mitigée (Shimoji *et al.*, 2003).

D'autre part une souche atténuée dénommée *Salmonella typhimurium* aroA SL3261 a été utilisée pour exprimer la partie carboxy-terminale (11kDa) de la protéine sous unitaire R2 de la réductase ribonucléotidique (NrdF) de 42 kDa et une immunisation par voie orale a induit une réponse mucoale en IgA. En effet, le choix de cette portion de protéine est essentiellement basé sur le fait qu'elle est fortement reconnue par le sérum hyperimmun de porc. D'autre part, le sérum de lapin contre cette protéine peut inhiber la croissance in vitro de la souche J de *M. hyopneumoniae* (Fagan *et al.*, 1997; Fagan *et al.*, 2001).

Un vaccin à ADN fait à partir du clonage du gène de la protéine de stress P42 dans un vecteur plasmidique pcDNA3 a été utilisé (Chen *et al.*, 2003). L'immunisation des porcs par ce plasmide recombinant (pcDNA3/P42) a induit une réponse immune de types Th1 et Th2 et les sérums de porcs immunisés peuvent inhiber la croissance de *M. hyopneumoniae* (Chen *et al.*, 2003). En effet, ces résultats préliminaires donnent un espoir de pouvoir utiliser l'immunisation génétique comme une alternative potentielle.

Des vaccins sous-unitaires à base de protéines recombinantes qui sont des produits du clonage de gènes codant pour certaines protéines de *M. hyopneumoniae* dans différents systèmes ont été testés. Essentiellement, le clonage et l'expression de la partie carboxy-terminale (11kDa) de la protéine sous unitaire R2 de la réductase ribonucléotidique (nrdF) fusionnée à la  $\beta$ -galactosidase. Cette protéine de fusion ( $\beta$ -galactosidase-nrdF) a été

utilisée pour immuniser des porcs et à la suite d'une infection défi une réduction des lésions pulmonaires était observée (Fagan *et al.*, 1996)

Enfin, une adhésine de 124 kDa (Mhp1) de *M. hyopneumoniae* fusionnée à la glutathione-S-transférase (GST) fut utilisée pour vacciner des porcs et les résultats ne sont pas significatifs comparés aux porcs contrôles (King *et al.*, 1997).

Considérant les problèmes associés à la prophylaxie préventive et curative, par l'inefficacité de l'antibiothérapie et la protection mitigée induite par les vaccins actuels, il serait important d'explorer de nouvelles avenues afin de développer de nouveaux vaccins. Des recherches supplémentaires sont nécessaires en vue du développement et de l'évaluation de vaccins contre la pneumonie enzootique porcine. Entre autres, des études portant sur le clonage et la production des protéines recombinantes de *M. hyopneumoniae*, sur la variabilité antigénique et génétique des protéines immunodominantes seraient nécessaires. L'étude du potentiel vaccinal de ces protéines recombinantes est un pré-requis indispensable au développement de vaccins sous-unitaires efficaces. En effet, les infections secondaires causées par *M. hyopneumoniae* occasionnent d'importantes pertes économiques à l'industrie porcine. Un vaccin efficace contre cette infection pourrait non seulement permettre de prévenir et contrôler ce pathogène, mais permettrait de réduire le potentiel de risque par l'adjonction d'autres agents infectieux.

Durant cette étude, nous avons ciblé les protéines P46, P65 et P97 de *M. hyopneumoniae*, du fait que ce sont des protéines immunodominantes de *M. hyopneumoniae* et qu'elles semblent jouer un rôle important dans la pathogénie de l'infection. Nous avons étudié l'utilisation potentielle des anticorps monoclonaux dans le diagnostic des infections à *M. hyopneumoniae*. D'autre part, l'immunogénicité de ces protéines chez le porc et le suivi de la cinétique d'apparition des différents anticorps ont été analysés. Finalement, nous avons évalué le potentiel vaccinal des différentes protéines recombinantes chez le porc.



**SECTION II**

**PUBLICATIONS**

Monoclonal Antibodies to *E. coli*-expressed P46 and P65 Membrane-Associated Proteins for Specific Immunodetection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Lungs of Infected Pigs

K. CHEIKH SAAD BOUH, F. SHARECK AND S. DEA\*

INRS-Institut Armand-Frappier Université du Québec, 531 boul. des Prairies, Laval,  
P.Q., Canada, H7V 1B7.

Running title: SPECIES-SPECIFIC MAbS TO *M. HYOPNEUMONIAE* P45 AND P65

*\*Corresponding author*

**Mailing address:** INRS-Institut Armand-Frappier  
Université du Québec  
531, boul. des Prairies  
Laval, Qc, Canada  
H7V 1B7

**Clin Diagn Lab Immunol 2003 May;10(3):459-68**

## Résumé

La protéines membranaires P46 et la P65 de *Mycoplasma hyopneumoniae* contiennent des déterminants antigéniques spécifiques à l'espèce. Des amorces ont été générées, en se basant sur la séquence de la souche de référence ATCC 25934, pour les gènes P46 (1 260 pb), P65 (1 803 pb) et P65c tronquée (1 200 pb). Ces amorces sont spécifiques à *M. hyopneumoniae* puisqu'aucune amplification n'a été observée avec d'autres mycoplasmes retrouvés au niveau des voies respiratoires porcines. Les gènes ont été clonés dans le vecteur pGEX-4T1 et sont exprimés dans *Escherichia coli* comme des protéines de fusion avec la glutathione S-transférase (GST). Avant de générer ces constructions, les codons TGA qui codent exceptionnellement chez *M. hyopneumoniae* pour des résidus de tryptophane, ont été convertis en codons TGG par la technique de mutagenèse dirigée par PCR. Après induction avec l'IPTG, les deux protéines de fusion, GST-P46 et GST-P65c, ont été récupérées par sonication des cellules transformées, purifiées par chromatographie d'affinité et ensuite clivées avec la thrombine pour libérer les protéines P46 et P65c. Les protéines ont été utilisées pour immuniser des souris Balb/c femelles en vue de la production d'anticorps monoclonaux (AcMos). La spécificité des AcMos a été confirmée par immunobuvardage de type Western avec des lysats cellulaires de *M. hyopneumoniae*. La réactivité des AcMos anti-P46 et anti-P65c à l'égard de deux souches de référence de *M. hyopneumoniae* (ATCC 25095 et la souche J) et une souche de champs du Québec isolée en culture suggère que ces AcMos obtenus contre les deux protéines membranaires sont dirigés contre un ou des épitopes très conservés et spécifiques à l'espèce. Aucune réactivité n'a été observée envers d'autres espèces de mycoplasmes testées. Les signes cliniques et les lésions suggérant une pneumonie enzootique furent reproduits chez les porcs SPF, qui avaient été inoculés par voie intratrachéale avec la souche virulente de champs du Québec (IAF-DM9827) de *M. hyopneumoniae*. En effet, suite à des analyses par tests d'immunofluorescence indirecte sur des coupes de poumons congelés et d'immunoperoxydase sur des coupes fixées au formol et paraffinées, les AcMos anti-P46 et anti-P65c ont permis la détection spécifique de *M. hyopneumoniae* chez les porcs infectés et sacrifiés 6 à 7 semaines post-infection.

## ABSTRACT

The P46 and P65 proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* are two membranous proteins carrying species-specific antigenic determinants. Based on the genomic sequence of the reference strain ATCC 25934, primers were designed for PCR amplification of the entire P46 (1,260bp) and P65 (1,803bp), and N-terminal truncated P65<sub>c</sub> (1,200bp) encoding genes. These primers were shown to be specific to *M. hyopneumoniae* since no DNA amplicons could be obtained with other mycoplasma species that commonly colonize the porcine respiratory tract. Both amplified genes were then cloned into the pGEX-4T-1 vector to be expressed in *Escherichia coli* cells as recombinant fusion proteins with glutathione S-transferase (GST). Prior to generation of expression constructs, TGA non-sense codons, exceptionnaly used for tryptophan residues by *M. hyopneumoniae*, had been converted to TGG codons by PCR directed mutagenesis. Following induction by IPTG, both GST-P46 and GST-P65<sub>c</sub> recombinant fusion proteins were recovered by disrupting transformed cells by sonication, purified by affinity chromatography, then cutted with thrombin to release the P46 and P65<sub>c</sub> moieties. The enriched *E. coli*-expressed P46 and P65<sub>c</sub> proteins were used to immunize female Balb/c mice for the generation of anti-P46 and anti-P65<sub>c</sub> monoclonal antibodies (MAbs). The polypeptide specificities of MAbs obtained was confirmed by Western blotting with cell lysates prepared from the homologous strain. Cross-reactivity study of the anti-P46 and anti-P65<sub>c</sub> MAbs towards two other *M. hyopneumoniae* reference strains (ATCC 25095 and J strains), and Quebec field strains that had been isolated in culture, suggested that the MAbs obtained against both membranous proteins were directed against highly conserved species-specific epitopes. No reactivity was demonstrated to other mycoplasma species tested. Clinical signs and lesions suggestive of enzootic pneumonia were reproduced in SPF pigs that had been inoculated intratracheally with a virulent Quebec field strain (IAF-DM9827) of *M. hyopneumoniae*. Both, anti-P46 and anti-P65<sub>c</sub> MAbs permitted effective detection by indirect immunofluorescence and indirect immunoperoxidase of *M. hyopneumoniae* in, respectively, frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded lung sections from pigs that were killed after the 6-7-week observation period.

## INTRODUCTION

*M. hyopneumoniae* is the causative agent of enzootic pig pneumonia, a disease found in pig farms worldwide and characterized by high morbidity and low mortality rates (16,23). Coughing is the main clinical sign, but retarded growth and poor food conversion may result in considerable economic losses (23, 27). This microorganism predisposes pigs to secondary infections that increase the mortality rates such as infections by porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and swine influenza virus (34).

The diagnosis of *M. hyopneumoniae* is usually done by PCR, cultivation of the organism in enriched Friis medium or by immunofluorescence tests performed on frozen thin lung sections (1,3, 5, 6, 18, 20, 26). The culture of this fastidious bacteria and its identification may take up to one month. Contamination with *M. hyorhinis* and *M. flocculare*, both considered as non-pathogenic species, is frequently observed. These less fastidious non-pathogenic species may often overgrow *M. hyopneumoniae* in primary isolation attempts (9), from which the necessity to discriminate amongst porcine mycoplasmas having a respiratory tropism. Moreover, the overall efficacy of serological detection methods, such as ELISAs, is often hampered because of antigenic cross-reactions that exist between *M. hyopneumoniae*, *M. flocculare* and *M. hyorhinis* (2, 19).

*M. hyopneumoniae* genome encodes for several immunodominant proteins, amongst which are the P36 cytosolic protein, the P46, P65 and P74 membranous proteins and the P97 adhesin. These proteins are known to trigger early specific antibody responses in post-weaning and growing pigs following acute or initial infection with *M. hyopneumoniae* (12,15,20). The corresponding open reading frames (ORFs) are 1,260bp long for P46 surface lipoprotein and 1,803bp long for P65 lipid-modified amphiphilic surface protein. Sequences analyses P45 and P65 encoding genes revealed the presence of respectively three and one translation termination or non-sense TGA codons, which are exceptionnaly used for tryptophan residues, in addition to TGG in several mycoplasma genes (15).

The indirect immunofluorescence (IIF) assay is still widely used for diagnosis of *M. hyopneumoniae* since it is a rapid and convenient technique for detection of specific antigens in lung tissues. However, in frozen tissue sections, micro-structures are most frequently broken and difficult to recognize, and the use of polyclonal antisera may result in non specific detection of other pathogens, namely *M. flocculare* and *M. hyorhinis*. On the other hand, the use of MAbs increases the specificity of serological and immunohistochemical antigen detection tests (1,19,24).

This paper describes site-directed mutagenesis of TGA codons of the P46 and P65 genes into TGG codons by overlapping-PCRs. The modified P46 encoding gene, as well as the C-terminal portion of the modified P65 encoding gene, were cloned in a procaryotic plasmid vector to allow expression of the entire P46 and N-terminus truncated P65<sub>c</sub> membranous lipoproteins, in genetically transformed *E. coli* cells, as recombinant fusion proteins with glutathione S-transferase (GST). The production and characterization of specific anti-P46 and anti-P65<sub>c</sub> MAbs are also described, as well as, their potential application for the specific immunodetection of *M. hyopneumoniae* authentic membranous proteins by IIF and streptavidin-biotin immunoperoxidase assays using frozen or paraffin-embedded lung sections, respectively. The immunogenicity of the recombinant fusion proteins was also investigated in pigs.

## MATERIALS AND METHODS

### Microorganisms and growth conditions

The ATCC 25934 strain of *M. hyopneumoniae* was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Md, and used as the reference strain in this study. Other mycoplasma strains including the reference ATCC 25095 and J strains of *M. hyopneumoniae*, *M. flocculare* (ATCC 27399), *M. arginini* (ATCC 23838), *M. hyorhinis* (ATCC 17981) and *Acholeplasma laidlawii* (ATCC 23206) were also obtained from the ATCC and used in comparative antigenic studies. *M. hyosynoviae* was kindly obtained from Dr. Claude Montpetit, Ministère de l'Agriculture des Pêcheries et de l'Alimentation

du Québec. All available strains were grown in modified Friis medium (13) containing mycoplasma culture-tested free 20% horse serum (Gibco-BRL, New Zealand), 5% fresh yeast extract (Gibco-BRL), methicillin (0.15 mg/ml; Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada), bacitracin (0.15mg/ml; Sigma-Aldrich) and thallium acetate (0.08mg/ml; Sigma-Aldrich). The cells were harvested by centrifugation at 12,000 x g for 30 min at 4°C, washed three times and suspended in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4.

### DNA extraction and PCR conditions

Genomic DNA from *M. hyopneumoniae* was extracted and purified, as previously described (6). The oligonucleotide primers used for enzymatic amplification of the entire open reading frames (ORFs) of the P46 (1,260bp) and P65 (1,803 bp) genes of *M. hyopneumoniae* were selected from the previously published DNA sequences of the ATCC 25934 strain (Genbank accession no. D16682 and U50209 respectively). Sequences of the forward primers for specific amplification of the P46 and P65 encoding genes, P46BamH1 and FSLP65, were respectively

5'-ACCGGATCCATGAAAAAATGCTTAGAAAAAATT-3' and

5'-GGCCGGGAATTCATGGCAAAGAAATCATTTTA-3 and those of the reverse primers, P46Sal1 and R2SP65, were respectively

5'-CCCGTCTGACTTAGGCATCAGGATTATCAAC-3' and

5'-GGGCCGGTCTGACTTAATCCTGCTTGATTTCAGCATC-3'.

Sequence analyses for the selection of primers were performed using the Mac Vector 3.5 (International Biotechnologies) and Gene works 2.2 (Intelligenetics-Inc., Mountain view, California) programs. The oligonucleotide primers were synthesized in an automated Gene Assembler DNA synthesizer (Pharmacia LKB). The PCR protocol used for amplification of the P46 and P65 genes was essentially similar to that described previously (6). The amplification reactions were performed in a DNA Engine thermocycler (MJ Research, model PTC-100 with hot bonnet). To overcome the error rate of the *Taq* DNA polymerase, the Vent<sub>R</sub><sup>®</sup> DNA polymerase was rather used for the amplification reaction, and clones from at least three different PCR events were sequenced. Aliquots of

10 µl of the amplified products were analyzed by electrophoresis on 1% agarose gels (Boehringer Mannheim) in TAE buffer (40 mM Tris-acetate [pH8.5], 2 mM EDTA) in the presence of ethidium bromide at 100 V for 1 hour and viewed under UV illumination. Sequencing of cDNA clones was performed on both strands by the dideoxynucleotide chain-termination modified method (Sanger et al, 1977), using T7 DNA polymerase with an Automated Laser Fluorescent DNA sequencer (Pharmacia LKB).

### **Directed mutagenesis of TGA codons by PCR**

The replacement of non-sense TGA codons by TGG codons (tryptophane ) within the P46 and P65 genes was performed using overlapping sense and antisense oligonucleotidic primers in PCR assays done with cDNA clones that have been obtained from previous amplification reactions. The location in the targeted gene and size of expected modified DNA fragments generated with different primer pairs are depicted in Table 1. The DNA fragments obtained following directed mutagenesis of TGA codons in TGG codons were then ligated by PCR using previously described primer pairs used to amplify the entire P46 encoding gene (1,260 bp), but only the C-terminal region of P65 gene (1,200 bp) (P65<sub>c</sub>). For directional cloning, two restriction sites (*Bam*H1 and *Sal*1) for P46 gene and two other (*Bam*H1 and *Sal*1) for P65<sub>c</sub> N-terminus truncated gene were added at the 5' and 3' ends of oligonucleotidic primers. After amplification of expected DNA fragments, all the constructs were sequenced to confirm that changes from A to G occurred at the third position of the triggered codons.

### **Cloning, procaryotic expression and purification of GST-P46 and GST-P65<sub>c</sub> recombinant fusion proteins**

The amplified products were purified using the GFX purification kit (Pharmacia), digested with *Bam*H1 and *Sal*1 for P46 or *Bam*H1 and *Sal*1 for P65<sub>c</sub>, and finally ligated into similarly digested pGEX-4T1 procaryotic vector, according to the manufacturer's instructions (Pharmacia). The recombinant plasmids were used to transform competent *E. coli* cells, strain HB101, to obtain more copies of recombinant plasmids and for a better



efficacy of ligation. Then appropriate clones were used to transform BL21DE3 cells (Gibco-BRL) to for a more intense expression of the glutathione S-transferase (GST)-P46 and GST-P65<sub>c</sub> recombinant fusion proteins. Briefly, overnight cultures of transformed bacteria were diluted 1:10 in a total volume of 120 ml of LB medium containing ampicillin (100 µg/ml) and incubated at 37° C with shaking (250 rpm) to a A<sub>600</sub> values of 0.6 to 0.8. Protein expression was induced by the addition of 0.1 to 0.5 mM of isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) and after a 5h-incubation period at 28°C with vigorous shaking (250 rpm), the cells were pelleted by centrifugation at 8.000 x g, then resuspended in 6.25 ml of ice-cold 0.1 M PBS (pH 7.4) containing 1mM phenyl-methylsulfonylfluoride (PMSF; Boehringer Mannheim). Transformed cells were disrupted by sonication, and Triton X-100 (sigma-Aldrich) was added to a final concentration of 1%, followed by a 30 min incubation period at room temperature to aid solubilization process. The soluble recombinant fusion proteins were purified by affinity chromatography on glutathione-Sepharose 4B beads (Pharmacia) and either eluted with reduced glutathione (20mM glutathione, 50mM Tris-HCl[pH 8.0], 120mM NaCl) (28) or directly cleaved by the addition of 18 U of thrombin followed by a subsequent overnight incubation period to obtain the P46 and P65<sub>c</sub> moieties.

### **Production and characterization of MAbs to P46 and P65<sub>c</sub> membranous proteins**

In vivo experiments in mice were approved by the INRS-IAF Animal Care Committee under the supervision of the Canadian Association for Animal Care. Female BALB/c mice were immunized with 20 µg of affinity purified GST-P46 and GST-P65<sub>c</sub> recombinant fusion proteins mixed with Freund's complete or incomplete adjuvant for the first and second injections, respectively. Intraperitoneal injections were given at 2 week-intervals, followed by an intraperitoneal dose of the antigen without adjuvant 3 days prior to the fusion experiment. The fusion protocol for sensitized splenocytes with SP2/O-Ag14 myeloma cells was essentially similar to that previously described (7). Hybrid cells were cultured in Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine (HAT) medium containing 15% fetal calf serum. Hybridoma supernatants were screened for the presence of anti-P46 and anti-P65<sub>c</sub> antibodies by an indirect ELISA as described elsewhere (7). The use of GST coated

plates permitted to eliminate all clones directed against GST. The optimal GST-P46 and GST-P65<sub>c</sub> antigen concentration coated in the wells of a 96-well microplates was determined by checkerboard titration and corresponded to 0.15µg of protein/well. In the indirect ELISA, the washing buffer consisted of 0.1M PBS (pH 7.4) containing 0.05% tween 80 (PBS-T), and the saturation or dilution buffer consisted of PBS-T supplemented with 5% goat serum and 3% skim milk (blotto). The secreting hybridoma cells were subcloned twice by serial dilutions and immunoglobulin isotyping was done using a commercial enzyme immunoassay (Boehringer Mannheim). Ascitic fluids containing anti-P46 or anti-P65<sub>c</sub> MAbs were obtained by intraperitoneal injection of  $1 \times 10^6$  to  $2 \times 10^6$  cloned hybrid cells into 16-week-old female Balb/c mice that had been primed 14 days before with 0.5 ml of pristane (2,6,10,14-tetramethyl pentadecane, Sigma-Aldrich).

### **Western immunoblotting**

*Mycoplasma* proteins separated by electrophoresis using 12% SDS-polyacrylamide gel (PAGE) were electrotransferred to nitrocellulose membranes (0.45µm pore size; Xymotech) for 1h at 100V, as previously described (25). Membranes were blocked for 2 h in PBS buffer (pH 7.4) containing 0.5% Tween 80 (PBS-T), 5% goat serum and 3% skim milk and cut into 2-3 mm-wide strips. Each strip was incubated for 1h at room temperature in the presence of either a 1:200 to 1:1000 dilution of porcine hyperimmune serum, or a 1:1000 dilution of mouse ascitic fluid in the blocking buffer. The immune reactions were revealed following an 30 min incubation into a 1:2000 dilution of the appropriate peroxidase-labeled anti-immunoglobulin G (Ig G) conjugate, followed by a final incubation period in the enzyme substrate solution, as previously described (7).

### **Immunogenicity of *E. coli*-expressed proteins in pigs**

In vivo experiments in pigs were approved by the INRS-IAF Animal Care Committee under the supervision of the Canadian Asssocation for Animal. *E. coli*- expressed GST-P46 and GST-P65<sub>c</sub> proteins were used to immunize eight 4 to 5 –weeks- old- SPF piglets obtained from a breeding farm located in Southern Quebec, Canada. The breeding stock

and piglets were tested and proven to be seronegative for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), encephalomyocarditis virus (EMCV), porcine parvovirus (PPV), haemagglutinating encephalomyelitis virus (HEV), transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and *M. hyopneumoniae*. They were found to be seronegative to *M. hyopneumoniae* by the routinely used commercial blocking ELISA (Dako) for detection of antibodies to a P74 membranous protein and were free of the agent by multiplex P36-P46 PCR done on nasal swabs (6). Two piglets were used as negative controls since they were inoculated with PBS only. The six other piglets were first inoculated intramuscularly (IM) with a mixture of 50µg of GST-P46 or GST-P65<sub>c</sub> or both recombinant fusion proteins poured in 200µl of a suspension 1:4 of PBS + vegetable oily adjuvant (Montanide<sup>®</sup> IMS 1313, SEPPIC). A booster dose was given at PID 21. Piglets were bled at PID 14, 21, 28. Presence of antibody titers to the GST-P46 or GST-P65<sub>c</sub> or to both membranous authentic proteins were confirmed by indirect ELISA using purified recombinant fusion proteins or lysates of authentic membranous proteins as antigens. The use of GST coated plates permitted to confirm the reactivity of pigs sera against recombinants proteins.

### **Experimental infection of SPF pigs**

Six crossbred F1 (Landrace X Yorkshire) castrated SPF pigs 5-to-6-week of age were obtained from the aforementioned breeding farm. Experimental inoculation of pigs by the intracheal route was conducted, as described (7). The animals were separated in two groups consisting of two control pigs that received only fresh Friis medium, whereas the remainder four pigs were received identical volume (8 ml) of a culture of the virulent IAF-DM9827 field strain of *M. hyopneumoniae*, corresponding to an infectious dose of 10<sup>7</sup> color-changing units/ml. Both groups of pigs were allocated to separate rooms in facilities equipped with microorganism free filtered in-flowing and out-flowing air system. The animals were followed clinically and serologically for a 7-week period, then euthanized. Their lungs were aseptically collected and processed for histopathology, PCR and cultivation attempts in modified Friis medium.

### **Microscopic analysis of tissue sections**

Thin sections (5 µm thick) of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from the lungs of experimentally-infected pigs were routinely processed for hematoxylin-eosin staining, as previously described (7).

### **Indirect immunofluorescence staining**

Thin frozen lung sections with typical lesions of enzootic pneumonia were mounted on glass slides and fixed with 100 % ice cold acetone. Once the slides were dried, they were incubated 1h at 37 °C with 100 µl of anti-P46 or anti-P65c MAbs at a dilution of 1 :100, washed in PBS and reacted similarly with fluorescein-conjugated goat anti-mouse IgA+ IgG +IgM (H+L) (KpL, MD) diluted 1:50 in PBS. After a further washing step, the fluorescent reaction was observed under an UV microscope (Leyca, Leitz Wetzlar, Germany).

### **Immunoperoxidase (IP) assay**

Paraffin-embedded sections were deparaffinized by immersing slides twice in toluene for 2 min and rehydrated in 100%, 95%, 80%, 70% ethyl alcohol, respectively. They were then immersed in distilled water and treated with 3% aqueous hydrogen peroxide for 30 min to inactivate endogenous peroxidases. After several washes in PBS (pH 7.4), they were treated for 15 min at 37°C with 0.05% protease (protease XIV, Sigma) diluted in pre-heated PBS (37°C). The slides were washed consecutively 3 times in preheated (37°C) PBS for 5 min and once in cold (4°C) PBS for 5 min. The MAbs directed against P46 or P65<sub>c</sub>, as well as negative porcine serum, were diluted 1:100 in blotto buffer, then poured on the slides. Following an incubation period of 90 min at 37°C, slides were washed 3 times in PBS for 5 min, then 5 min in blocking buffer which consisted of PBS containing 1% goat serum. Biotinylated sheep anti-mouse Ig (Boehringer Mannheim) or rabbit anti-pig IgG (Sigma) at a dilution of 1:1000 was poured on the slides, that were after incubated for 30 min at 37°C. Slides were then washed three times in PBS for 5 min and

reacted with peroxidase-conjugated streptavidin (Sigma-Aldrich) diluted 1:1000 in PBS + 1% goat serum, for 30 min at room temperature. Following three other washes of 5 min in PBS, sections were incubated with 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) for 10 min at room temperature and finally rinsed in distilled water for 10 min. Counterstaining was done with hematoxylin. After dehydration, lung sections were covered with mounting medium and coverslips .

## RESULTS

### **PCR amplification and directed mutagenesis of TGA codons of the P46 and P65 encoding genes**

Based on the reported sequences of the P46 (1,260) and P65 (1,803 membranous proteins genes of *M. hyopneumoniae* (strain ATCC 25934), oligonucleotide primers were designed as to permit amplification of the entire open reading frames (ORFs) of the targeted genes. The primer pairs P46BamH1-P46Sal1 and FSLP65-R2SP65 yielded DNA fragments of the expected size when PCR was performed with extracted genomic DNA from the homologous strain of *M. hyopneumoniae* (Fig.1). Both primers pairs were also tested for their capacity to amplify DNA fragments from the P46 and P65 genes of two other reference strains of *M. hyopneumoniae* (ATCC 25934 and ATCC 25095). Expected PCR amplification products from the P46 and P65 genes were obtained with both heterologous strains. No reactivity was obtained when the PCR was performed with genomic DNA extracted from *M. hyorhinis* and *Acholeplasma laidlawi* species that commonly infect pigs (data not shown). Sequencing analyses confirmed the identity of the two genes.

For several Mycoplasma genes, including *M. hyopneumoniae*, TGA codons are translated as tryptophan residues rather than corresponding to translational stop signals as in mammalian and other bacterial cells. For *M. hyopneumoniae*, the ORFs encoding for P46 (1260 bp) and P65 (1803 bp) possess 3 and 1 TGA codons, respectively. Therefore, DNA fragments within both targeted genes of the reference ATCC-25934 strain of *M. hyopneumoniae* were amplified by PCR using overlapping oligonucleotide primers that were specially designed such as to permit replacement of the TGA codons in TGG in the

DNA fragments (Table 1). The DNA fragments were then appropriately ligated, and the complete modified genes were amplified using primers previously used to amplify the entire P46 and P65 encoding genes. Further sequencing analysis confirmed that the three TGA codons located at positions 208, 301 and 760 of the 1,260 bp-P46 encoding gene and at position 631 of the 1,803 bp-P65 encoding gene had been replaced by TGG codons.

### **Cloning, procaryotic expression and purification of GST-P46 and GST-P65<sub>c</sub> recombinant fusion proteins**

The mutated P46 and P65 encoding genes were ligated into the procaryotic pGEX-4T1 vector (Pharmacia) and used to transform competent *E. coli*, strain BL21DE3 cells, to produce recombinant (rec) proteins fused to glutathione S-transferase (GST). The mutated constructs were cloned in pGEX-4T1 by using restriction sites *Bam*H1 and *Sal*I for the P46 gene or *Eco*R1 and *Sal*I for a N-terminus truncated P65 (P65<sub>c</sub>) gene fragment and the procaryotic pGEX-4T1 vector were digested by the same combinaison of restriction enzymes, respectively. Ligation steps were conduced overnight at 14°C. The transformed competent *E. coli* cells were then induced by the addition of IPTG in the culture medium to express the fusion proteins GST-P46 and GST-P65<sub>c</sub>. SDS-PAGE analysis of sonicated lysates of IPTG-induced transformed *E. coli* cells revealed the presence of two additional 72 kDa and 70 kDa protein species. Those proteins species could not be detected neither in lysates prepared from non-induced bacteria, nor in lysates prepared from non-transformed bacteria. The molecular masses ( $M_r$ ) of both recombinant proteins, as estimated from the electrophoretic migration profiles, corresponded to the  $M_r$ s determined from the deduced amino acid sequences of the PCR-amplified P46 entire gene or C-terminal moities of the P65 protein to which was fused the GST protein ( $M_r$  of 26 kDa).

Following bulk purification of the induced sonicates on glutathione-sepharose beads, 1.8 to 2.5 mg of recombinant fusion protein were usually recovered from a culture of 500 ml of IPTG-induced and transformed bacteria (Fig 2-A).

### **Species-specificity of anti-P46 and anti-P65<sub>c</sub> Mabs**

From 2 fusion experiments with spleen cells of hyperimmunized mice, a total of 30 hybridoma cell lines secreting anti-P46 MAb and 26 hybridoma cell lines secreting anti-P65<sub>c</sub> MAb could be established. From these hybridomas, 8 secreted anti-P46 MAb and 7 secreted anti-P65<sub>c</sub> MAb, that reacted intensively against homologous proteins (Fig.2-B). These secreting hybridomas were subcloned and, either maintained in cultures or used to produce ascitic fluids in pristane-primed mice. MAb that were secreted from the established hybridomas were tested for their polypeptide and species-specificity by western blotting against complete antigenic preparations of three reference strains of *M. hyopneumoniae* (ATCC 25934, ATCC 25095, J strains) and that of other porcine mycoplasma species, including *Acholeplasma laidlawii*. All of the MAb obtained from established hybridomas reacted very specifically toward the three reference strains of *M. hyopneumoniae* (Fig.2-C) and showed no reactivity toward other mycoplasma species tested (data not shown). The anti-P65<sub>c</sub> MAb were all determined to be of the IgG1 isotype, whereas six of the eight identified anti-P46 MAb were found to be IgG1 antibodies and two were IgG2a isotype.

### **Immunogenicity of *E.coli* -expressed GST-P46 and GST- P65<sub>c</sub> recombinant fusion proteins**

By indirect ELISA, using recombinant protein as antigen, seroconversion to *M. hyopneumoniae* was demonstrated for sera collected from pigs which had been injected once with either each or both GST-P46 and GST-P65<sub>c</sub> recombinant fusion proteins prepared in an oily vegetable adjuvant. Interestingly, within 14 days after the first injection, specific IgG antibody titers higher than 1:10000 could be detected by ELISA to both membranous proteins that have been injected individually to the pigs. The sera showed no cross-reactivity against heterologous proteins. On the other hand, when injected simultaneously to the pigs, the reactivity to the P46 was detected by indirect ELISA two weeks (PID 14) earlier than that directed to the P65<sub>c</sub>, for which antibody titers higher than 1:10000 were not detectable prior the second dose of the antigenic

preparation was given to the pigs (Table 2). Indeed, when injected simultaneously, no reactivity was detected 21 days after first injection of the mixture of both rec fusion proteins and  $A_{450}$  values higher than 1.0 were not reached until PID 42 or two to three weeks following the booster injection. Western blotting experiments conducted with sera collected at PID 42 (dilution 1:100) also confirmed their reactivities against the authentic proteins of *M. hyopneumoniae*.

### **Clinical and pathological findings in experimentally infected pigs**

Weaned pigs that were infected with the Quebec field strain IAF-DM9827 of *M. hyopneumoniae* did not manifest clinical signs until 3 to 4 weeks post-inoculation. Then, from the 6th to 7th week post-infection, coughing could be elicited by exercising infected pigs around the pen and it occurred with greater frequency in the period immediately following the exercise. At this time, the infected pigs were also apathic, reacted less to their environment and preferred to lay on the ground rather than stand. Compared to the pigs in the control group, the infected pigs also showed a drop in feed consumption, as judged by the quantity of feed remaining in the pens which were changed twice a day. Rectal temperatures were not taken during this study, as well as body weights and changes in hemograms were not followed.

Infected pigs that were necropsied at day 42 or 49 p.i. had gross lesions that were confined to the respiratory tract and thoracic cavity. The lung lesions were confined almost entirely to the apical and cardiac lobes and were clearly demarcated from the normal lung tissue. Plum-coloured or greyish areas of consolidation resembling lymphoid tissues were scattered along the ventral borders of the lobes. The mediastinal lymph nodes were enlarged and congested. Minor (25 ml) to large amounts ( $\geq 100$  ml) of bloody fluid could also be demonstrated within the thoracic cavity and pericardium of two infected pigs. *M. hyopneumoniae* infection of the lungs and upper respiratory conducts was confirmed by a single P36 PCR assay (6)



### Microscopic lesions and immunohistopathology

At PID 42, the microscopic lesions observed were confined to the thoracic and cardiac lobes of lung of the infected pigs. The plum-coloured and consolidated areas of the infected lungs corresponded to mild to severe characteristic perivascular and peribronchiolar lymphomononuclear nodules of infiltration, often compressing the lumen of the bronchioles. Hyperplasia of the epithelial cells of the affected bronchioles was observed in all four infected pigs, but two pigs had also the lumen of their bronchioles completely filled with an infiltrate consisting of cell debris and numerous lymphomononuclear cells (Fig.4-A ). Thin frozen lung sections mounted on glass slides and fixed with 100 % ice cold acetone were first tested for the presence of *M. hyopneumoniae* antigens using pools of either 2-3 of the anti-P46 or anti-P65<sub>c</sub> MAbs enriched ascitic fluids, then reacted with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (Boehringer Mannheim) diluted 1:50 in PBS. With both types of MAbs, specific fluorescent cells were usually observed lining the bronchiolar epithelium. The morphology and delimitation of bronchiolar epithelial cells were more easily recognized when slides were incubated with the pool of anti-P46 MAbs (Fig.3-A) comparing to the pool of anti- P65<sub>c</sub> MAbs (Fig. 3-B). No such fluorescence was observed when lung sections were incubated with normal mouse serum (Fig. 3-C).

On the other hand, immunohistochemical detection of *M. hyopneumoniae* in lungs tissues of the four experimentally-infected pigs could be achieved by immunoperoxidase staining. Both, pools of anti-P46 or anti-P65<sub>c</sub> MAbs, and homologous porcine hyperimmune serum, permitted effective detection by indirect immunoperoxidase of *M. hyopneumoniae* specific antigens in formalin-fixed, paraffin-embedded lung sections from pigs that were killed after the 6-7-week observation period. In comparison with IIF method on frozen lung sections, the morphology of lung tissues was much more preserved, such that positive staining was often associated with the typical histopathological lesions described above. Positive staining associated with the presence of specific *M. hyopneumoniae* antigens, was localized as a diffused brownish labelling in the cytoplasm, but more intensively on the surface of the epithelial cells of large airways

such as bronchioles and bronchi. No staining could be observed of the endothelial cells of alveolar ducts and alveoli. Positively-stained hyperplastic epithelial cells of the thoracic bronchioles was observed, mainly following incubation with anti-P46 MAbs, but in all cases, there was no staining of infiltrated lymphomononuclear cells (Fig.4-C; 4-D). Only debris of epithelial cells appeared to be stained in the exudate presented in the lumen of broncho-alveolar ducts. The staining reaction with anti-P65<sub>c</sub> MAbs was more diffused (Fig. 4-E; 4-F). Thin sections of lung tissues from control pigs were negative for the presence of specific antigens, as well as, lung sections from experimentally-infected pigs that have been incubated with negative mouse sera (Fig. 4-B).

### Discussion

*M. hyopneumoniae* is a fastidious microorganism that is difficult to isolate in culture (1) from clinical specimens on a routine basis, and as the only recognised etiological agent of enzootic pneumonia in pigs, it shares some antigenic determinants with less virulent species, such as *M. hyorhinis* and *M. flocculare* (11). Both of these properties have hampered the development of accurated diagnostic tests necessary to the establishment of control epidemiological programs, The inefficacy of inactivated or killed vaccines (bacterins) to prevent pig infection by *M. hyopneumoniae*, as the result of a poor stimulation of the specific mucosal immunity, makes this pig infectious disease a chronic, costly and uncontrolled pathological entity with a worldwide distribution.

Consequently, there is a need for standardized sources of purified proteins carrying most predominant antigenic determinants and of specific antibodies directed against these proteins for the development of species-specific and accurated diagnostic assays for field strains identification and detection of specific circulating and mucosal antibodies. Membranous lipoproteins, particularly the P46, P65 and P97 proteins, have been demonstrated to carry species-specific antigenic determinants (35), but their association with a protective immune response is still to be investigated (32).

In the present study, the P46 and P65 membranous proteins of *M. hyopneumoniae* could successfully be expressed in *E. coli* provided TGA stop codons were substituted by TGG using directed PCR mutagenesis. Moreover, the procaryotic pGEX-4T1 expression system has been shown to easily and rapidly produce large quantities of pure proteins (26, 30), and because of the presence of a thrombin protease recognition site downstream the GST coding sequences, this allows cleavage of the desired protein from the fusion partner. Different incubation temperatures and concentrations of IPTG used for the induction can be tested to increase the level of production of the recombinant protein and to avoid its accumulation in the form of inclusion bodies (26). Another advantage of this expression system is that GST protein is not present in *E. coli*; hence, pig sera should not possess any antibodies that would react against this protein and interfere with data obtained from serological tests.

The *E. coli*-expressed recombinant proteins displayed the antigenicity of the authentic proteins being recognized by convalescent pig sera by Western blotting and ELISA. The immunogenicity of both authentic proteins was preserved since following injection of mice and SPF pigs, both species produced antibodies that specifically reacted to the authentic P46 and P65 proteins by Western blotting. Furthermore, MAbs generated following fusion experiments with mice hyperimmunized against the rec proteins, reacted also specifically to the authentic proteins of reference and field isolates of *M. hyopneumoniae*, but not against proteins of other Mycoplasma species. Therefore, for diagnosis purpose, the anti-P46 and anti-P65<sub>c</sub> MAbs could be used for the final identification of *M. hyopneumoniae* field strains isolated in culture.

Indirect immunofluorescence on frozen tissue sections is probably the most common diagnostic tool used for the detection of *M. hyopneumoniae* in tissues of infected pigs (9, 24, 31). But the streptavidin-biotin immunoperoxidase technics have many advantages compared to cultivation methods; they are rapid and sensitive antigen detection tests and contrary to IFF, it permits simultaneously to quantify damages or lesions caused by *M. hyopneumoniae* in the lungs tissues and upper respiratory tract airways. However, polyclonal antibodies are still currently used in the IIF and immunoperoxidase tests (1, 9,

23, 24, 31). Consequently, false-positive results may arise due to cross-reactions that exist between pathogenic (*M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae*) and non or less virulent (*M. flocculare*, *M. hyorhinis*) mycoplasma species (11).

Therefore, to eliminate mis-interpretation due to non-specific immunolabelling, the use of MAbs which react to specific immuno-dominant proteins of *M. hyopneumoniae* is suggested. Recently, we demonstrated that MAbs raised against the species –specific P36 cytosolic protein and its encoding gene, may be considered for early and specific diagnosis of *M. hyopneumoniae* infection by PCR and IIF on frozen lung sections (6,7). However, no characteristic immunolabelling pattern could really be defined using anti-P36 MAbs. Herein, anti-P46 and anti-P65<sub>c</sub> MAbs could be applied for the specific diagnosis of *M. hyopneumoniae* infection by IIF on frozen lung sections and by indirect immunoperoxidase on formalin-fixed, paraffin-embedded lung sections from pigs experimentally-infected with a virulent field strain of *M. hyopneumoniae*. The great advantage of the immunoperoxidase labelling technique is that one can easily interpreted the pathological lesions in term of cells infected by the microorganism and type of inflammatory cells involved since the morphology of lung tissues is well preserved and the counterstaining method allows histopathological diagnosis. Positive staining associated with the presence of specific *M. hyopneumoniae* antigens, showed that the infection was mainly localized on the surface of epithelial cells of the bronchi and bronchioles.

The immune response involved infiltration of the surrounding interstitial tissue by lymphomononuclear cells, which are non-infected by this virulent agent. *M. hyopneumoniae* has not been reported as a tissue invader, but is rather considered as an extracellular pathogen which associates very intimately with the ciliated epithelial cells of the porcine lower respiratory tract (23, 27), in agreement with the immunofluorescent and immunoperoxidase patterns obtained in the present study. We are currently evaluating the anti-P46 and anti-P65<sub>c</sub> MAbs for their potential use in a specific and sensitive blocking ELISA for detection of antibodies in pigs.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank L. Wilson and N. Sawyer for their excellent technical assistance. Particular thanks go to Dr C.A. Gagnon, INRS-Institut Armand-Frappier for his help in experimental infections and necropsies. We also thank Dr. D. Larochelle, Laboratoire de pathologie animale, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, Ste-Foy, Qc. for the preparation of histologic sections. This report was taken in part from a dissertation to be submitted by K. Cheikh Saad Bouh to the INRS-Institut Armand-Frappier, in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree. This work was partly supported by the Conseil de Recherches en Pêche et Agro-Alimentaire du Québec (grant # 4600), the Quebec Federation of Swine Producers and Biovet Inc., St-Hyacinthe, Quebec, Canada.

## REFERENCES

1. Amanfu, W., C. N. Weng, R.F. ROSS, and H. J. Barnes. 1984. Diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine: sequential study by direct immunofluorescence. *Am. J. Vet. Res.* 45:1349-1352.
2. Armstrong, C. H., M. J. Freeman, and L. Sands-Freeman. 1987. Cross-reactions between *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare*: practical implications for the serodiagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine. *Isr. J. Med. Sci.* 23: 654-656.
3. Blanchard, B., M. Kobisch, J.M. Bove, and c. Saillard. 1996. Polymerase chain reaction for *Mycoplasma* detection in tracheobronchiolar washings from pigs. *Mol. Cell. Probes* 10: 15-22.
4. Brooks, E., and D. Faulds. 1989. The *Mycoplasma hyopneumoniae* 74,5kD antigen elicits neutralizing antibodies and shares sequence similarity with heat-shock proteins. *Vaccine* 89: 265-269.
5. Calsamaglia, M., C. Pijoan, and A. Trigo. 1999. Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. *J. Vet.. Diagn. Investig.* 11: 246-251
6. Caron J, M. Ouardani, and S. Dea. 2000. Detection and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* by PCR amplication of the p36 and p46 genes. *J. Clin. Microbiol.* 38; 1390-1396.
7. Caron J., N. Sawyer, B. Ben Abdel Mouden, K. Cheikh Saad Bouh , and S. Dea. 2000. Species-specific monoclonal antibodies to *E. coli*-expressed p36 cytosolic protein of *M. hyopneumoniae*. *Clin. & Diagn. Lab. Immunol.* 7:528-535

8. Dea S., R. Bilodeau, R. Sauvageau, and G. P. Martineau. 1991. Outbreaks of respiratory and reproductive problems associated with encephalomyocarditis virus in Quebec pig farms. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3: 275-282.
9. Feenstra, A. A., V. Sørensen, N. F. Friis, N. E., Jensen, and V. Bille-Hansen. 1994. Experimental *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. In: Proceedings of the 13<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress, Bangkok, Thailand, June 26-30.
10. Feld, N. C., P. Qvist, P. Ahrens, N. F. Friis, and A. Meyling. 1992. A monoclonal blocking ELISA detecting serum antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 30: 35-46.
11. Freeman, M. J., C. H. Armstrong, L. L. Freeman-Sands, and M. Lopez-Osuna. 1984. Serological cross-reactivity of porcine reference antisera to *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. flocculare*, *M. hyorhinis* and *M. hyosynoviae* indicated by the enzyme-linked immunosorbent assay, complement fixation and indirect hemagglutination tests. *Can. J. Comp. Med.* 48: 202-207.
12. Frey, J., A. Haldimann, M. Kobisch, and J. Nicolet. 1994. Immune response against the L-lactate dehydrogenase of *Mycoplasma hyopneumoniae* in enzootic pneumonia of swine. *Microbial Pathogenesis* 17:313-322.
13. Friis, N.F. 1973. The pathogenicity of *Mycoplasma flocculare*. *Acta. Vet. Scand.* 14: 344-346.
14. Frydenberg, J., K. Lind, and P. C. Hu. 1987. Cloning of *Mycoplasma pneumoniae* DNA and expression of P1-epitopes in *Escherichia coli*. *Isr. J. med. Sci.* 23:759-762.
15. Futo, S., Y. Seto, M. Okada, S. Sato, T. Suzuki, K. Kawai, Y. Imada, and Y. Mori. 1995. Recombinant 46-kilodalton surface antigen (P46) of *Mycoplasma*

- hyopneumoniae* expressed in *Escherichia coli* can be used for early specific diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 33: 680-683.
16. Goodwin, R.F.W., A.P. Pomeroy, and P. Whittlestone. 1965. Production of enzootic pneumonia in pigs with mycoplasma. *Vet. Rec.* 77: 1247-1249.
  17. Haldimann, A., J. Nicolet, and J. Frey. 1993. DNA sequence determination and biochemical analysis of the immunogenic protein p36, the lactate dehydrogenase (LDH) of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.* 139: 317-323.
  18. Harasawa, R., K. Koshimizu, O. Takeda, T. Uemori, K. Asada, and I. Kato. 1991. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by the polymerase chain reaction. *Mol. Cell Probes* 5 :103-109.
  19. Kim, M. F., M. B. Heidari, S. J. Stull, M. A. McIntosh, and K. S. Wise. 1990. Identification and mapping of an immunogenic region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P65 surface lipoprotein expressed in *Escherichia coli* from a cloned genomic fragment. *Infect. Immun.* 58: 2637-2643.
  20. Klinkert, M. Q., R. Herrmann, and H. Schaller. 1985. Surface proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* identified from an *Escherichia coli* expressed plasmid library. *Infect. Immun.* 49: 329-335.
  21. Kobish, M., and N. F. Friis. 1996. Swine mycoplasmoses. *Rev. sci. Off. Int. Epiz.* 15:1569-1606.
  22. Maes, D., M. Verdonck, H. Deluyker, and A. de Kruif. 1996. Enzootic pneumonia in pigs. *Vet. Quart.* 18:104-109.
  23. Maré, C.J., and W. P. Switzer. 1965. *Mycoplasma hyopneumoniae*, a causative agent of virus pig pneumonia. *Vet. Med.* 60: 841-845.



24. Mori, Y., T. Hamaoka, and S. Sato. 1987. Use of monoclonal antibody in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Isr. J. Med. Sci.* 23: 657-662.
25. Mori, Y., T. Hamaoka, S. Sato, and S. Takeuchi. 1988. Immunoblotting analysis of antibody response in swine experimentally inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Immunol. Immunopathol.* 19: 239-250.
26. Nakano, H., T. Yamazaki, M. Ikeda, H. Masai, S. Miyatake, and T. Saito. 1993. Purification of glutathione S-transferase fusion proteins as a non-degraded form by using a protease-negative *E. coli* strain, AD202. *Nucleic Acids Research* 22:543-544.
27. Ross, R. F. 1992. Mycoplasmal diseases. In *Diseases of swine* (A.D. Leman, B. Straw, W. Mengeling, S. D'Allaire & D. Taylor, eds), 7<sup>th</sup> Ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 537-551.
28. Sanger, N. S., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467
29. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
30. Smith, D. B., and K. S. Johnson. 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67: 31-40.
31. Stipkovits, L., J. Nicolet, A. Haldimann, and J. Frey. 1991. Use of antibodies against the p36 protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* for the identification of *M. hyopneumoniae* strains. *Mol. Cell. Probes* 5: 451-457.

32. Strasser, M., J. Frey, G. Bestetti, M. Kobisch, and J. Nicolet. 1991. Cloning and expression of a novel species-specific early immunogenic 36-kilodalton of *Mycoplasma hyopneumoniae* in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 59: 1217-1222.
33. Thacker , E. L., P. G. Halbur, R. F. Ross, R. Thanawongnuwech, and B. J. Thacker. 1999. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of Porcine reproductive and respiratory syndrome Virus-Induced Pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 37(3) : 620-627.
34. Thacker , E. L., B. J. Thacker, and B. H. Janke. 2001. Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Swine Influenza Virus*. *J. Clin. Microbiol.* 39(7): 2525-2530.
35. Trevino, L. B., W.G. Haldenwang, and J. B. Baseman. 1986. Expression of *Mycoplasma pneumoniae* antigens in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 53:129-134.
36. Zhang, Q., T. Young, and R. F. Ross. 1995. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. *Infect. Immun.* 63: 1013-1019.

**TABLE 1. Les séquences des amorces de mutagenèse**

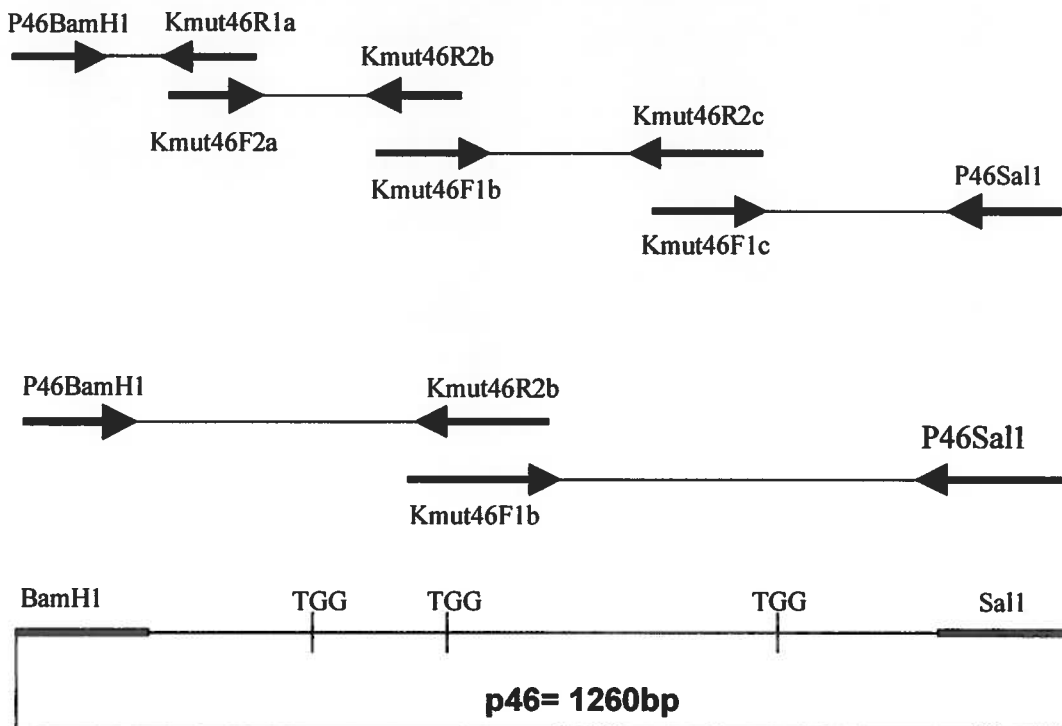
**Primers for p46 mutagenesis:**

**P46BamH1** 5'-ACCGGATCCATGAAAAAATGCTTAGAAAAAATT-3'  
**P46Sal1** 5'-CCCGTCGACTTAGGCATCAGGATTATCAAC-3'  
**Kmut46F2a** 5'-GATAATCCTCGATGGATTAGTGCCCAA-3'  
**Kmut46R1a** 5'-TTGGGCACTAATCCATCGAGGATTATC-3'  
**Kmut46F1b** 5'-GCACAAAATAACTGGCTCACTCAGCAA-3'  
**Kmut46R2b** 5'-TTGCTGAGTGAGCCAGTATTTTGTGC-3'  
**Kmut46F1c** 5'-TATGTCCAGGATGGAATTATGGA-3'  
**Kmut46R2c** 5'-AGTTCATAATTCCATCCTGGGACATA-3'

**Primers for p65<sub>c</sub> mutagenesis:**

**65mutIF<sub>2</sub>(ATG)** 5'-CGGGATCCATGGTAAATTGGCTTGTTAAAAAAA-3'  
**R2Sp65** 5'-GGGCCGGTCGACTTAATCCTGCTTGATTTCAGCATC-3'

**Example of p46 TGA mutagenesis:**

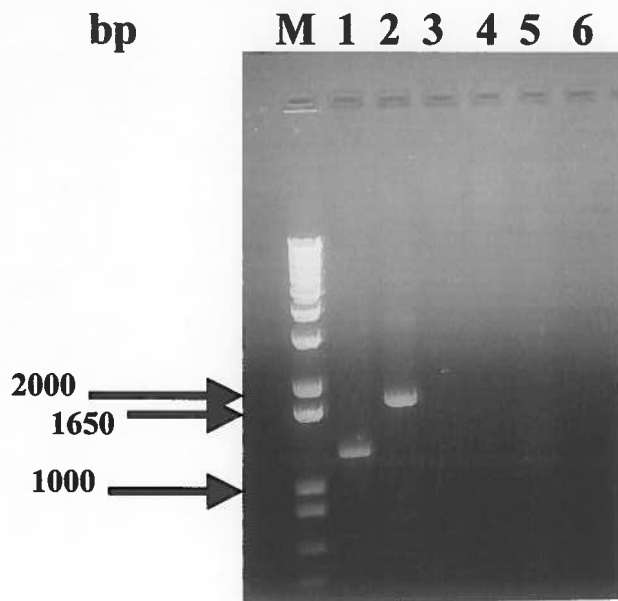


**TABLE 2. Absorbance values ( $A_{450}$ ) of serum (dilution 1:8000) from pigs immunized by injection of individual or mixed P46 or P65<sub>c</sub> recombinant proteins determined by ELISA using either recombinant protein as antigen**



**FIG. 1. PCR amplification of the ORF encoding the P46 and P65 membranous proteins of *M. hyopneumoniae* (strain ATCC 25934).**

Lanes 1 and 2 ,: 1,260 bp and 1,803 bp DNA amplicons corresponding to the entire P46 and P65 gene were obtained by PCR using the oligonucleotide primer pairs P46BamH1 and P46sal1., and FSLP65 and R2SP65, .respectively. As controls *M. hyorhinis* and *Acholeplasma laidlawii* were used respectively. Lane 3 and 4 with P46 primers; lane 5 and 6 with P65 primers Lane M, the molecular sizes of fragments of the 1-kb Plus DNA ladder.



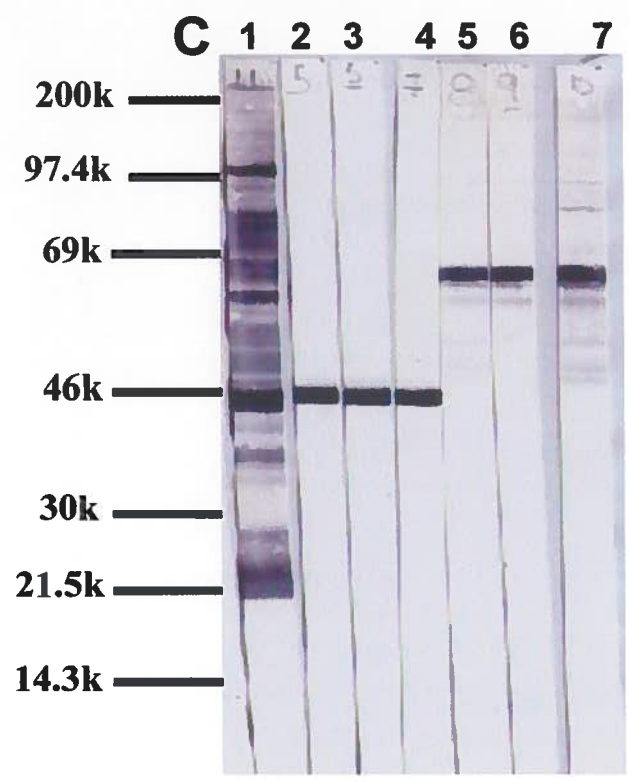
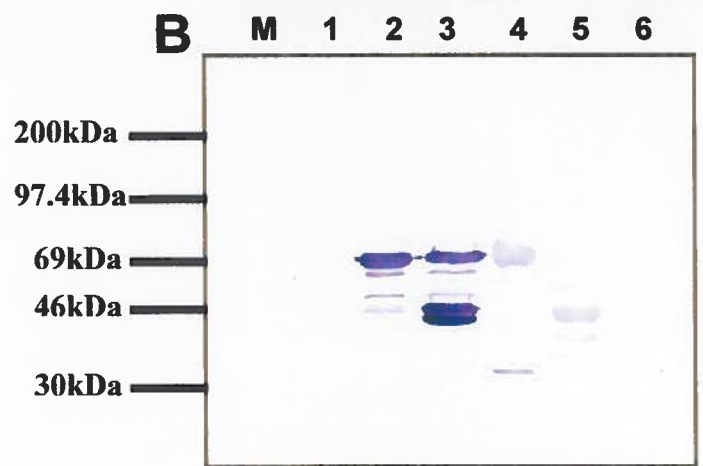
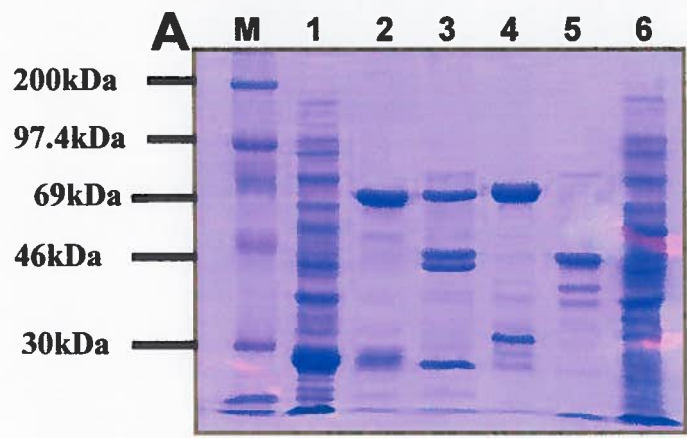


**FIG. 2 Expression of recombinant P46 and P65c and western blotting patterns of specific monoclonal antibodies**

A) Expression of the GST-P46 and GST-P65<sub>c</sub> recombinant fusion proteins in *E. coli*. Lane 1, IPTG-induced GST recovered from pGEX-4T1-transformed bacteria (GST= 26 kDa); Lane 2, purified GST-P46 recombinant fusion protein (72 kDa); Lane 3, cleaved recombinant GST-P46 fusion protein (46 kDa); Lane 4, purified GST-P65<sub>c</sub> recombinant fusion protein (70 kDa); Lane 5, cleaved GST-P65<sub>c</sub> recombinant fusion protein (44 kDa); lane 6, Non-induced recombinant bacteria; M, Rainbow molecular weight markers.

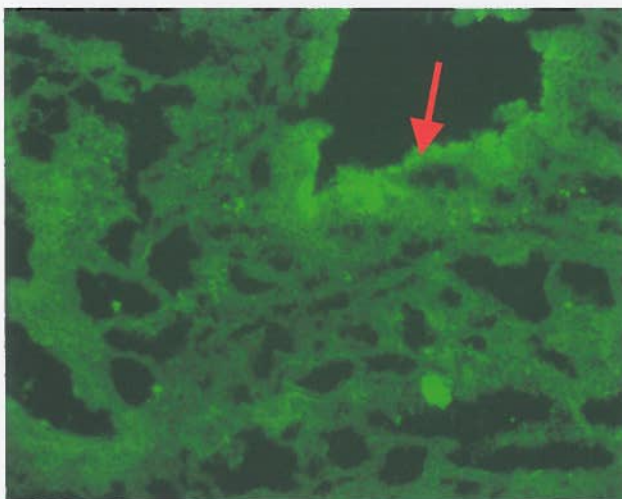
B) Polypeptide specificities of pooled MAbs produced against *E. coli*-expressed P46 and P65<sub>c</sub> recombinant proteins. The reactivities of pooled MAbs were tested against the fusion and cleaved recombinant proteins. Lane 1, IPTG-induced pGEX-4T1-transformed bacteria (GST= 26 kDa); Lane 2, purified GST-P46 recombinant fusion protein (72 kDa); Lane 3, cleaved recombinant GST-P46 fusion protein (46 kDa); Lanes 4, purified GST-P65<sub>c</sub> recombinant fusion protein (70 kDa); Lane 5, cleaved GST-P65<sub>c</sub> recombinant fusion protein (44 kDa) ; lane 6, non-induced recombinant bacteria; M, Rainbow molecular weight markers.

C) Reactivity of the anti-P46 and anti-P65<sub>c</sub> MAbs as determined by western blotting using whole *M. hyopneumoniae* lysate as antigenic preparation. The figure illustrates the reactivity patterns of: Lane 1, polyclonal antiserum to *M. hyopneumoniae*; Lane 2, MAb 7D3-E9 (anti-P46); Lane 3, MAb 7D3-C11 (anti-P46); Lane 4, MAb 6A4-G9 (anti-P46); Lane 5, Mab 4D11-C11 (anti-P65<sub>c</sub>); Lane 6, MAb 1D3-C6 (anti-P65<sub>c</sub>); Lane 7, Mab 4D11-G8 (anti-P65<sub>c</sub>).

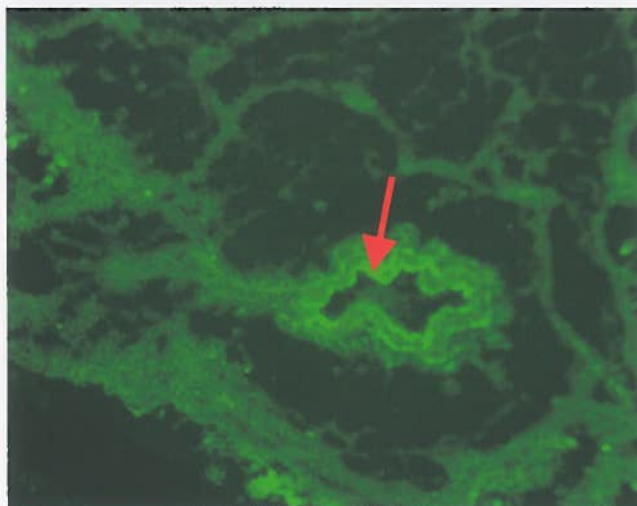


**FIG.3 Immunofluorescent staining by anti-P46 (A) and anti- P65<sub>c</sub> (B) MAbs of frozen sections of lungs from experimentally-infected pigs revealed fluorescence lining the bronchiolar epithelium as indicated by arrows.**

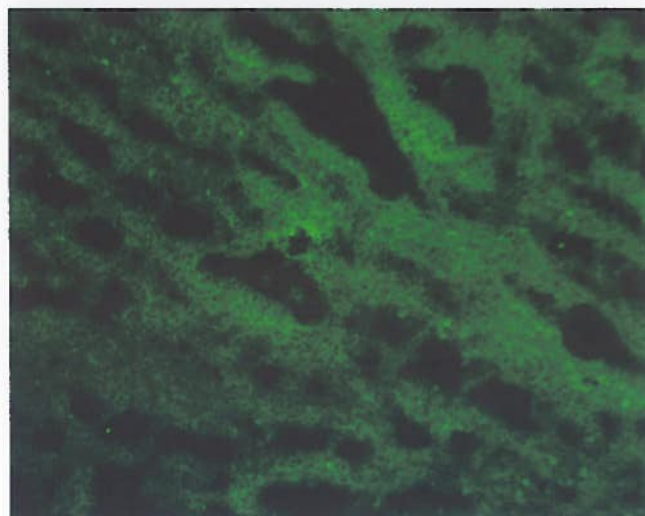
**A**



**B**



**C**

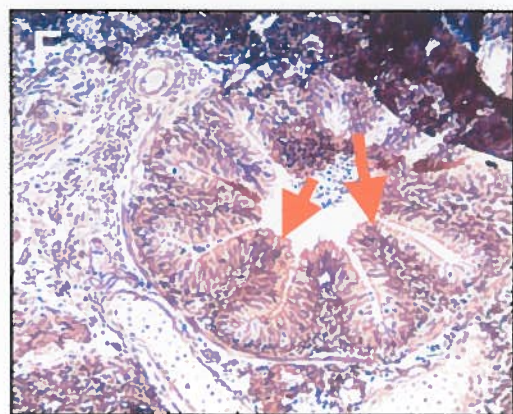
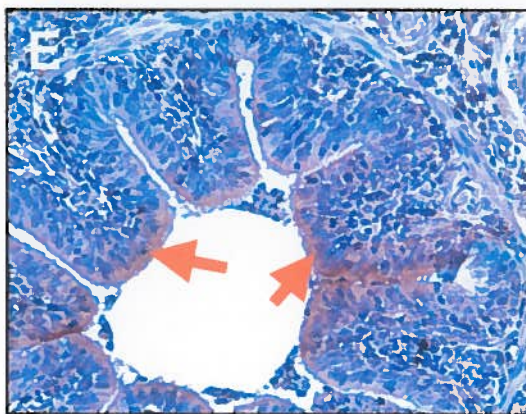
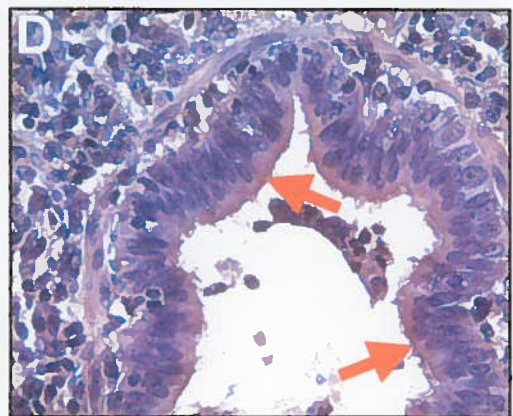
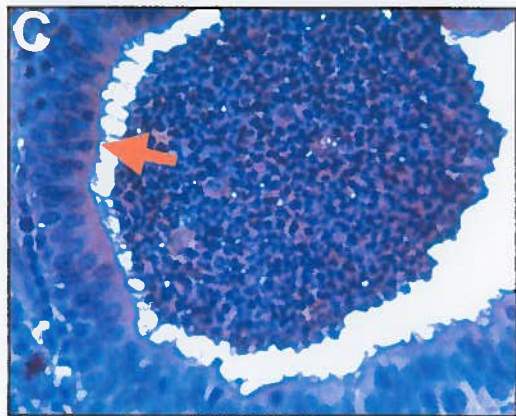
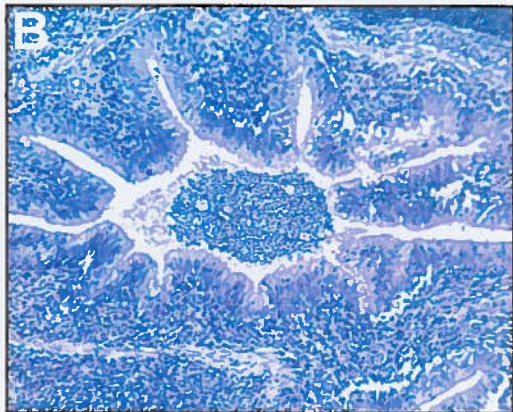
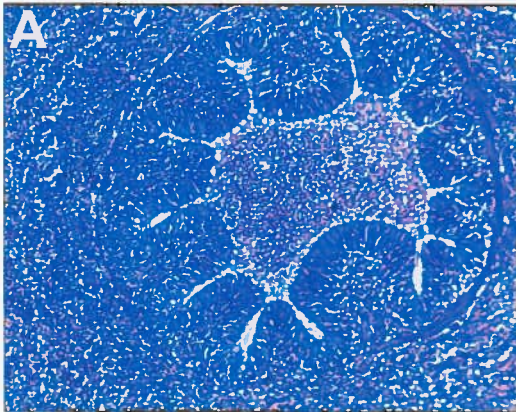


**FIG.4. Histological and immunohistochemical findings as observed in the lungs of experimentally-infected SPF-pigs**

A ) Peribronchiolar and perivascular accumulation of mononuclear cells with a mild hyperplasia of the bronchiolar epithelium. HE staining.;

B- F) Immunoperoxidase staining by negative mouse serum (B); or by anti-P46 (C, D) and anti-P65<sub>c</sub> (E, F) MAbs of paraffin embedded sections of lungs from experimentally-infected pigs revealed similar staining patterns than that observed following immunofluorescence as indicated by arrows. Magnification, × 20 (4A, 4B, 4E and 4F) and × 40 (4C and 4D).





**Kinetics of the immune response in pigs to individual *E. coli*-expressed  
and authentic P46, P65 and P97 membrane-anchored proteins of  
*Mycoplasma hyopneumoniae***

**K. CHEIKH SAAD BOUH, A. BOISVERT, L. WILSON, F. SHARECK\*  
AND S. DEA<sup>(1)</sup>**

(1) : deceased January 2003

*INRS-Institut Armand-Frappier Université du Québec, 531 boul. des Prairies, Laval,  
P.Q., Canada, H7V 1B7*

**Running title: kinetic of immune response against *M. hyopneumoniae* proteins**

**\*Corresponding author mailing address:**

**INRS-Institut Armand-Frappier**

**Université du Québec**

**531, boul. des Prairies**

**Laval, Qc, Canada**

**H7V 1B7**

**E. MAIL: [francois.shareck@inrs-iaf.quebec.ca](mailto:francois.shareck@inrs-iaf.quebec.ca)**

**Vaccine (soumis)**

## Résumé

Les trois protéines P46, P65 et P97 associées à la membrane de *M. hyopneumoniae* présentent des déterminants antigéniques spécifiques à l'espèce. Sur la base de la séquence génomique de la souche de référence ATC 25934, des amorces spécifiques à l'espèce sont synthétisées pour permettre l'amplification par PCR des gènes codant pour les protéines P46, P65 et P97. Les produits d'amplification sont clonés dans un vecteur procaryotique pGEX-4T1 et les protéines de fusion recombinantes ont été purifiées. Pour optimiser l'expression des gènes, les codons TGA qui sont exceptionnellement utilisés par *M. hyopneumoniae* pour les résidus tryptophane seront convertis en TGG par mutagenèse dirigée par PCR. Après une induction à l'IPTG, les protéines de fusion recombinantes GST-P46, GST-P65 et GST-P97 sont purifiées par chromatographie d'affinité. Le clivage par la thrombine permet de récupérer les portions P46, P65 et P97 de ces protéines de fusion. Les protéines recombinantes sont utilisées comme antigènes dans un ELISA pour suivre la cinétique de la réponse en anticorps contre ces protéines spécifiques chez des porcs infectés expérimentalement avec *M. hyopneumoniae* (souche ATCC 25934). Les résultats ont démontré que les anticorps contre la P46 apparaissent en premier, deux à trois semaines post-infection, suivis par les anticorps dirigés contre la P97. Les anticorps contre la P65 apparaissent tardivement chez les animaux infectés par *M. hyopneumoniae*. Une cinétique de la réponse immune semblable est observée chez des porcs immunisés avec les protéines recombinantes individuellement ou un mélange des trois protéines. L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'apparition chronologique des anticorps contre les protéines immunodominantes majeures de *M. hyopneumoniae* est P46, P97 ou P74 et P65 respectivement; de même la protéine recombinante P46 pourrait représenter en tant qu'antigène une alternative valable pour améliorer le diagnostic précoce de l'infection à *M. hyopneumoniae*.



## ABSTRACT

Based on the genomic sequence of the reference strain ATCC 25934, specific primers were designed for PCR amplification of the entire P46, P65 and P97 encoding genes. The amplified genes were then cloned into pGEX-4T1 prokaryotic expression-vector and the recombinant fusion proteins were purified. To optimize the expression of the constructs in *E. coli*, TGA non-sense codons, exceptionally used for the incorporation of tryptophan residues during translation in *M. hyopneumoniae*, were converted to TGG codons by PCR directed mutagenesis. Following induction by IPTG, GST-P46, GST-P65 and GST-P97 recombinant fusion proteins were purified by affinity chromatography and P46, P65 and P97 moieties recovered upon cleavage with thrombin. These were used as antigens in ELISA assays. The kinetics of antibody response against these specific proteins was followed by ELISA in pigs experimentally infected with *M. hyopneumoniae* DM9827. The results showed that antibodies against P46 were the first to appear, two to three weeks after infection, followed by antibodies against P97. Antibodies against P65 were significantly more slow to appear in animals infected with the pathogen. A similar kinetic of antibody response was observed when such analysis was carried out in animals immunized with the recombinant proteins, or with a pool of all three proteins. Overall, these results suggest that the chronological appearance of antibodies against *M. hyopneumoniae* major immunodominant proteins is: anti-P46, anti-P97 and anti-P65 respectively. Moreover, the *E. coli* expressed P46 and P97 recombinant (rec.) proteins may represent a valuable alternative to improve the detection of *M. hyopneumoniae* in the early phase of infection and these antigens may be included in the composition of future recombinant sub-unit vaccine against *M. hyopneumoniae* infection.

## 1. INTRODUCTION

*M. hyopneumoniae* is the causative agent of enzootic pig pneumonia, a disease found in pig farms worldwide and characterized by high morbidity and low mortality rates [1]. The chronic infection accompanied by coughing causes mainly retarded growth and poor food conversion which result in considerable economic losses [1,2]. Moreover, *M. hyopneumoniae* is commonly found in the lungs of pigs infected by porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and swine influenza virus [3], thereby permitting the establishment of secondary pulmonary diseases.

The genome of *M. hyopneumoniae* encodes for several immunodominant proteins, most notably the P36 cytosolic protein, the P46, P65 and P74 membrane-anchored proteins and the P97 adhesin [4-7]. The open reading frames (ORFs) are 1,260bp long for the P46 surface lipoprotein, 1,803bp long for the P65 lipid-modified amphiphilic surface protein and 3,327bp for the P97 adhesin. Sequencing analysis of P46, P65 and P97 encoding genes revealed the presence of respectively three, one and four translation termination or non-sense TGA codons, which are exceptionally used for tryptophan residues, in addition to TGG in several mycoplasma genes [8]. The diagnostic of pigs infection by *Mycoplasma hyopneumoniae* can be performed by immunohistochemistry on frozen sections of lung tissues [9-11]. However, since *M. hyopneumoniae* shares several antigenic determinants with *M. flocculare* and *M. hyorhinae*, cross reactivity causes problems in serological diagnostic of *M. hyopneumoniae* infection. For species-specific and accurate diagnostic assays for the identification of *M. hyopneumoniae* field strains there is a need for purified proteins carrying the most predominant antigenic determinants, as well as specific antibodies directed against these proteins. Moreover, fundamental knowledge of the immune response to these antigenic determinants of *M. hyopneumoniae* major proteins could be useful for serological diagnostics and to develop future vaccines with increased efficacy.

In the present study, we have cloned, expressed and purified from *E. coli* the recombinant proteins P46, P65 and P97. Indirect ELISA and Western blotting tests using these rec-

proteins and whole-cell antigens of *M. hyopneumoniae* were then carried out in order to study the kinetics of specific antibody response to membrane-anchored proteins of *M. hyopneumoniae* in experimentally-infected and hyperimmunized pigs. Furthermore, we have compared the antibody response to P46, P65 and P97 native and rec-proteins to that induced by *M. hyopneumoniae* P74 protein using commercially available ELISA test [12].

## 2. Materials and Methods

### 2.1 *Mycoplasma* species and growth conditions

The strain *M. hyopneumoniae* ATCC 25934 was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Md, and used as the reference strain in this study. All strains were grown in modified Friis medium [13] containing mycoplasma-tested free 20% horse serum (Gibco-BRL), 5% fresh yeast extract (Gibco-BRL, New Zealand), methicillin (0.15 mg/ml; Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada), bacitracin (0.15mg/ml; Sigma-Aldrich) and thallium acetate (0.08mg/ml; Sigma-Aldrich). The cells were harvested by centrifugation at 12,000 x g for 30 min at 4°C, washed three times and suspended in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4.

### 2.2 DNA extraction and PCR conditions

Genomic DNA from *M. hyopneumoniae* was extracted and purified, as previously described [14]. The oligonucleotide primers used for enzymatic amplification of the entire open reading frames (ORFs) of the P46 (1,260bp) , P65 (1,803 bp) and P97 (3,327 bp) genes of *M. hyopneumoniae* were selected from the previously published DNA sequences of the ATCC 25934 strain (Genbank accession no.D16682, U50209 and U50901 respectively). Sequences of the forward primers for specific amplification of the P46, P65 and P97 encoding genes , were respectively :

P46*Bam*H1: 5'-ACCGGATCCATGAAAAAATGCTTAGAAAAAATT-3'

FSLP65; *Eco*RI 5'-GGCCGGGAATTCATGGCAAAGAAATCATTTTA-3' and

P97F1:*Bam*H1 5'-TTTGGATCCATGAGTAAAAAATCAAAAAC-3' and those of the reverse primers were respectively:

P46*Sal*1: 5'-CCCGTCGACTTAGGCATCAGGATTATCAAC-3' ,

R2SP65*Sal*1:5'GGGCCGGTCGACTTAATCCTGCTTGATTTCAGCATC-3',and

P97F10*Sal*1:5'GGGCCGGTCGACTTAATCCTGCTTGATTTCAGCATC-3'.

The selection of primers, as well as the analysis of the DNA sequence of amplified and cloned genes were performed using the Gene works 2.2 software package (Intelligenetics-Inc., Mountain View, California). The oligonucleotide primers were synthesized in an automated Gene Assembler DNA synthesizer (Pharmacia LKB). The PCR protocols used for amplification of the P46, P65 and P97 genes were used essentially as described [15,16] with minor modifications. The amplification reactions were performed in a DNA Engine thermocycler (MJ Research, model PTC-100). To overcome the error rate of the *Taq* DNA polymerase, the Vent<sub>R</sub><sup>®</sup> DNA polymerase was used for the amplification reactions, and clones from at least three different PCR events were sequenced. Aliquots of 10 µl of the amplified products were analyzed by electrophoresis on 1% agarose gels (Boehringer Mannheim) in TAE buffer (40 mM Tris-acetate [pH8.5], 2 mM EDTA) in the presence of ethidium bromide at 100 V for 1 hour and viewed under UV illumination.. Sequencing of DNA was performed on both strands by the dideoxynucleotide chain-termination modified method [17], using T7 DNA polymerase with an Automated Laser Fluorescent DNA sequencer (Pharmacia LKB).

### 2.3 Site-directed mutagenesis of TGA codons by PCR

The replacement of non-sense TGA codons by TGG codons (tryptophane) within the P46, P65 and P97 genes was performed using overlapping sense and antisense oligonucleotide primers in PCR assays using DNA template obtained from previous amplification reactions. The DNA fragments obtained following site-directed mutagenesis of TGA to TGG codons were then assembled by PCR using previously described primer pairs designed as to permit amplification of the entire P46, P65 and P97 encoding genes respectively (1,260 bp,

1803 bp and 3,327 bp). For directional cloning, two restriction sites (*Bam*H1 and *Sal*I) for P46 and P97 genes and two other (*Eco*R1 and *Sal*I) for P65 gene were added respectively at the 5' and 3' ends of the PCR products. After amplification of DNA fragments, all constructs were sequenced to confirm that changes from A to G occurred at the third position of the targeted codons.

#### **2.4 Cloning, expression and purification of GST-P46, GST-P65 and GST-P97 recombinant fusion proteins**

The amplified products were purified using the GFX purification kit (Pharmacia), digested with restriction enzymes *Bam*H1 and *Sal*I for P46, and P97 or *Eco*R1 and *Sal*I for P65, and finally ligated into similarly digested pGEX-4T1 prokaryotic vector, according to the manufacturer's instructions (Pharmacia). The recombinant plasmids were used to transform first, highly competent *E. coli* cells strain HB101, then appropriate plasmids were used to transform *E. coli* BL21DE3 cells (Gibco-BRL) for a more intense expression of the GST-P46, GST-P65 and GST-P97 recombinant fusion proteins. Briefly, overnight cultures of transformed bacteria were diluted 1:10 in a total volume of 120 ml of LB medium containing ampicillin (100 µg/ml) and incubated at 37° C with vigorous shaking (250 rpm) until the OD<sub>600</sub> reached 0.6 to 0.8. Protein expression was induced by the addition of isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (0.1 to 0.5 mM, final concentration) followed by a 5h-incubation period at 28 °C with vigorous shaking (250 rpm). The cells were pelleted by centrifugation at 8,000 x g, then resuspended in 6.25 ml of ice-cold 0.1 M PBS (pH 7.4) containing 1mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF; Boehringer Mannheim). Transformed cells were disrupted by sonication, and Triton X-100 (Sigma-Aldrich) was added to a final concentration of 1%, followed by a 30 min incubation period at room temperature to complete the solubilization process. The soluble recombinant fusion proteins were purified by affinity chromatography on glutathione-Sepharose 4B beads (Pharmacia) and either eluted with reduced glutathione (20mM glutathione, 50mM Tris-HCl pH 8.0, 120mM NaCl) [18] or directly cleaved on the column by the addition of 18 U of thrombin followed by a subsequent overnight incubation period to obtain the P46, P65 and P97 moieties.

## 2.5 Animals

*In vivo* experiments in pigs were approved by the INRS-IAF Animal Care Committee under the supervision of the Canadian Association for Animal Care. For our experiments, crossbred F1 (Landrace x Yorkshire) castrated specific pathogen-free (SPF) piglets four to five weeks of age were obtained from a breeding farm located in Southern Quebec, Canada. Prior to shipping, the breeding stock and piglets were tested and proven to be seronegative for PRRSV, encephalomyocarditis virus (EMCV), porcine parvovirus (PPV), haemagglutinating encephalomyelitis virus (HEV), transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and *Mycoplasma hyopneumoniae*. Animals were also tested at the end of the experiment using multiplex PCR to confirm the absence of porcine circovirus type  $\alpha$ , and *Mycoplasma hyorhinis*, as described elsewhere [14,19]. The animals were fed commercial feed and water *ad libitum*.

## 2.6 Immunogenicity of recombinant proteins

Twelve pigs separated in four groups were inoculated twice intramuscularly at 35 days and 53 days-of age with 100 $\mu$ g of either P46, P65, P97 or a pool of the three recombinant proteins (P46+P65+P97) suspended in 200 $\mu$ l of a suspension 1:1 of PBS + oil adjuvant (Biagen, Biovet, St-Anthony, Minnesota (USA) Inc.). One additional control pig was injected with PBS alone. Immunized and control pigs were bled at day 1, 7, 18, 24 and 37 via the anterior vena cava and its serum tested for specific antibodies by Western blots.

## 2.7 Experimental reproduction of enzootic pneumonia

Experimental inoculation of four pigs by the intra-tracheal route was conducted, as described [20]. The animals were separated in two groups consisting of control pigs (n = 2) that received only fresh Friis medium, whereas the remainder two pigs received identical volume (8 ml) of a culture of the virulent IAF-DM9827 field strain of *M. hyopneumoniae*, corresponding to an infectious dose of  $10^7$  color-changing units/ml. Both

groups were allocated to separate rooms in facilities equipped with pathogen free filtered in-flowing and out-flowing air system. The animals were monitored daily for clinical symptoms for a 7-weeks observation period before euthanasia. Their lungs were aseptically collected and processed for histopathology, PCR and cultivation attempts of *M. hyopneumoniae* in modified Friis medium.

## 2.8 Indirect ELISA

Polystyrene microtiter plates were used as solid-phase adsorbents (Flow Laboratories, Mississauga, Ont., Canada). The optimal P46, P65 and P97 recombinant antigen concentration coated in the wells of a 96-well microplates was determined by checkerboard titration and corresponded to 0.15 µg of protein/well. In the indirect ELISA, the appropriate concentration of protein was diluted in sodium carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) and a total reaction volume of 100 µl was added in all wells. After overnight incubation at 4°C, the antigen-coated plates were washed three times with 0.1M PBS (pH 7.4) containing 0.05% Tween 80 (PBS-T), and saturated for 2h with dilution buffer consisting of PBS-T supplemented with 5% goat serum and 3% skim milk (blotto). Pig sera diluted in blotto were then incubated in coated wells at 37°C for 1h. After washing with PBS-T, mouse anti-IgG horseradish peroxidase-conjugate (1/10000 dilution) (Boehringer Mannheim, QC, Canada) was added and incubated for 30 min at 37°C. Following another washing step, the enzyme substrate solution, containing 0.08% of 3',3',5',5'-tetramethylbenzidine (Sigma-Aldrich) in 120mM citrate buffer and 0.005% hydrogen peroxide was added. After 15 min at room temperature, the reaction was stopped by adding 50µl of 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to each well and the A<sub>450</sub> values obtained using a spectrophotometer (Titerteck Multiskan MCC/340, Flow Laboratories). Data were expressed in P/N calculated by the following formula:  $P/N = \frac{\text{OD of tested sera} - \text{OD of buffer}}{\text{OD of negative sera} + \text{OD of buffer}}$  and the cut-off is P/N= 1.

## 2.9 Western immunoblotting

Cells from a five-days old culture of *Mycoplasma hyopneumoniae* were pelleted by centrifugation at 10,000 x g for 20 min at 4 °C. Cellular pellets were then lysed in 1% Triton X-100 in 0.02 M Tris-HCl buffer pH8.6 containing 0.5 % Tween 20 (TBS-T) and clarified by centrifugation at 15,000 x g for 20 min. at 4 °C. Native mycoplasma proteins or recombinant *E. coli*-GST fusion proteins were separated by 10% SDS-PAGE were electrotransferred to nitrocellulose membranes (0.45 µm pore size; Xymotech) for 2 hours at 60 V, as previously described [21]. The membranes were blocked overnight in 0.02 M Tris-HCl buffer pH 8.6 containing 0.5 % Tween 20 (TBS-T), 5 % goat serum and 5 % skim milk and cut in strips. Individual strips were incubated for 2 h at room temperature in the presence of 1:1000 dilution of porcine hyperimmune serum, or 1:1000 dilution mouse ascitic fluid in the blocking buffer. The immune reactions were revealed following incubation with 1:2000 dilution of appropriate peroxidase-labeled anti-IgG conjugates and incubation in the enzyme substrate solution as previously described [20].

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Experimental reproduction of enzootic pneumonia

In the first series of experiments, we have tested whether sera of pigs infected with *M. hyopneumoniae* reacted against major immunodominant proteins such as P46, P65, P74 and P97. For this purpose, we have inoculated intratracheally two pigs (# 39 and #40) with 8 ml each of a culture of the virulent field strain of *M. hyopneumoniae* IAF-DM9827 corresponding to an infectious dose of  $10^7$  color-changing units/ml. Despite the low severity of the clinical signs, the two experimentally-infected pigs that were necropsied at day 42 (pig #40) and day 49 (pig # 39) had gross lesions that were confined to the respiratory tract and the thoracic cavity. Pulmonary lesions were almost entirely to the apical and cardiac lobes and were clearly demarcated from the normal lung tissue (Fig. 1A). Plum-colored or greyish areas of consolidation resembling lymphoid tissues were scattered along the ventral borders of the lobes. The mediastinal lymph nodes were



enlarged and congested. Minor (25 ml) to large amounts ( $\geq 100$ ml) of bloody fluid were also present within the thoracic cavity and pericardium of the two infected pigs. Other organs showed no detectable signs of infections. To confirm the presence of *M. hyopneumoniae* infection, tissue extracts collected from lung biopsy were cultured in modified Friis medium and the presence of *M. hyopneumoniae* in culture was confirmed by changes of the acidity and turbidity of the medium, and by a PCR-based assay specific for *M. hyopneumoniae* p36 [14]. Non-infected (control) pigs showed no such lesions and were negative for the detection of *M. hyopneumoniae*. (Fig. 1B).

### **3.2 Humoral immune response to native and recombinant membrane-anchored proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae***

In the second experiment, we have studied the ability of infected pigs to raise antibodies against *M. hyopneumoniae* immunodominant native proteins. For this purpose, immunoblotting assays were performed using *M. hyopneumoniae* (ATCC25934) whole cell lysates as a source of antigens which were reacted with sera from experimentally-infected pigs (Fig. 2A and 2B). The results showed that antibodies against P46 were the first to appear, two or three weeks after infection, followed by antibodies against P97. Generation of antibodies against the P65 protein was significantly delayed; in fact, no reactivity against this protein in the experimentally-infected pigs could be detected by immunoblotting until up to four weeks post-inoculation. The P46, P65 and P97 recombinant proteins (Fig. 3) were used as antigens in ELISA to test experimentally infected pigs sera.

More specifically, antibodies against rec-P46 were detectable starting at days 21 and 10 post-inoculation in animals #39 and #40 respectively (Fig. 4A and 4B). In the case of rec-P97, antibodies against this protein appeared at days 49 and 30 in the same animals. However, although we detected antibodies against both P46 and P97 in both infected animals, we could not detect, using the same test, antibodies specific for P65 rec. protein. By comparison, using a commercially-available ELISA assay specific for the membrane-anchored protein P74 [12], we only detected the presence of antibodies against *M. hyopneumoniae* P74 protein at days 28 and 21 post-infection in both animals (Fig. 5).

The present results are in contrast with data suggesting that the *M. hyopneumoniae* P65 protein especially the C-terminal region are the major immunogen recognized during enzootic pneumonia disease [4]. The kinetic of appearance of P46 antibodies following *M. hyopneumoniae* infection and the immunogenicity of the recombinant form of P46 suggest that serological ELISA testing using *E. coli* recombinant P46 protein may represent a valuable alternative to improve the detection of *M. hyopneumoniae* in the early stages of infection.

### **3.3 Kinetics of the humoral immune response in hyperimmunized pigs to recombinant P46, P65 and P97 membrane-anchored proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae***

In this experiment, we have investigated the kinetic of antibodies response against *M. hyopneumoniae* major immunodominant proteins in pigs immunized with recombinant proteins. Animals were inoculated twice intramuscularly at 35 days- and 53 days-of age with 100µg of either P46, P65, P97 recombinant proteins, or with the same amount of a pool of all three recombinant proteins (P46 + P65 + P97). All injections were carried out using a 1:1 ratio with an oil adjuvant (Biagen, Biovet, USA Inc.). The results showed that antibodies against *M. hyopneumoniae* proteins were first detected as early as seven and eighteen days post immunization in the case of animals injected with P46 and P97 proteins respectively (Fig. 6A, 6B and 6C). Antibodies against P65 appeared only at day 24 post-immunization. Sera obtained from the pigs immunized with the pool of the three recombinant proteins (P46+P65+P97) showed similar kinetic of reactivity. These results revealed that recombinant proteins generated in prokaryotic expression systems using GST as a fusion protein were immunogenic, and induced a kinetic of antibody response similar to that observed with the pathogen during the experimental infection.

In this study we have shown that using the GST-fusion proteins system the recombinant proteins conserved the immunogenicity of native proteins. Also the antibodies against the membrane-anchored P46 were the first to appear during experimental infection, suggesting that this protein is highly immunogenic. This conclusion is based on our

ability to directly compare, in an experimental model, the contribution of individual membrane-anchored proteins in their capacity to induce an antibody response. To estimate that the apparent immunogenicity of each of the membrane-anchored proteins studied was not only the reflect of a higher molar ratio of one of the protein relative to the other, sera from experimentally-infected were tested weekly by immunoblotting using nitrocellulose strips on which were initially deposited the same amounts of the various recombinant proteins constructed (data not shown). The results were identical with those further obtained by immunoblotting using whole-cell antigen.

To our knowledge, these results are the first to compare kinetic of antibodies response against P46, P65, P74 and P97 using sera of experimentally-infected and hyperimmunized pigs. Experiments are currently in progress to determine the potential of these recombinant proteins in the development of vaccines for protection against *M. hyopneumoniae*.

### **Acknowledgments**

The authors wish to thank Dr. Yves ST-PIERRE and Dr. Charles Dozois for critical reading of the manuscript. This work was supported by the Conseil de Recherches en Pêche et Agro-Alimentaire du Québec (Grant # 4600), La Fédération des Producteurs de Porcs du Québec, and Biovet Inc., St-Hyacinthe, Quebec, Canada.

## REFERENCES

- 1 Kobisch, M. & Tillon, J.P. [Respiratory diseases of swine: some epidemiologic aspects]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1985, **8**(1), 65-71.
- 2 Pointon, A.M., Byrt, D. & Heap, P. Effect of enzootic pneumonia of pigs on growth performance. *Aust Vet J* 1985, **62**(1), 13-18.
- 3 Thacker, E.L., Halbur, P.G., Ross, R.F., Thanawongnuwech, R. & Thacker, B.J. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. *J Clin Microbiol* 1999, **37**(3), 620-627.
- 4 Kim, M.F., Heidari, M.B., Stull, S.J., McIntosh, M.A. & Wise, K.S. Identification and mapping of an immunogenic region of *Mycoplasma hyopneumoniae* p65 surface lipoprotein expressed in *Escherichia coli* from a cloned genomic fragment. *Infect Immun* 1990, **58**(8), 2637-2643.
- 5 Strasser, M., Frey, J., Bestetti, G., Kobisch, M. & Nicolet, J. Cloning and expression of a species-specific early immunogenic 36- kilodalton protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1991, **59**(4), 1217-1222.
- 6 Futo, S., Seto, Y., Mitsuse, S., Mori, Y., Suzuki, T. & Kawai, K. Molecular cloning of a 46-kilodalton surface antigen (P46) gene from *Mycoplasma hyopneumoniae*: direct evidence of CGG codon usage for arginine. *J Bacteriol* 1995a, **177**(7), 1915-1917.
- 7 Zhang, Q., Young, T.F. & Ross, R.F. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. *Infect Immun* 1995, **63**(3), 1013-1019.

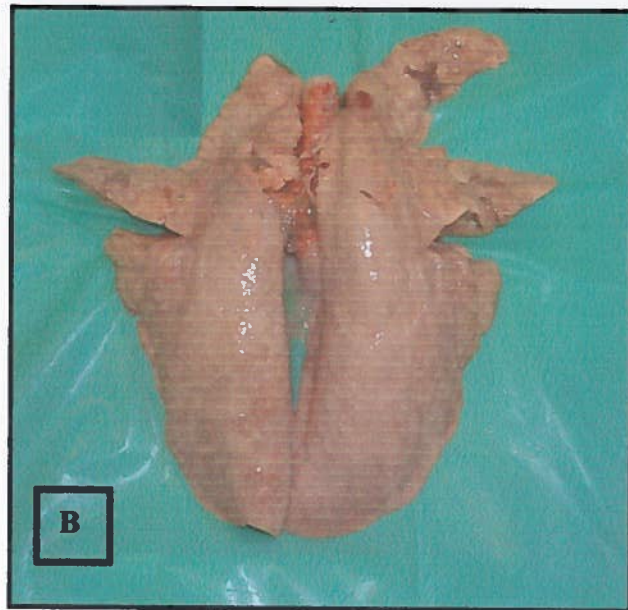
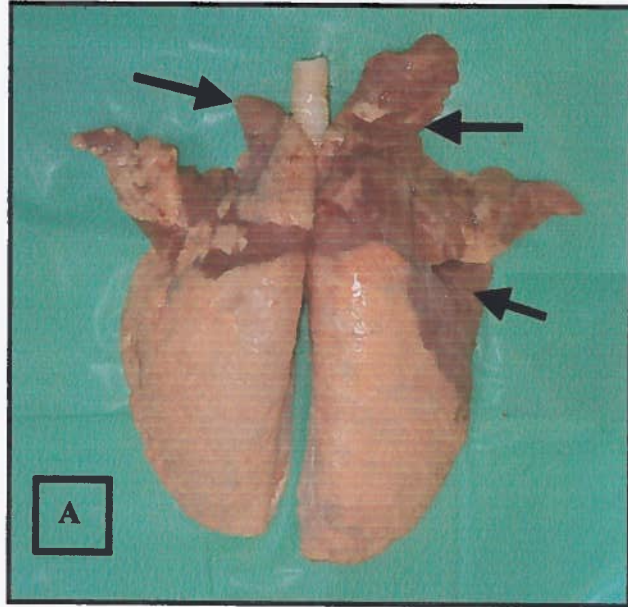
- 8 Futo, S., Seto, Y., Okada, M. *et al.* Recombinant 46-kilodalton surface antigen (P46) of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *Escherichia coli* can be used for early specific diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1995b, **33**(3), 680-683.
- 9 Armstrong, C.H., Sands-Freeman, L. & Freeman, M.J. Serological, pathological and cultural evaluations of swine infected experimentally with *Mycoplasma flocculare*. *Can J Vet Res* 1987, **51**(2), 185-188.
- 10 Calsamiglia, M., Pijoan, C. & Trigo, A. Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. *J Vet Diagn Invest* 1999, **11**(3), 246-251.
- 11 Harasawa, R., Koshimizu, K., Takeda, O., Uemori, T., Asada, K. & Kato, I. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA by the polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 1991, **5**(2), 103-109.
- 12 Feld, N.C., Qvist, P., Ahrens, P., Friis, N.F. & Meyling, A. A monoclonal blocking ELISA detecting serum antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol* 1992, **30**(1), 35-46.
- 13 Friis, N.F. The pathogenicity of *Mycoplasma flocculare*. *Acta Vet Scand* 1973, **14**(2), 344-346.
- 14 Caron, J., Ouardani, M. & Dea, S. Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes. *J Clin Microbiol* 2000, **38**(4), 1390-1396.
- 15 Artiushin, S., Stipkovits, L. & Minion, F.C. Development of polymerase chain reaction primers to detect *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Mol Cell Probes* 1993, **7**(5), 381-385.

- 16 Blanchard, B., Kobisch, M., Bove, J.M. & Saillard, C. Polymerase chain reaction for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in tracheobronchiolar washings from pigs. *Mol Cell Probes* 1996, **10**(1), 15-22.
- 17 Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977, **74**(12), 5463-5467.
- 18 Smith, D.B. & Johnson, K.S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 1988, **67**(1), 31-40.
- 19 Ouardani, M., Wilson, L., Jette, R., Montpetit, C. & Dea, S. Multiplex PCR for detection and typing of porcine circoviruses. *J Clin Microbiol* 1999, **37**(12), 3917-3924.
- 20 Caron, J., Sawyer, N., Ben Abdel Moumen, B., Cheikh Saad Bouh, K. & Dea, S. Species-specific monoclonal antibodies to *Escherichia coli*-expressed p36 cytosolic protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000, **7**(4), 528-535.
- 21 Mori, Y., Hamaoka, T., Sato, S. & Takeuchi, S. Immunoblotting analysis of antibody response in swine experimentally inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Immunol Immunopathol* 1988, **19**(3-4), 239-250.

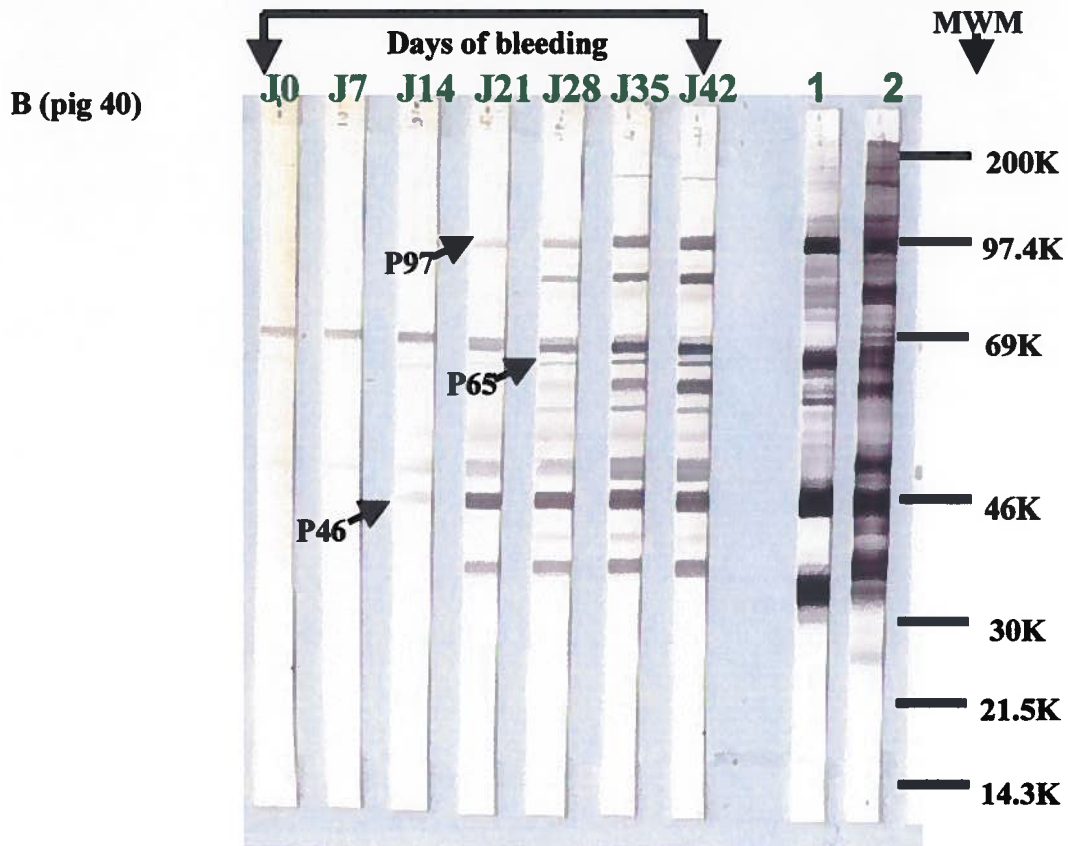
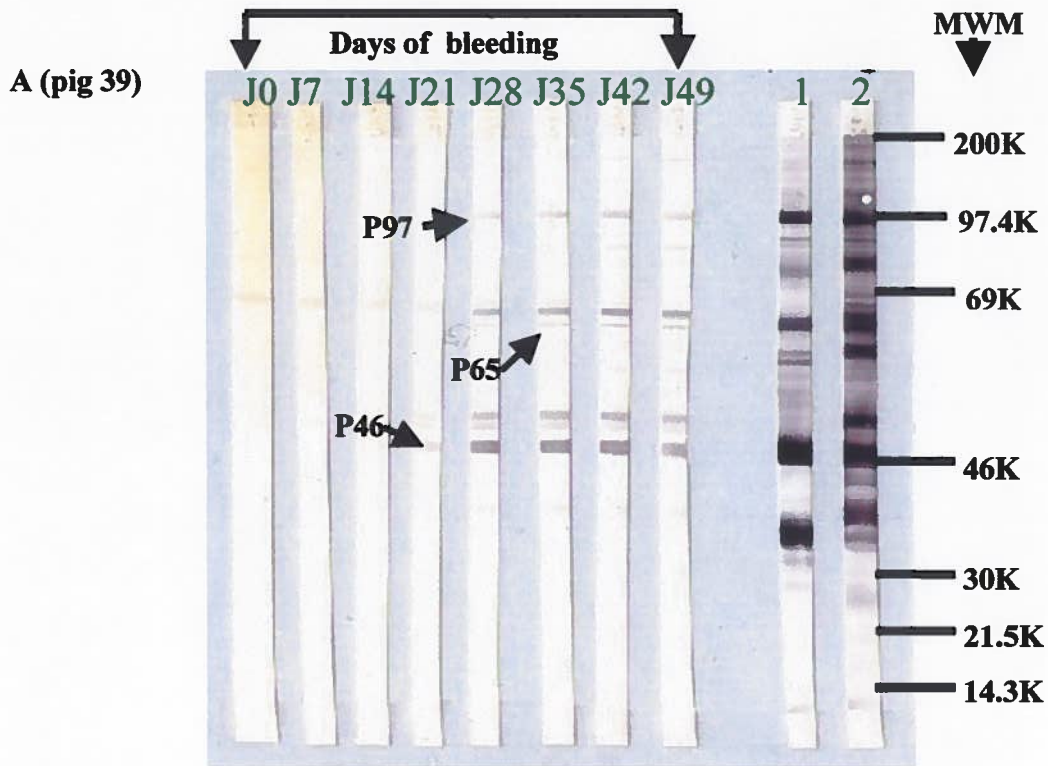
**FIG.1. Macroscopic observation of infected and non-infected pigs lungs.**

A) Characteristic plum-colored lesions confined to apical and cardiac lobes as indicated by arrows; B) Appearance of non-infected pig lung.

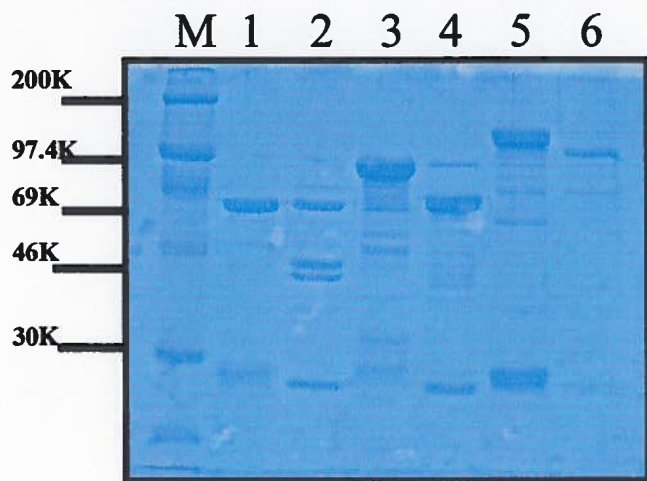




**FIG.2. Western blot analysis of infected pigs ( Fig.2A: pig#39; Fig. 2B: pig#40) sera by using the *M. hyopneumoniae* whole cell as antigenic preparation. The figures illustrate the kinetic of humoral response against P46, P65 and P97 proteins. lane 1, positive control using pool of monoclonal antibodies (anti-P36, anti-P46, anti-P65 and anti-P97); lane 2, positive control using polyclonal antibodies against *M. hyopneumoniae*; the other lanes shown the reactivity depending of bleeding day (J0 to J49 for pig#39 or J0 to J42 for pig#40); MWM, Rainbow molecular weight markers.**



**FIG. 3 Expression of recombinant P46 , P65 and P97 fusion proteins in *E. coli*.** Lane 1, purified GST-P46 recombinant fusion protein (72 kDa); Lane 2,cleaved recombinant GST-P46 fusion protein (46 kDa); Lane 3, purified GST-P65 recombinant fusion protein (91kDa); Lane 4, cleaved GST-P65 recombinant fusion protein (65 kDa); lane 5, purified GST-P97 recombinant fusion protein ( 123 kDa); cleaved GST-P97 recombinant fusion protein (97 kDa); M, Rainbow molecular weight markers.

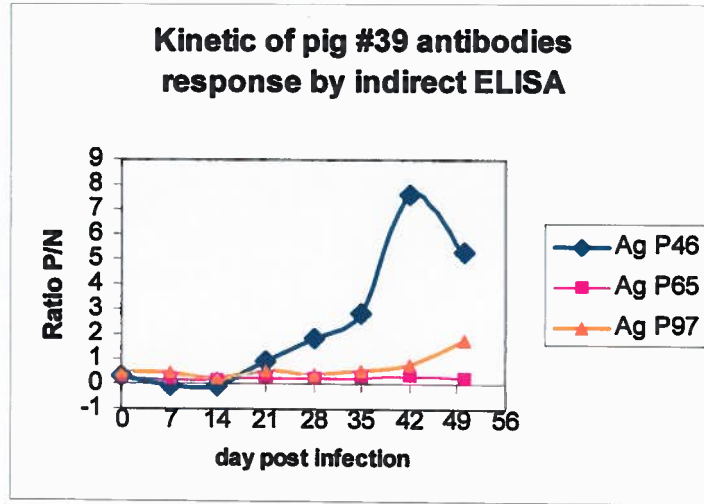


**FIG.4A and 4B. Kinetic of humoral response by ELISA of infected pigs sera using P46, P65 and P97 recombinant proteins as antigens. The values are expressed in optical density ( $A_{450}$ ) ratios P/N.  $P/N = \text{OD of tested sera} - \text{OD of buffer} / \text{OD of negative sera} + \text{OD of buffer}$ , positive reaction is  $P/N \geq 1$ .**

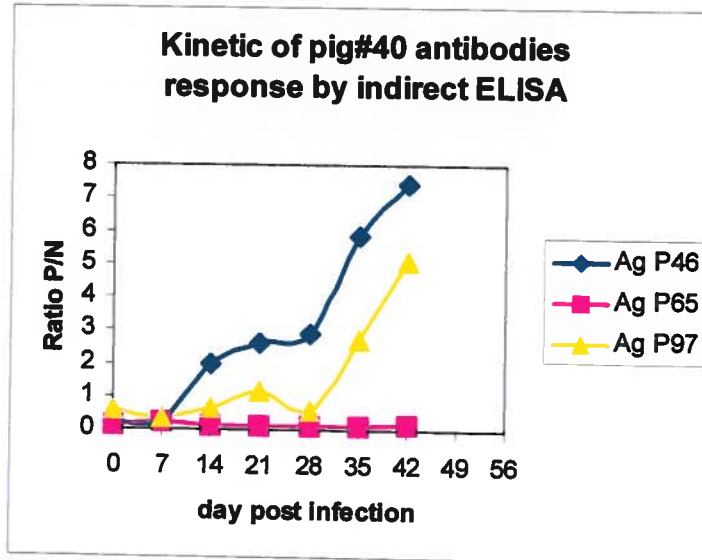
Fig. 4A: Sera of Pig # 39

Fig. 4B: Sera of Pig # 40

(A)



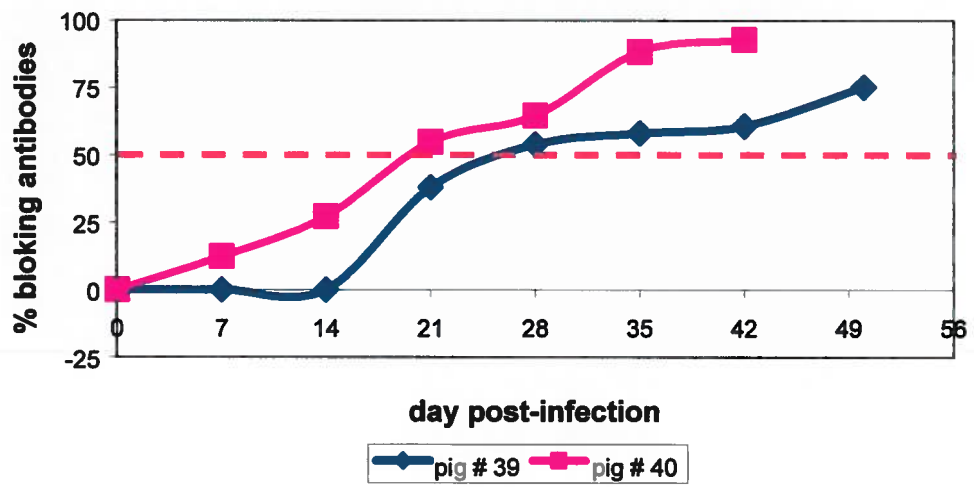
(B)



**FIG. 5. Kinetic of antibody response of pig # 39 and pig # 40 by Dako blocking ELISA. Positive reaction when  $\geq 50\%$  of blocking.**

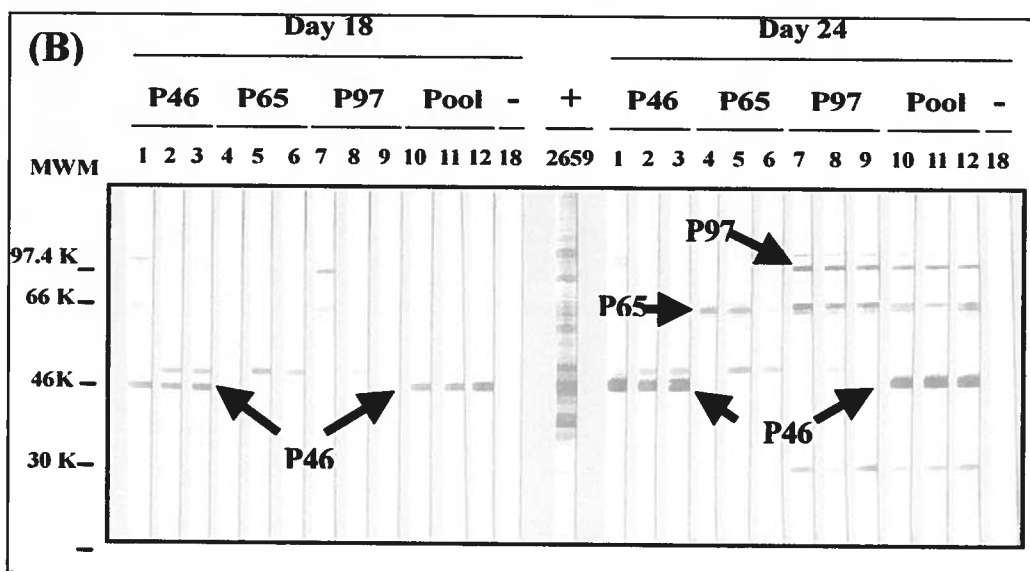
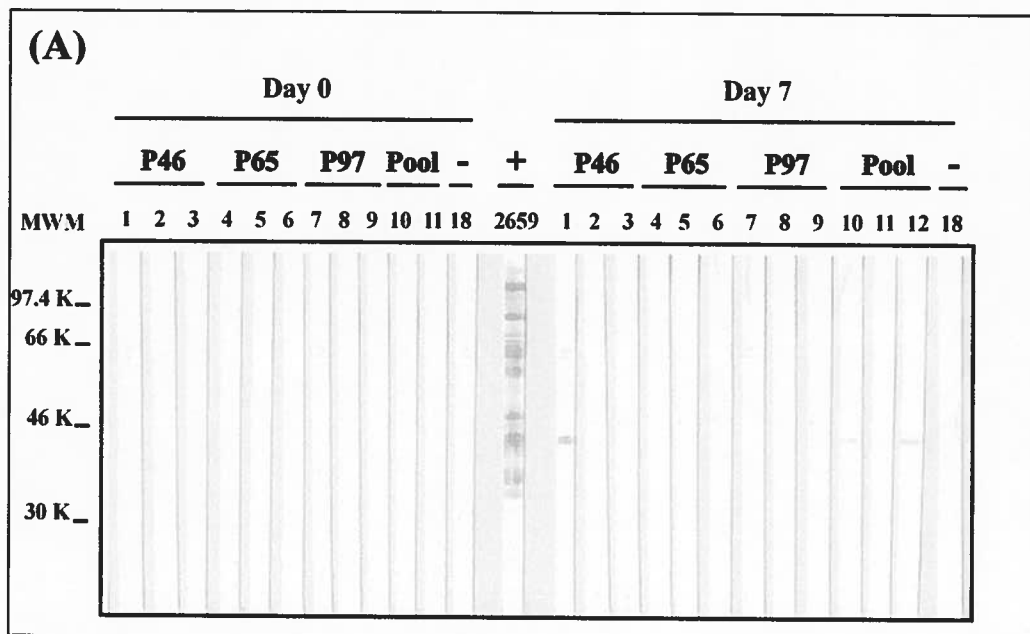


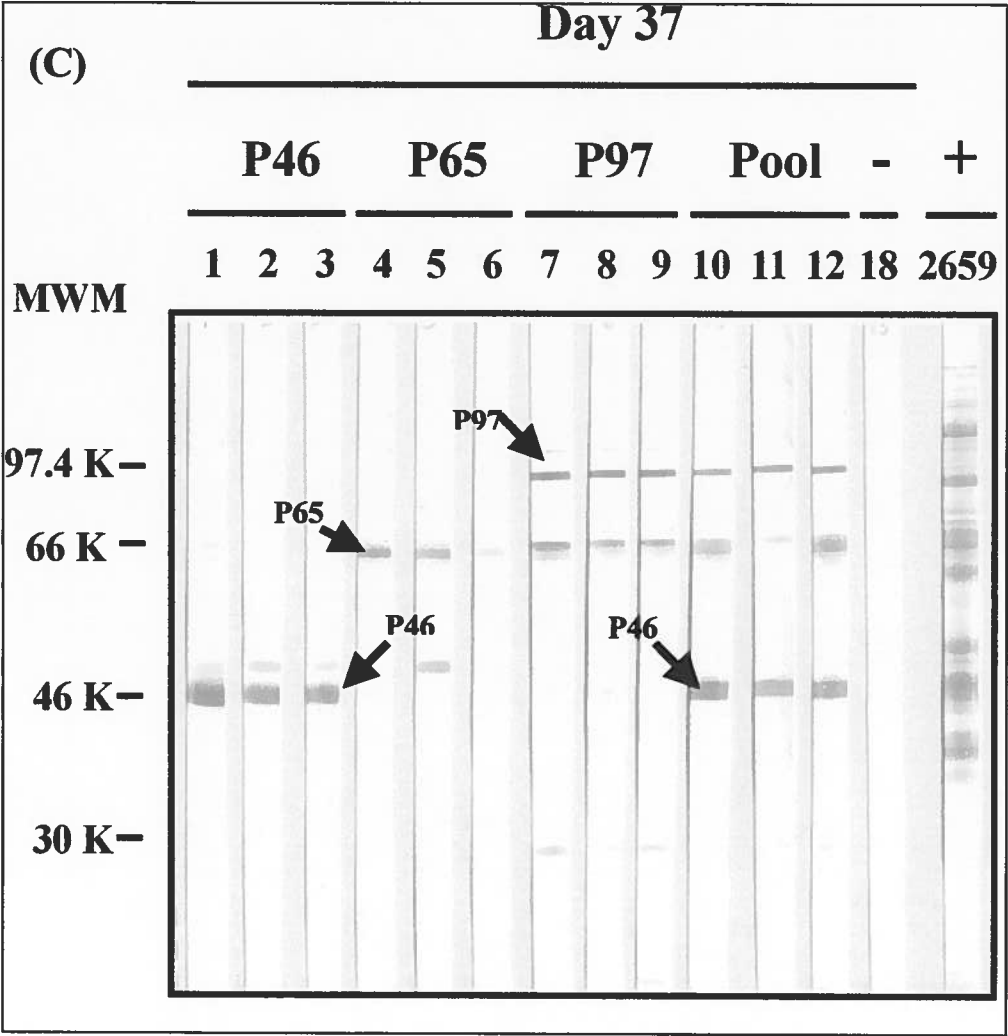
### Kinetic of P74 antibodies response by Dako bloking ELISA



**FIG. 6. Western blot of hyperimmunized pigs sera by using *M. hyopneumoniae* as antigenic preparation. The reactivity has been followed for 37 days and the pigs were divided in 4 groups of 3 and 1 group of one pig. Lanes 1, 2, 3 = pigs immunized with P46 rec. protein; lanes 4, 5, 6 = pigs immunized with P65 rec. protein; lanes 7, 8, 9 = pigs immunized with P97 rec. protein; lanes 10, 11, 12 = pigs immunized with pool (P46+P65+P97); lane 18 = non immunized pig ; lane 2659 = polyclonal against *M. hyopneumoniae* as positive control; The molecular weight markers are indicated in the left of each figure.**

- A): Day 0 and day 7 after immunization
- B): Day 18 and day 24 after immunization
- C) Day 37 after immunization





**Immunization of pigs with P46, P65 and P97 *Mycoplasma hyopneumoniae*  
recombinant proteins and study of their potential as sub-unit vaccines**

**K. CHEIKH SAAD BOUH, Y. ST-PIERRE, F. SHARECK\* AND  
S. DEA<sup>(1)</sup>**

(1) : deceased january 2003

**INRS-Institut Armand-Frappier Université du Québec, 531 boul. des Prairies, Laval, PQ,  
Canada, H7V 1B7**

**Running title: Vaccine potential of *M. hyopneumoniae* recombinant proteins**

---

**\*Corresponding author mailing address:**

**INRS-Institut Armand-Frappier**

**Université du Québec**

**531, boul. des Prairies**

**Laval, Qc, Canada**

**H7V 1B7**

**E. MAIL: [francois.shareck@inrs-iaf.quebec.ca](mailto:francois.shareck@inrs-iaf.quebec.ca)**

**Vaccine (soumis)**

## Résumé

*Mycoplasma hyopneumoniae* est l'agent causal de la pneumonie enzootique porcine, qui est une maladie contagieuse respiratoire retrouvée un peu partout dans le monde. Cette affection est responsable d'importantes pertes économiques à l'industrie porcine et la pneumonie entraîne des lésions au niveau des régions crânio-ventrales du poumon. La lutte contre cette maladie est difficile du fait que les mycoplasmes sont des bactéries sans paroi, par conséquent la plupart des antibiotiques sont inefficaces. Les codons TGA ont été remplacés par des TGG par mutagenèse dirigée et les protéines recombinantes ont été exprimées dans un vecteur procaryote pGEX-4T1. Durant cette étude, nous avons évalué la protection conférée par les protéines recombinantes P46, P65 et P97 après une infection défi des porcs avec une souche virulente de *M. hyopneumoniae*. De même nous avons quantifié les différentes populations cellulaires dans les surnageants des lavages bronchoalvéolaires (LBA) et nous avons investigué la corrélation possible entre ces populations cellulaires et l'activité protéolytique. Les résultats nous ont démontré que les protéines recombinantes peuvent protéger les porcs contre les lésions à *M. hyopneumoniae*. D'autre part, la population cellulaire majoritaire dans les lavages bronchoalvéolaires lors d'infection à *M. hyopneumoniae* est probablement des monocytes/macrophages. La sécrétion de MMP-9 observée dans les LBA des porcs qui ont subi une infection défi semble être en corrélation avec la population cellulaire majoritaire.

## ABSTRACT

*Mycoplasma hyopneumoniae* is the causative agent of porcine pneumonia which is a worldwide contagious pulmonary disease. This disease is responsible for important economic losses in pig production. The strategy to control this disease using antibiotics is limited, due to the lack of cell wall in this bacteria, and controversial as it may increase antibiotic resistance and is a public concern in regards to antibiotics residues in animal products. In the present study we have evaluated the protection conferred by P46, P65 and P97 recombinant *M. hyopneumoniae* proteins against an experimental challenge with *M. hyopneumoniae* virulent strain IAF-DM9827. Prior to generation of expression constructs, TGA non-sense codons, exceptionnaly used for tryptophan residues by *M. hyopneumoniae*, had been converted to TGG codons by PCR directed mutagenesis. Furthermore, we determined the population of cell types retrieved in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of experimental pigs and we have investigated a possible correlation between cells present in local lesions and matrix metalloproteinase (MMP) activity. The results showed that the recombinant proteins can protect pigs against *M. hyopneumoniae* lung lesions. The majority of cells retrieved in the BALF are SWC+ cells probably monocytes/macrophages. We also observed the secretion of MMP-9 in the BALF of challenged pigs and this observation is in correlation with the type of BALFs cell populations.

## 1. INTRODUCTION

Porcine pneumonia is a worldwide contagious pulmonary disease which is caused by *Mycoplasma hyopneumoniae* [1,2]. This disease is responsible for important economic losses in pig production. The enzootic pneumonia (EP) caused by this agent is characterized by cranio-ventral lesions in the lungs [3]. The infection caused by a primary agent such as *M. hyopneumoniae* can be followed by secondary infections by other pathogens like *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida* or porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) [4,5].

The genome of *M. hyopneumoniae* encodes for several immunodominant proteins, amongst which are the P36 cytosolic protein, the P46, P65 and P74 membranous proteins and the P97 adhesin. Sequence analysis of P46, P65 and P97 encoding genes revealed the presence of respectively, three, one and four translation or nonsense UGA codons, which are exceptionally used for tryptophan residues, in addition to TGG in several mycoplasma genes [6]. Some of these proteins are known to trigger specific antibody responses in post-weaning and growing pigs following acute or initial infection with *M. hyopneumoniae* [6,7].

Although virulence factors of *M. hyopneumoniae* have not been characterized, it has been recognized that the adherence of the micro-organism to the respiratory ciliated epithelium is an important first step in colonization and infection [8]. Indeed, during this process the organism binds specifically to cilia and not to other membrane surfaces of the respiratory tract. The binding of the organism to the cilia induces a reduction of ciliary activity, with damage and loss of cilia, eventually resulting in decreased function of the natural defense mechanisms of the respiratory tract [9-11]. The factor responsible for adherence of *M. hyopneumoniae* to cilia of the epithelial lining of the respiratory tract was identified and designated as P97 adhesin [12].

*M. hyopneumoniae* colonizing the respiratory tract, interacts initially with alveolar macrophages [13]. In the lungs of pigs infected by *M. hyopneumoniae*, the pneumonia is characterized by accumulation of lymphocytes in peribronchial and perivascular regions and the infiltration of inflammatory cells into the airways [14]. Bronchoalveolar lavage



fluids (BALFs) of pigs infected by *M. hyopneumoniae* exhibit an increase in proinflammatory cytokines such as IL-6, IL-1, and TNF- $\alpha$  [13,15], and a correlation between TNF- $\alpha$  secretion and the increase of cells such as macrophages and neutrophils in BALF has been reported [16].

Several reports have shown that the production of extracellular proteases can act as a major contributing factor in immune lung disorders [17]. These localized extracellular proteases, essentially matrix metalloproteases (MMPs), may disorganize the local tissue architecture by the degradation of the matrix proteins [18]. The role of proteases in immune lung disorders has been essentially studied in specific genetic diseases. However, the effect of MMP production in *M. hyopneumoniae* lung infection is unknown. *M. hyopneumoniae* infected pigs have shown an increase of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) [16].

The strategy to control this disease using antibiotics is limited, due to the lack of cell wall in this bacteria, and it may increase antibioresistance of bacteria [19-22]. The prophylactic strategy by vaccination is crucial to efficiently control the infection by *M. hyopneumoniae*. The development of vaccines against *M. hyopneumoniae* is essentially based upon whole-cell or membrane preparations [23], however a variation in efficacy of such vaccines was observed [24]. Recently, the protective capability of the P97 adhesin was examined; however, intramuscular immunization of recombinant P97 with complete Freund's adjuvant did not provide significant protection to pigs [25]. A vaccine based on the *M. hyopneumoniae* 124-kDa protein (designated Mhp1) has been developed but its potential protection against *M. hyopneumoniae* infection was minimal [22].

The first aim of the present study was to evaluate, the protection conferred by vaccination of pigs with either the membranous recombinant proteins (P46 or P65) or the adhesin protein (P97) of *M. hyopneumoniae*. Secondly, we examined the cell population retrieved in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of experimentally infected pigs and investigated a possible correlation between cells present in local lesions and the presence of matrix metalloproteinase (MMPs) activity.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Microorganisms and growth conditions

The ATCC 25934 strain of *M. hyopneumoniae* was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, and used as the reference strain in this study. The strain was grown in modified Friis medium [26] containing mycoplasma culture-tested free 20% horse serum (Gibco-BRL, New Zealand), 5% fresh yeast extract (Gibco-BRL), methicillin (0.15 mg/ml; Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada), bacitracin (0.15mg/ml; Sigma-Aldrich) and thallium acetate (0.08mg/ml; Sigma-Aldrich). The cells were harvested by centrifugation at 12,000 x g for 30 min at 4°C, washed three times and suspended in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4.

### 2.2 Directed mutagenesis of TGA codons by PCR

The replacement of non-sense TGA codons by TGG codons (tryptophane) within the P46, P65 and P97 genes was performed using overlapping sense and antisense oligonucleotidic primers in PCR assays done with cDNA clones that have been obtained from previous amplification reactions. The location in the targeted gene and size of expected modified DNA fragments generated with different primer pairs are depicted in Table 1. The DNA fragments obtained following directed mutagenesis of TGA codons in TGG codons were then ligated by PCR using previously described primer pairs used to amplify the entire P46, P65 and P97 encoding genes respectively (1,260 bp, 1803 bp and 3,327 bp). For directional cloning, two restriction sites (*Bam*H1 and *Sal*1) for P46 and P97 genes and two other (*Eco*R1 and *Sal*1) for P65 gene were added respectively at the 5' and 3' ends of the PCR products. After amplification of expected DNA fragments, all the constructs were sequenced to confirm that changes from A to G occurred at the third position of the triggered codons.

### **2.3 Cloning, expression and purification of GST-P46, GST-P65 and GST-P97 recombinant fusion proteins**

The amplified products were purified using the GFX purification kit (Pharmacia), digested with restriction enzymes *Bam*H1 and *Sal*I for P46, and P97 or *Eco*R1 and *Sal*I for P65, and finally ligated into similarly digested pGEX-4T1 prokaryotic vector, according to the manufacturer's instructions (Pharmacia). The recombinant plasmids were used to transform first, highly competent *E. coli* cells strain HB101, then appropriate plasmids were used to transform *E. coli* BL21DE3 cells (Gibco-BRL) for a more intense expression of the GST-P46, GST-P65 and GST-P97 recombinant fusion proteins. Briefly, overnight cultures of transformed bacteria were diluted 1:10 in a total volume of 120 ml of LB medium containing ampicillin (100 µg/ml) and incubated at 37°C with vigorous shaking (250 rpm) until the OD<sub>600</sub> reached 0.6 to 0.8. Protein expression was induced by the addition of isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (0.1 to 0.5 mM, final concentration) followed by a 5h-incubation period at 28°C with vigorous shaking (250 rpm). The cells were pelleted by centrifugation at 8,000 x g, then resuspended in 6.25 ml of ice-cold 0.1 M PBS (pH 7.4) containing 1mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF; Boehringer Mannheim). Transformed cells were disrupted by sonication, and Triton X-100 (Sigma-Aldrich) was added to a final concentration of 1%, followed by a 30 min incubation period at room temperature to complete the solubilization process. The soluble recombinant fusion proteins were purified by affinity chromatography on glutathione-Sepharose 4B beads (Pharmacia) and either eluted with reduced glutathione (20mM glutathione, 50mM Tris-HCl pH 8.0, 120mM NaCl) or directly cleaved on the column by the addition of 18 U of thrombin followed by a subsequent overnight incubation period to obtain the P46, P65 and P97 moieties.

## 2.4 Vaccination protocol

The recombinant protein preparations used in this study comprised a 100 µg/dose for each animal in a 1 ml final volume mixture of 20% adjuvant + 80% PBS. The oil adjuvant Biagen (Biovet Inc., U.S.A) used was prepared by emulsifying: Drakeol V Mineral oil, Montanide, Tween 80 and Alhydrogel 85. The commercial vaccine used as a control was RESPISURE® (Pfizer Animal Health, U.S.A) at 2 ml/dose as recommended by the manufacturer.

## 2.5 Animals

*In vivo* experimental protocols using pigs were approved by the INRS-IAF Animal Care Committee under the supervision of the Canadian Association for Animal Care. For our experiments, crossbred F1 (Landrace x Yorkshire) castrated specific pathogen-free (SPF) piglets four to five weeks of age were obtained from a breeding farm located in Southern Quebec, Canada. Prior to shipping, the breeding stock and piglets were tested and proven to be seronegative for PRRSV, encephalomyocarditis virus (EMCV), porcine parvovirus (PPV), haemagglutinating encephalomyelitis virus (HEV), transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and *Mycoplasma hyopneumoniae*. The animals were fed commercial feed and water *ad libitum*.

## 2.6 Experimental design

Eighteen crossbred F1 (Landrace X Yorkshire) castrated SPF pigs were used during the vaccination experiment. The immunizations were conducted by intramuscular route in the neck. The pigs were divided into seven groups: pigs from group A to D, three pigs each, were immunized respectively with 100 µg of recombinant (rec.) P46, rec. P65 or rec. P97 or a mixture of these three proteins. For pigs from groups E to G, two pigs each, group E

was immunized with 2 ml of commercial vaccine RESPISURE (Pfizer, U.S.A); group F were non-immunized and infected pigs (positive controls for lesions); and group G were non-immunized and non-infected pigs (negative controls). All vaccinated pigs were given 2 doses at 16 day intervals, and the groups A, B, C, D, E, F were challenged intratracheally 19 days after the second immunization with 8 ml of a culture of the virulent IAF-DM9827 field strain of *M. hyopneumoniae*, corresponding to an infectious dose of  $10^7$  color-changing units/ml. All the groups of pigs were allocated to separate rooms in facilities equipped with a microorganism-free filtered in-flowing and out-flowing air system. The animals were followed clinically and serologically for an 8-week period, then euthanized. Blood was collected at days: 1, 7, 18, 24, 37, 44 and 51 after first immunization. Their lungs were aseptically collected and processed for histopathology, PCR and cultivation attempts in modified Friis medium.

## 2.7 Blastogenic transformation test

At day 37 post-immunization (challenge-day), pigs were treated with xylazine (Bayers) at a dose of 1 mg/kg and blood samples were collected from the anterior *vena cava* in vacuum tubes containing heparin, and then diluted 1:3 in sterile RPMI. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated with Ficoll-Paque (density of 1.077; Pharmacia) by centrifugation at  $1200 \times g$  for 20 min. Mononuclear cells were collected from the buffy coat, pelleted and the residual red blood cells were lysed by incubating with 0.53% ammonium chloride for 10 min at 37 °C. After two washes in RPMI, the leukocyte suspension was adjusted to  $2 \times 10^6$  cells per ml in RPMI containing 20% homologous heat inactivated PRRSV-negative porcine serum, 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin. The proliferation was determined by incubating PBMCs in microtitration plates ( $2 \times 10^5$  /well in triplicate) for 72 h in the presence of various concentrations (triplicate containing 0.32, 1.25, 5 or 20 µg/ml) of concanavalin A (ConA; Sigma). After a 48 h stimulation period, the cells were labelled for 18 h with [ $^3$ H]thymidine (Amersham; 0.1 µCi /well), harvested with a semi-automatic cell harvester

(Skatron Instruments) and the incorporated radiolabelled nucleotide was measured by scintillation counting after addition of a fluorescent liquid scintillator (Cytoscint ; ICN). The level of proliferation was expressed as the mean of counts per minute (CPM) of the test wells minus the mean of the background CPM in control wells. The control for background levels consisted of PBMC cultures in medium alone.

## **2.8 Bronchoalveolar lavage (BAL)**

At day 21 post-challenge, the eighteen piglets were euthanized and their lungs were collected aseptically and filled with 100 ml PBS supplemented with 1% penicillin-streptomycin, 0.2% gentamycin and 0.4% amphotericin B (Fungizone). The PBS-filled lungs were then massaged and 35–45 ml of lavage fluid were obtained by applying gentle uniform pressure onto the lungs. The BALs were then clarified by centrifugation at 300 x g for 20 min to separate supernatant (BALF) and cells. The BALF was used for the detection of metalloproteinase activity and the cells for flow cytometric study. Lung samples were specifically taken from dark-red, collapsed zones showing typical signs of infection; some were frozen, others were fixed in formalin.

## **2.9 Flow-cytometric analysis**

Cells obtained following bronchoalveolar lavage were used in this experiment. The cells were stained with anti-SWC-3-fluorescein isothiocyanate (FITC), anti-CD1-FITC, anti-CD4-phycoerythrin (PE) and anti-CD8-FITC as previously described [27].

## **2.10 Microscopic analysis of tissue sections**

Thin sections (5  $\mu\text{m}$  thick) of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from the lungs of experimentally-infected pigs were routinely processed for hematoxyline-phloxine-safran (HPS) staining, as previously described [28] with some modifications.

## **2.11 Detection of MMPs by zymography**

Gelatinolytic activity in the BALFs of experimental pigs was determined by SDS-PAGE-gelatin zymography, as described previously [29] with minor modifications. Briefly, aliquots of BALs were mixed with 5  $\mu\text{l}$  of non-reducing loading buffer (for 8 ml: 2.8 ml of  $\text{dH}_2\text{O}$ ; 1ml of 0.5M Tris-HCl, pH 6.8; 0.8 ml of glycerol; 3.2 ml 10% (w/v) SDS; 0.2 ml of 0.2% bromphenol blue) and then analysed by electrophoresis on an 8% SDS-polyacrylamide gel containing 1 mg/ml of gelatine type III. After electrophoresis, the gel was washed to remove SDS and incubated in a renaturing buffer (50 mM Tris, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1% Triton X-100, 0.02%  $\text{NaN}_3$ ) for 18 h at 37  $^\circ\text{C}$ . The gel was then stained with Coomassie Brilliant Blue and destained in 30:10:60 methanol/acetic acid/water. Proteolytic activity was identified as a clear band on a blue background.

## **3. Results**

### **3.1 Immunogenicity of recombinant proteins**

In the first experiment, we have tested the potential of recombinant (rec.) proteins to elicit immune response in pigs. The results showed that the rec. proteins are immunogenic in pigs. Indeed, 21 days after the first immunization, we observed a good seroconversion of P46 and P97 immunized pigs and after 35 days for P65 immunized pigs by using

homologous antigens in ELISA (Fig.1). These results were also confirmed by blastogenic transformation of PBMC using concanavalin A (conA) as a mitogen (Fig. 2). The results with ConA stimulation showed non-specific lymphocyte proliferation of immunized pigs PBMC compared to control pigs (group G). Also these results suggested that the experimental pigs were not immunosuppressed before challenge infection.

### 3.2 Macroscopic and microscopic lesions in the lungs

In the second experiment, we challenged non-vaccinated (group F) and vaccinated pigs (group A, B, C, D and E) to reproduce *M. hyopneumoniae* characteristic lesions and to show lesion reduction related to vaccination respectively. Three weeks after the intratracheal challenge by *M. hyopneumoniae*, the lungs of euthanized pigs were collected. Macroscopic observation of non immunized and infected pigs (group F) revealed *M. hyopneumoniae* characteristic lesions confined entirely to the cranial and cardiac lobes (Fig 3-f). The control group G, non-immunized and non-infected pigs showed no apparent lesions (Fig. 3-g). Regarding vaccinated pigs, we observed a very important reduction of lesions (Fig. 3-a, b, c, d, and e) compared to the lungs of non-vaccinated and infected pigs (Fig. 3-f). The mean proportions of the lungs surfaces of experimental pigs with pneumonic lesions are presented in Table 2. The magnitude of the lesions ranged from none in the unvaccinated non-infected group G to severe (35 to 45%) in unvaccinated infected pigs (group F). Our results revealed that the vaccination of pigs by intramuscular route with *M. hyopneumoniae* P46, P97 and P65 rec. proteins can drastically reduce the proportion of lung lesions.

The histopathological observation by hematoxylin-phloxine-safran (HPS) staining showed large infiltration in bronchiolar airways of non-immunized and infected pigs (group F) (Fig.4-B) compared to the vaccinated and challenged animals (groups A, B, C, D and E ), an example is shown in Fig. 4-C. The non-immunized and non-infected pigs (group G) showed no such infiltration (Fig.4-A).



### 3.3 Flow-cytometric analysis

In this experiment, we have conducted an investigation on the percentage of different cell populations in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) by indirect staining. The flow cytometric analysis demonstrated that the majority of cell subsets in the BALF are SWC3+, probably monocytes/macrophages ( Figs. 5). This observation was correlated with the HPS staining ( Fig.4-E and F) in which high levels of monocytes/macrophages were present in tissue infiltration compared to normal lung (Fig. 4-D).

### 3.4 MMP detection by zymography

In this experiment of zymography in SDS-PAGE-gelatin, the results showed that the level of gelatinase B (MMP-9) had increased 3 weeks after challenge day in vaccinated and infected pigs (Fig. 6, lanes 1 to 14) but not in non-immunized and non-infected pigs (negative control) (Fig. 6, lanes 17 and 18). The intensity was higher in vaccinated pigs compared to non-vaccinated and infected pigs.

## 4. Discussion

*M. hyopneumoniae* is a fastidious microorganism that is difficult to isolate in culture from clinical specimens on a routine basis, and is the only recognised etiological agent of enzootic pneumonia in pigs [30]. Porcine pneumonia is chronic with worldwide distribution. *M. hyopneumoniae* shares some antigenic determinants with less virulent species, such as *Mycoplasma hyorhinis* and *Mycoplasma flocculare* [31]. Both of these properties hampered the development of accurate diagnostic tests necessary for the establishment of controlled epidemiological programs. The inefficacy of inactivated or killed vaccines (bacterins) to prevent pig infection by *M. hyopneumoniae*, results from a

poor stimulation of the specific mucosal immunity. Membranous proteins, particularly the P46, P65 lipoproteins and the adhesin P97, have been demonstrated to carry species-specific antigenic determinants [12], but their association with a protective immune response was previously never investigated [32].

In the present study, the P46 and P65 membranous proteins and P97 adhesin of *M. hyopneumoniae* were successfully expressed in *E. coli*, provided that TGA stop codons were substituted by TGG using directed overlapping PCR mutagenesis. Moreover, the prokaryotic pGEX-4T1 expression system has been shown to easily and rapidly yield large quantities of pure proteins [33], and the presence of a thrombin protease recognition site downstream of the GST coding sequence allowed the cleavage of the desired protein from the fused GST tag. Different incubation temperatures and concentrations of IPTG used for the induction were tested to optimize the level of production of the recombinant protein and to avoid its accumulation in the form of inclusion bodies [34]. Another advantage of this expression system is that GST protein is not present in *E. coli*; hence, pig sera should not possess any antibodies that would react against this protein and interfere with data obtained from serological tests.

The *E. coli*-expressed recombinant proteins displayed the antigenicity of the authentic proteins being recognized by convalescent pig sera by Western blotting and ELISA (data not shown). We have reported previously that the immunogenicity of both native and recombinant proteins was preserved since following their injection in SPF pigs antibodies reacted specifically to the authentic P46, P65 and P97 proteins in Western blotting analysis. In the present study, 21 days after the first immunization, we have observed a good seroconversion of P46 and P97 immunized pigs which occurred only after 35 days for P65 immunized pigs using homologous antigens in ELISA. These data confirm our previous results (data not shown) regarding the fact that the kinetics of antibody appearance against *M. hyopneumoniae* major proteins are P46, P97, P74 and finally P65. These results help for the best choice of antigens for potential use in diagnostic or vaccine components.

It has been shown that in the case of enzootic pneumonia caused by *M. hyopneumoniae*, the pathogen interacts with alveolar macrophages and induces production of inflammatory cytokines [13]. As we observed in our study (Fig. 5-E and F), the infiltration of inflammatory cells into the airways and lymphocyte accumulation in peribronchial and perivascular regions corroborates what has been reported by previous authors [14]. For the first time, the proteolytic activity of metalloproteinases (MMPs) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of *M. hyopneumoniae* infected pigs was investigated. It has been known that the MMPs are implicated physiologically in tissue remodelling. Moreover in some lung diseases such as asthma, cystic fibrosis or rheumatoid arthritis, high quantities of MMPs are secreted [35]. In the characterization of MMP activity in the BALF, we observed secretion of MMP-9 but not MMP-2 in the lungs of vaccinated and infected pigs. It has been demonstrated that MMP-2 is synthesized by different cells including fibroblasts, endothelial cells and alveolar epithelial cells [36,37] and MMP-9 by inflammatory cells such as monocytes, macrophages, eosinophils and polymorphonuclear neutrophils [38,39].

The proinflammatory cytokines such as IL-1 or TNF- $\alpha$  can initiate the transcription of MMP coding genes [40-42]. As previously described, *M. hyopneumoniae* infected pigs showed an increase of TNF- $\alpha$  in BALF [16]. This observation of MMP-9 activity can be related to the influx of monocytes/macrophages present at the local site of infection. The correlation between MMP-9 secretion and monocytes/macrophages, can be explained by the action of proinflammatory cytokines particularly TNF- $\alpha$  on alveolar macrophages. A correlation could be made between MMP-9 activity in the BALFs of different groups and the number of SWC3+ cells counted in cytometric analysis. The fact that the SWC3 molecules are expressed on the surface of monocytes/macrophages strengthens the hypothesis of MMP-9 secretion by these cells in the BALFs. As several reports have been shown with in human lung disorders [17], the production of extracellular proteases such as MMP-9 can act as a major contributing factor in the enzootic pneumonia lung disease by disorganizing the local tissue architecture. To our knowledge, these results are the first to describe the MMP activity in the lung of *M. hyopneumoniae* infected pigs.

The results of this study demonstrate that the recombinant proteins used as vaccines can protect pigs against lung lesions associated with *M. hyopneumoniae* in comparison with non-immunized and infected-pigs. The reduction in lung lesion scores observed in pigs vaccinated with two-doses of P46 or P65 recombinant proteins was consistent with the result using two doses of *M. hyopneumoniae* bacterin (RespiSure®). The advantage of recombinant proteins as sub-unit vaccines is that they are pure antigens and only those which induce a protective immune response are included. The problem with whole-cell *M. hyopneumoniae* as a bacterin vaccine is that it contains many native proteins and glycoproteins some of which can be immunosuppressive or deleterious as they may compromise the animal's health and lead to the development of disease.

In conclusion, the recombinant P46 and P65 can protect pigs against enzootic pneumonia lesions and this after two doses given intramuscularly. Also, most of the cells retrieved in the BALFs of experimentally pigs are probably monocytes/macrophages (SWC3+ cells) and the MMP-9 activity can be related to their stimulation by TNF- $\alpha$ .

### Acknowledgments

The authors wish to thank D. Legault and L. Wilson for their excellent technical assistance. Particular thanks go to Dr. Charles M. Dozois for critical reading of the manuscript. The authors wish to thank Dr C.A. Gagnon, INRS-Institut Armand-Frappier for his help in experimental infections and necropsies. We also thank Dr. D. Larochelle, Laboratoire de pathologie animale, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, Ste-Foy, Qc. for the preparation of histological sections.

This work was partly supported by the Conseil de Recherches en Pêche et Agro-Alimentaire du Québec (grant # 4600), the Quebec Federation of Swine Producers and Biovet Inc., St-Hyacinthe, Québec, Canada.

## REFERENCES

- 1 Roberts, D.H. Experimental infection of pigs with *Mycoplasma hyopneumoniae* (suipneumoniae). *Br Vet J* 1974, **130**(1), 68-74.
- 2 Piffer, I.A. & Ross, R.F. Effect of age on susceptibility of pigs to *Mycoplasma hyopneumoniae* pneumonia. *Am J Vet Res* 1984, **45**(3), 478-481.
- 3 Pointon, A.M., Byrt, D. & Heap, P. Effect of enzootic pneumonia of pigs on growth performance. *Aust Vet J* 1985, **62**(1), 13-18.
- 4 Yagihashi, T., Nunoya, T., Mitui, T. & Tajima, M. Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection on the development of *Haemophilus pleuropneumoniae* pneumonia in pigs. *Nippon Juigaku Zasshi* 1984, **46**(5), 705-713.
- 5 Ciprian, A., Pijoan, C., Cruz, T. *et al.* *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. *Can J Vet Res* 1988, **52**(4), 434-438.
- 6 Futo, S., Seto, Y., Mitsuse, S., Mori, Y., Suzuki, T. & Kawai, K. Molecular cloning of a 46-kilodalton surface antigen (P46) gene from *Mycoplasma hyopneumoniae*: direct evidence of CGG codon usage for arginine. *J Bacteriol* 1995a, **177**(7), 1915-1917.
- 7 Klinkert, M.Q., Herrmann, R. & Schaller, H. Surface proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* identified from an *Escherichia coli* expression plasmid library. *Infect Immun* 1985, **49**(2), 329-335.

- 8 Piffer, I.A., Young, T.F., Petenate, A. & Ross, R.F. Comparison of complement fixation test and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of early infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am J Vet Res* 1984, **45**(6), 1122-1126.
- 9 Mebus, C.A. & Underdahl, N.R. Scanning electron microscopy of trachea and bronchi from gnotobiotic pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am J Vet Res* 1977, **38**(8), 1249-1254.
- 10 Blanchard, B., Vena, M.M., Cavalier, A., Le Lannic, J., Gouranton, J. & Kobisch, M. Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol* 1992, **30**(4), 329-341.
- 11 DeBey, M.C., Jacobson, C.D. & Ross, R.F. Histochemical and morphologic changes of porcine airway epithelial cells in response to infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am J Vet Res* 1992, **53**(9), 1705-1710.
- 12 Zhang, Q., Young, T.F. & Ross, R.F. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. *Infect Immun* 1995, **63**(3), 1013-1019.
- 13 Asai, T., Okada, M., Ono, M. *et al.* Increased levels of tumor necrosis factor and interleukin 1 in bronchoalveolar lavage fluids from pigs infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Immunol Immunopathol* 1993, **38**(3-4), 253-260.
- 14 Ross, R.F. Mycoplasmal diseases. In: Lemann AD, Straw BE, Glock RD, Mengeling WL, Penny RHC, Scholl E, editors. *Disease of Swine* 1992, 7th ed. Ames, IA: Iowa State University Press, 537-551.

- 15 Faulkner, C.B., Simecka, J.W., Davidson, M.K. *et al.* Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, interleukin 6, and gamma interferon in C3H/HeN and C57BL/6N mice in acute *Mycoplasma pulmonis* disease. *Infect Immun* 1995, **63**(10), 4084-4090.
- 16 Okada, M., Asai, T., Ono, M., Sakano, T. & Sato, S. Cytological and immunological changes in bronchoalveolar lavage fluid and histological observation of lung lesions in pigs immunized with *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivated vaccine prepared from broth culture supernate. *Vaccine* 2000, **18**(25), 2825-2831.
- 17 Greenberger, P.A. Immunologic aspects of lung diseases and cystic fibrosis. *Jama* 1997, **278**(22), 1924-1930.
- 18 Shapiro, S.D. Elastolytic metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Potential roles in destructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1994, **150**(6 Pt 2), S160-164.
- 19 Takahashi, K., Kuniyasu, C., Yoshida, Y. & Momotani, E. Sensitivity in vitro to macrolide antibiotics and tetracyclines of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolated from pneumonic porcine lungs. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)* 1978, **18**(1), 41-42.
- 20 Cohen, M.L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science* 1992, **257**(5073), 1050-1055.
- 21 Williams, P.P. In vitro susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* to fifty-one antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1978, **14**(2), 210-213.



- 22 King, K.W., Faulds, D.H., Rosey, E.L. & Yancey, R.J., Jr. Characterization of the gene encoding Mhp1 from *Mycoplasma hyopneumoniae* and examination of Mhp1's vaccine potential. *Vaccine* 1997, **15**(1), 25-35.
- 23 Weng, C.N., Tzan, Y.L., Liu, S.D., Lin, S.Y. & Lee, C.J. Protective effects of an oral microencapsulated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine against experimental infection in pigs. *Res Vet Sci* 1992, **53**(1), 42-46.
- 24 Fagan, P.K., Djordjevic, S.P., Eamens, G.J., Chin, J. & Walker, M.J. Molecular characterization of a ribonucleotide reductase (nrdF) gene fragment of *Mycoplasma hyopneumoniae* and assessment of the recombinant product as an experimental vaccine for enzootic pneumonia. *Infect Immun* 1996, **64**(3), 1060-1064.
- 25 Shimoji, Y., Oishi, E., Muneta, Y., Nosaka, H. & Mori, Y. Vaccine efficacy of the attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 expressing a recombinant protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin against mycoplasmal pneumonia of swine. *Vaccine* 2003, **21**(5-6), 532-537.
- 26 Friis, N.F. The pathogenicity of *Mycoplasma flocculare*. *Acta Vet Scand* 1973, **14**(2), 344-346.
- 27 Lalancette, M., Aoudjit, F., Potworowski, E.F. & St-Pierre, Y. Resistance of ICAM-1-deficient mice to metastasis overcome by increased aggressiveness of lymphoma cells. *Blood* 2000, **95**(1), 314-319.
- 28 Noel, P., Tabone, E., Michot, J.P., Groleas, M., Hesch, M. & Rifki, A.M. [Detection of micrometastases in excised regional lymph nodes in cancer of the breast. Systematic use of KL1 anticytokeratin monoclonal antibodies in a prospective series of 120 T2 N- patients]. *Ann Pathol* 1989, **9**(4), 265-270.

- 29 Aoudjit, F., Esteve, P.O., Desrosiers, M., Potworowski, E.F. & St-Pierre, Y. Gelatinase B (MMP-9) production and expression by stromal cells in the normal and adult thymus and experimental thymic lymphoma. *Int J Cancer* 1997, **71**(1), 71-78.
- 30 Armstrong, C.H., Scheidt, A.B., Thacker, H.L., Runnels, L.J. & Freeman, M.J. Evaluation of criteria for the postmortem diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine. *Can J Comp Med* 1984, **48**(3), 278-281.
- 31 Frey, J., Haldimann, A., Kobisch, M. & Nicolet, J. Immune response against the L-lactate dehydrogenase of *Mycoplasma hyopneumoniae* in enzootic pneumonia of swine. *Microb Pathog* 1994, **17**(5), 313-322.
- 32 Thacker, E.L., Halbur, P.G., Ross, R.F., Thanawongnuwech, R. & Thacker, B.J. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. *J Clin Microbiol* 1999, **37**(3), 620-627.
- 33 Stipkovits, L., Nicolet, J., Haldimann, A. & Frey, J. Use of antibodies against the P36 protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* for the identification of *M. hyopneumoniae* strains. *Mol Cell Probes* 1991, **5**(6), 451-457.
- 34 Nakano, H., Yamazaki, T., Ikeda, M., Masai, H., Miyatake, S. & Saito, T. Purification of glutathione S-transferase fusion proteins as a non-degraded form by using a protease-negative *E. coli* strain, AD202. *Nucleic Acids Res* 1994, **22**(3), 543-544.
- 35 Atkinson, J.J. & Senior, R.M. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003, **28**(1), 12-24.
- 36 Tetley, T.D. New perspectives on basic mechanisms in lung disease. 6. Proteinase imbalance: its role in lung disease. *Thorax* 1993, **48**(5), 560-565.

- 37 Yao, P.M., Maitre, B., Delacourt, C., Buhler, J.M., Harf, A. & Lafuma, C. Divergent regulation of 92-kDa gelatinase and TIMP-1 by HBECs in response to IL-1beta and TNF-alpha. *Am J Physiol* 1997, **273**(4 Pt 1), L866-874.
- 38 D'Ortho, M.P., Jarreau, P.H., Delacourt, C. *et al.* Matrix metalloproteinase and elastase activities in LPS-induced acute lung injury in guinea pigs. *Am J Physiol* 1994, **266**(3 Pt 1), L209-216.
- 39 Ohno, I., Ohtani, H., Nitta, Y. *et al.* Eosinophils as a source of matrix metalloproteinase-9 in asthmatic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997, **16**(3), 212-219.
- 40 Ulich, T.R., Yin, S.M., Guo, K.Z., del Castillo, J., Eisenberg, S.P. & Thompson, R.C. The intratracheal administration of endotoxin and cytokines. III. The interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist inhibits endotoxin- and IL-1-induced acute inflammation. *Am J Pathol* 1991, **138**(3), 521-524.
- 41 Nishimoto, M., Akashi, A., Kuwano, K., Tseng, CC., Ohizumi, K. & Arai, S. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in the lungs of *Mycoplasma pulmonis*-infected mice. *Microbiol Immunol* 1994, **38**(5), 345-352.
- 42 Asai, T., Okada, M., Ono, M., Mori, Y., Yokomizo, Y. & Sato, S. Detection of interleukin-6 and prostaglandin E2 in bronchoalveolar lavage fluids of pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Immunol Immunopathol* 1994, **44**(1), 97-102.

Table 1.

**Primers for P46 mutagenesis:**

<b>P46BamH1:</b>	5'-ACCGGATCCATGAAAAAATGCCTTAGAAAAAATT-3'
<b>P46Sal1:</b>	5'-CCCGTCGACTTAGGCATCAGGATTATCAAC-3'
<b>Kmut46F2a:</b>	5'-GATAATCCTCGATGGATTAGTGCCCAA-3'
<b>Kmut46R1a:</b>	5'-TTGGGCACTAATCCATCGAGGATTATC-3'
<b>Kmut46F1b:</b>	5'-GCACAAAATAACTGGCTCACTCAGCAA-3'
<b>Kmut46R2b:</b>	5'-TTGCTGAGTGAGCCAGTTATTTGTGC-3'
<b>Kmut46F1c:</b>	5'-TATGTCCCAGGATGGAATTATGGAAC-3'
<b>Kmut46R2c:</b>	5'-AGTTCATAATTCCATCCTGGGACATA-3'

**Primers for P65 mutagenesis:**

<b>FSLp65:</b>	5'-GGCCGGGAATTCATGGCAAAGAAATCATTTTA-3'
<b>65mut2R:</b>	5'-GGCCGGGATCCTTATTTAACAAGCCAATTTACAAT-3'
<b>65mutIF<sub>2</sub>(ATG):</b>	5'-CCGGGATCCATGGTAAATTGGCTTGTTAAAAAAA-3'
<b>R2Sp65:</b>	5'-GGCCGGTTCGACTTAATCCTGCTTGATTTCAGCATC-3'

**Primers for P97 mutagenesis**

<b>P97F1 :</b>	5'-TTTGGATCCATGAGTAAAAAATCAAAAAC-3'
<b>P97F2 :</b>	5'-ATAGTCAAAAGGTGGCTAGTTGATTCTAAT-3'
<b>P97F3 :</b>	5'-ATTAGAATCAACTAGCCACCTTTTGACTAT-3'
<b>P97F6 :</b>	5'-AATTTTGCTCCTTGGGCAAATTAGAC-3'
<b>P97F7 :</b>	5'-GTCTAATTTTGCCCAAGGAGCAAATT-3'
<b>P97F8 :</b>	5'-CAAGGTAAAAATTGGAAAACAGAGGTTG-3'
<b>P97F9 :</b>	5'-CAACCTCTGTTTCCAATTTTACCTTG-3'
<b>P97F10 :</b>	5'-TTTGTGACTTATTTAGATTCTGGTTCCTG-3'
<b>P97R12 :</b>	5'-CTTTTATCTGATTGTAAGGATCCTTTTTC-3'
<b>P97F13 :</b>	5'-TATGAATTCGGGGCCTTTAAATCCGTGCTTAATTCCTGGACAGGAAAAATTCAGC-3'

The diagram shows an example of P97 TGA mutagenesis:

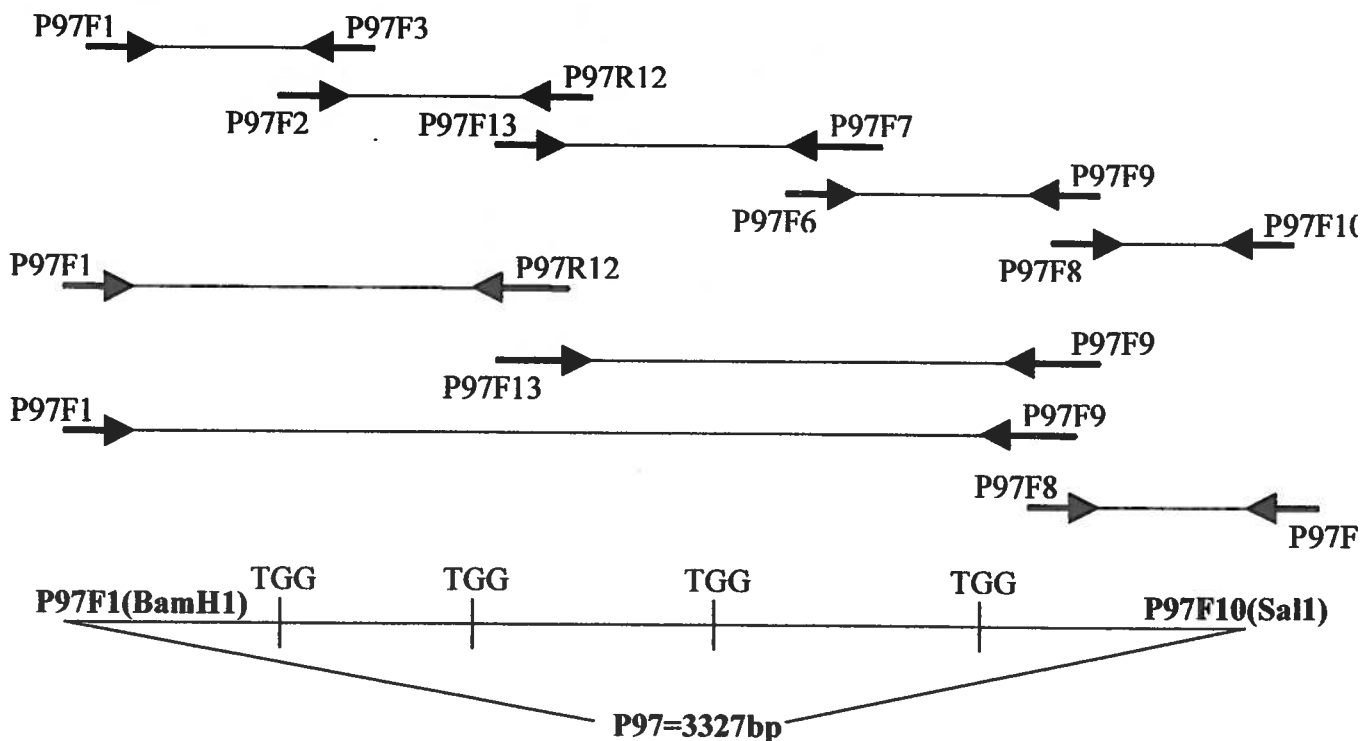
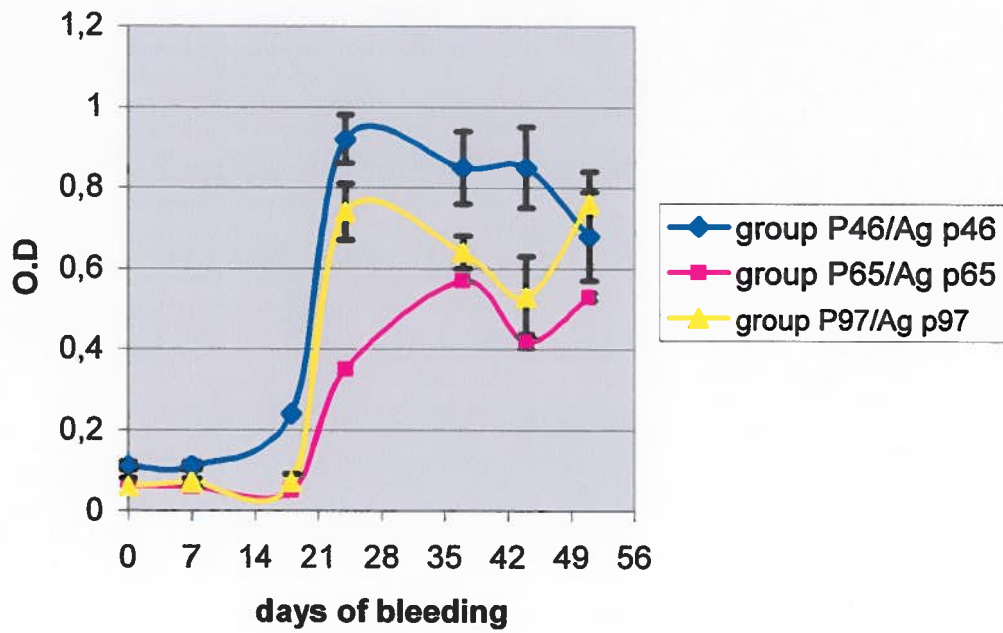


Table 2. Percentage of surface lesions compared to apparent non affected lung tissues

Pig number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
<b>Group</b>	<b>A</b>			<b>B</b>			<b>C</b>			<b>D</b>			<b>E</b>		<b>F</b>		<b>G</b>	
<b>Vaccinated</b>	Yes: P46			Yes: P65			Yes: P97			Yes: Pool			Yes: Pfizer		No		No	
<b>Challenge</b>	Yes			Yes			Yes			Yes			Yes		Yes		No	
<b>% Lesions</b>	1-8			7-10			10-20			2-9			1-5		35-45		0	

**FIG. 1. Kinetics of the humoral response of immunized pigs by ELISA using homologous recombinant P46, P65, P97 proteins as antigens.**

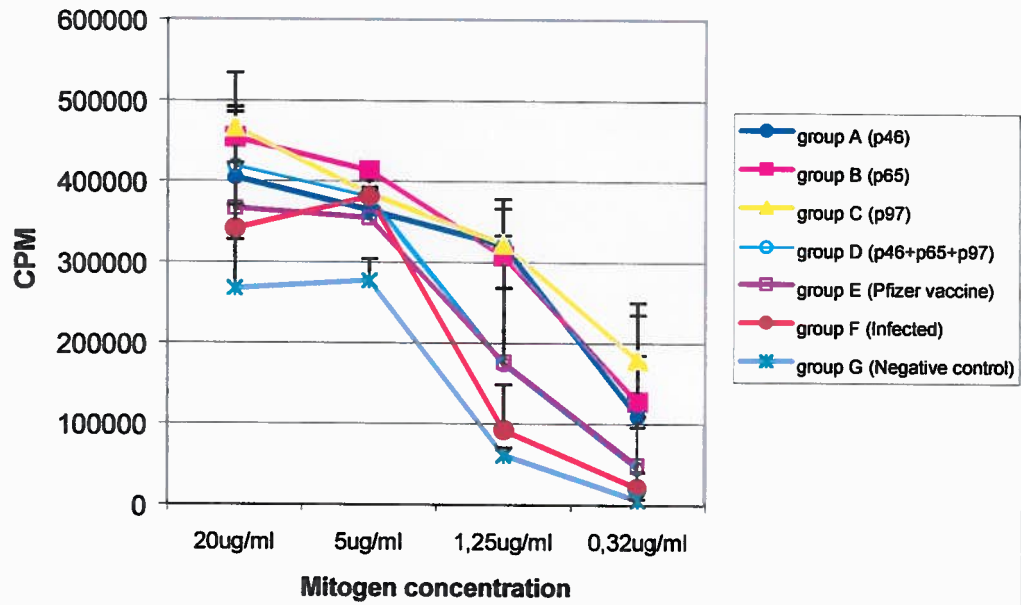
**Kinetic of humoral response of rec. proteins immunized pigs by ELISA**



**FIG.2. Ex vivo blastogenic response of porcine PBMCs following incubation in the presence of different concentrations of concanavalin A (conA) at day 37 post-immunization (challenge-day).**



**Experimental groups versus ConA (Day 37)**

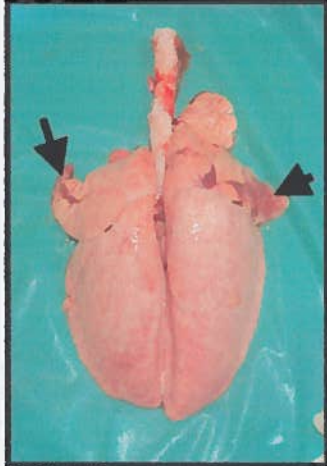


**FIG. 3. Macroscopic observation of experimental pig lungs.** (a) Normal lung appearance of non-vaccinated and non-infected pigs; (b) Lungs of non-vaccinated and infected pigs showing characteristic lesions of *M. hyopneumoniae* infection as indicated by arrows; (c-g) lungs of vaccinated pigs showing drastic reduction of lesions.

**(a)**



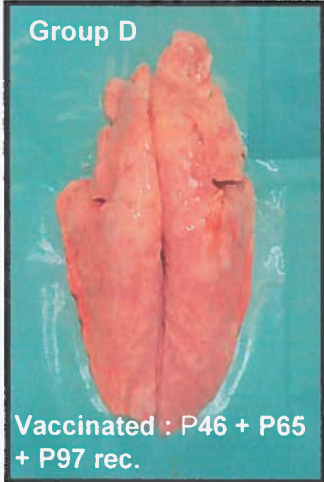
**(b)**



**(c)**



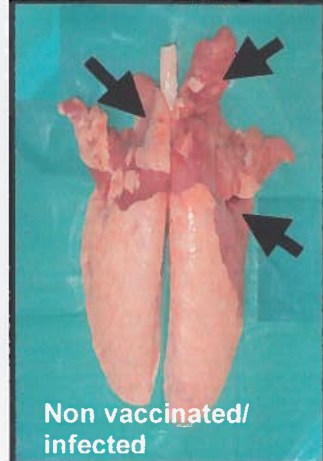
**(d)**



**(e)**



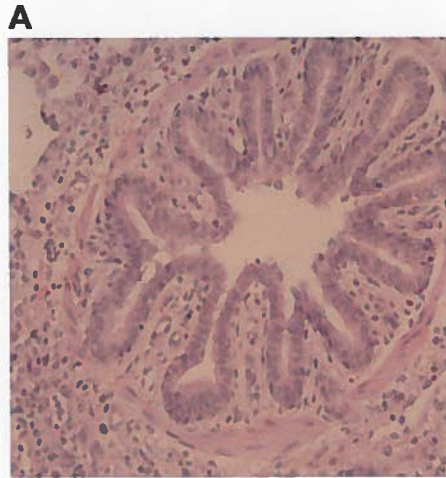
**(f)**



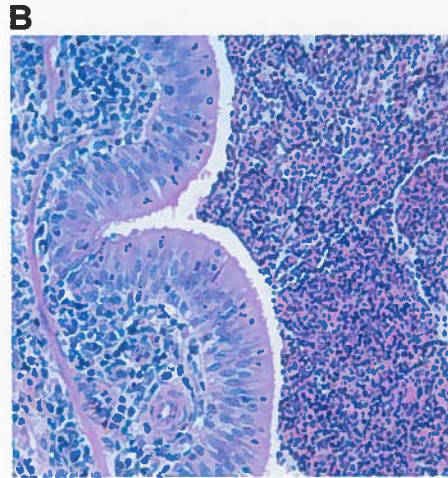
**(g)**



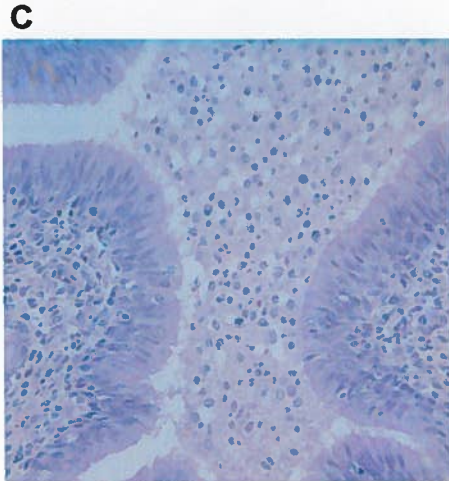
**FIG. 4. Histological sections of lungs** of control pigs (A and D), infected pigs (B and E) and vaccinated pigs (C and F). A) Spongiform aspect of normal pig lung showing well-delineated, thin alveolar septa; B) Very important infiltration of lymphomononuclear cells in the bronchiolar lumen and perivascular region by at day 21 post-infection; C) minor infiltration of lymphomononuclear cells in the bronchiolar lumen by of vaccinated pig lungs; D) General aspect of a peribronchiolar region of normal pig lung at magnification x 40; E) Lymphomononuclear infiltration of infected pig lung showing neutrophils cells and macrophages as indicated by black and white arrows respectively, magnification x 40; F) Lymphomononuclear infiltration of infected pig lung showing macrophages as indicated by white arrows, magnification x 40.



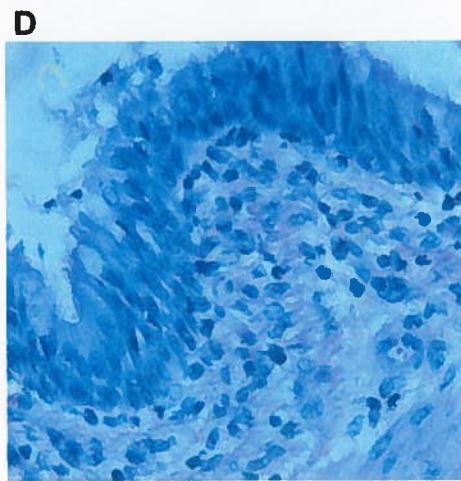
**Non- vaccinated /  
Non- infected**



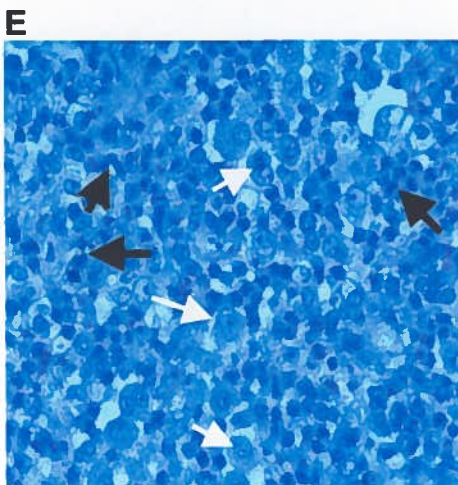
**Non- vaccinated /  
Infected**



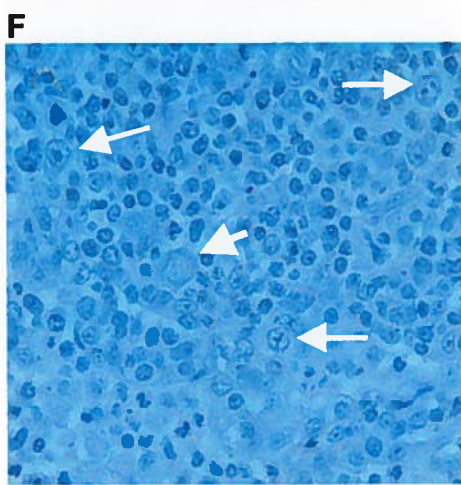
**Vaccinated/ infected**



**Non- vaccinated /  
Non- infected**



**Non- vaccinated / infected**

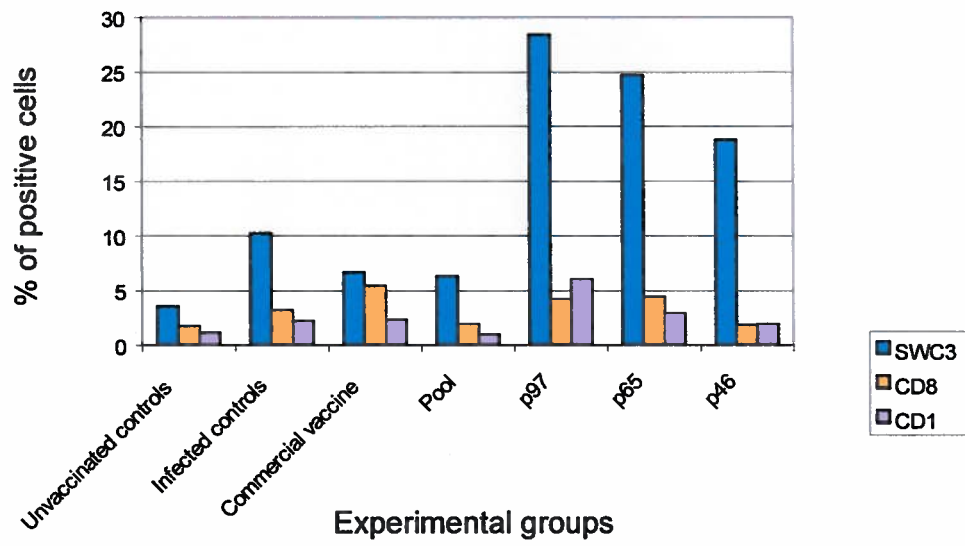


**Vaccinated/ infected**

**FIG. 5. Flow-cytometric profile of bronchoalveolar lavage (BAL) cells**

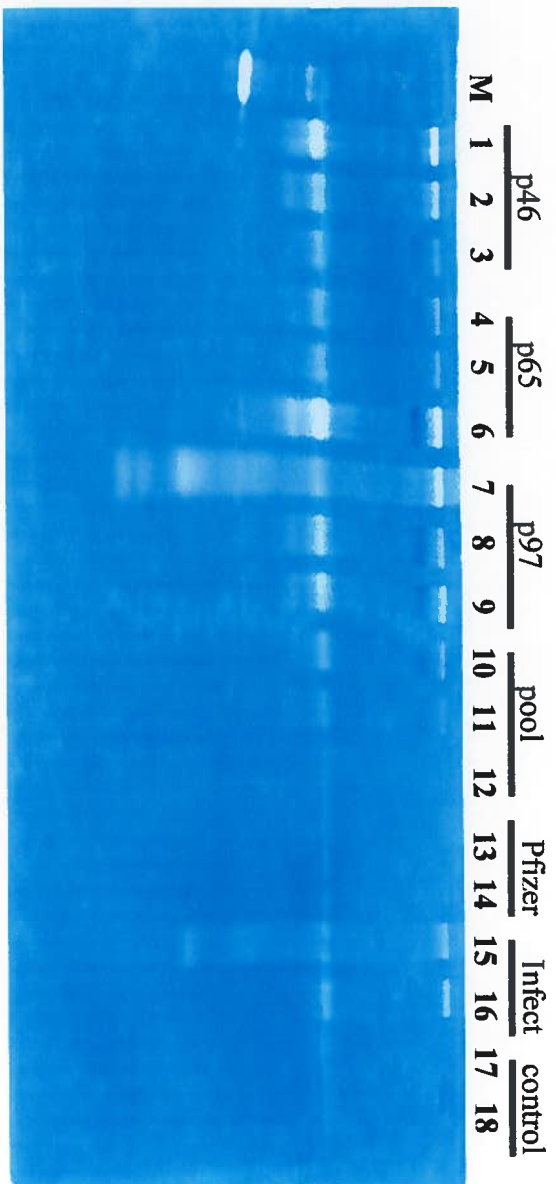


### Cytometric Analysis of BALF



**FIG. 6. Gelatinolytic activity in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of experimental pigs, as determined by zymography analysis. Electrophoretic pattern in 8% SDS-polyacrylamide gel containing gelatin, shows one or two clear bands corresponding to the position of gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9). Lanes 1 to 3, P46 vaccinated pigs; Lanes 4 to 6, P65 vaccinated pigs; Lanes 7 to 9, P97 vaccinated pigs; Lanes 10 to 12, pool (P46+P65+P97) vaccinated pigs; Lanes 13 and 14, commercial vaccine (Pfizer) vaccinated pigs; Lanes 15 and 16, non-vaccinated and infected pigs; Lanes 17 and 18, non-vaccinated and non-infected pigs (controls); Lane M, recombinant MMPs as standard.**





M 1 2 3 p46 4 5 6 p65 7 8 9 p97 10 11 12 pool 13 14 Pfizer 15 16 Infect 17 18 control

↑ MMP-9  
 ↑ MMP-2

**SECTION III**

**DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS**

*M. hyopneumoniae* est l'agent étiologique de la pneumonie enzootique porcine, maladie responsable de pertes économiques considérables pour l'industrie. Aux Etats-Unis, ces pertes sont estimées à plus de \$200 millions par année. La pathologie atteint généralement les porcs de tous âges avec un haut taux de morbidité et un faible taux de mortalité (Ross, 1973; Ross et Spear, 1973; Falk *et al.*, 1991; Ross, 1992; Maes *et al.*, 1996). Les pertes sont associées, en particulier, au retard de croissance des animaux infectés, à l'installation d'autres agents infectieux et aux coûts de la prophylaxie préventive et curative (Yagihashi *et al.*, 1993; Blanchard et Kobisch, 1995; Van Alstine *et al.*, 1996). L'infection se transmet par aérosol, d'où sa dispersion rapide à l'ensemble des animaux du troupeau (Murphy *et al.*, 1993). Les lésions pulmonaires sont généralement observées chez les porcelets et sont caractérisées par une hyperplasie des cellules épithéliales et une augmentation de l'infiltration par les cellules mononucléaires dans les régions périvasculaire et périfonchiolaire (Kobisch et Friis, 1996).

De plus en plus dans les abattoirs, des carcasses d'animaux infectés par *M. hyopneumoniae* sont condamnées à cause des lésions. Le diagnostic de la pneumonie enzootique est essentiellement basé sur les techniques immunohistochimiques et sérologiques, mais ces différents tests sont confrontés à des problèmes de sensibilité et de spécificité dus à l'utilisation d'anticorps polyclonaux (Freeman *et al.*, 1984a). Des techniques de biologie moléculaire sont utilisées pour augmenter la spécificité et la sensibilité, notamment des tests de détection de l'agent par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Ces techniques sont basées sur la détection de l'ARN ribosomal 16S ou des gènes codant pour les protéines immunodominantes et spécifiques permettant une détection efficace de l'agent au niveau des spécimens de poumon et de lavages trachéobronchiques, mais les résultats sont plutôt mitigés dans le cas des écouvillons nasaux prélevés chez les animaux vivants (Freeman *et al.*, 1984a; Young et Ross, 1987). Bien que les techniques de PCR permettent la confirmation du diagnostic histopathologique, les épreuves immunohistochimiques sont plus facilement applicables dans les laboratoires régionaux ne possédant pas l'équipement et l'expertise pour l'utilisation de routine de la technique PCR qui demeure en réalité une technique de

diagnostic de deuxième ligne. Néanmoins, les tests immunohistochimiques et de diagnostic moléculaire ne sont réellement efficaces que post-mortem, donc un problème pour leur applicabilité dans le cadre d'épidémiologie-surveillance.

Les techniques de diagnostic basées sur la détection d'anticorps contre les protéines immunodominantes de *M. hyopneumoniae* demeurent indispensables dans l'établissement des programmes d'épidémiologie-surveillance de la maladie. La complexité étiologique de l'infection et l'existence d'une parenté antigénique entre *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* et *M. hyopneumoniae* (Freeman *et al.*, 1984a; Young et Ross, 1987; Scarman *et al.*, 1997), sont des facteurs interférant avec l'efficacité et la spécificité des techniques de dépistage sérologique. Ces épreuves mettent en évidence dans le sérum, sans distinction, des anticorps d'origine infectieuse, maternelle et vaccinale.

Le génome de *M. hyopneumoniae* est de très petite taille (1100 kpb) avec un ADN circulaire double brin contenant un faible pourcentage de G + C (28%) (Maes *et al.*, 1996). Une particularité très importante chez certains gènes de *M. hyopneumoniae* est le fait que le codon TGA est traduit en tryptophane alors que c'est un codon d'arrêt universel (Dybvig et Voelker, 1996). Plusieurs protéines immunodominantes ont été identifiées chez *M. hyopneumoniae*, parmi ces protéines certaines semblent être impliquées dans les premières phases d'infection, d'autres dans la réponse immune contre cet agent (Scarman *et al.*, 1997). Il s'agit notamment de la protéine cytosolique P36 qui est très immunogène et conservée entre les différentes souches (Strasser *et al.*, 1991); les protéines membranaires P46, P65 et P74 qui sont impliquées dans la réponse immune spécifique (Kim *et al.*, 1990; Feld *et al.*, 1992; Futo *et al.*, 1995a); un facteur cytopathique P54 dont le rôle dans la pathogénicité n'est pas encore défini (Geary et Walczak, 1985); différentes adhésines essentiellement la P97, la Mhp1 et la P110 et c'est essentiellement la P97 qui est à ce jour identifiée comme agent d'attachement aux cellules cibles (Zhang *et al.*, 1995; King *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998); une protéine de choc thermique la Hsp 60 (Chou *et al.*, 1997).

L'éradication des mycoplasmoses porcines est stagnante malgré des efforts considérables fournis depuis plusieurs années. En effet, les problèmes du diagnostic sérologique et

l'échec de la prophylaxie curative sont responsables de cette situation. Par conséquent, toutes les imperfections liées au dépistage sérologique conduisent à revoir l'ensemble du problème de diagnostic et de la prévention des mycoplasmoses sans pour autant abandonner l'éradication spécifique de *M. hyopneumoniae*.

Durant cette étude, nous avons remplacé les codons TGA présents dans les gènes P46 (3), P65 (1) et P97 (4) par des codons TGG dans le but de permettre l'expression complète de ces protéines. Cela a été effectué par PCR en utilisant des amorces de chevauchement. Les protéines recombinantes ont été exprimées après clonage des gènes mutés dans un vecteur procaryotique pGEX-4T1 et fusionnées à la glutathione-S-transférase (GST). Nous avons produit les protéines de fusion suivantes : GST-P46 (72 kDa), GST-P65 (91 kDa), P65 tronquée en région N-terminale (GST-P65<sub>C</sub>) de 71 kDa, GST-P97 (123 kDa), P97 tronquée en régions N-terminale et C-terminale et qui sont respectivement GST-P97<sub>C</sub> (88 kDa) et GST-P97<sub>N</sub> (85 kDa). Concernant les protéines P97 tronquées voir Annexe C. Pour la production des anticorps monoclonaux, nous avons obtenu ces anticorps contre les protéines P46 et P65<sub>C</sub>. En effet, le choix de la région C-terminale de P65 a été basé sur l'observation faite par certains auteurs à l'effet que les épitopes majeurs se trouvaient dans cette région de la protéine (Kim *et al.*, 1990). Les anticorps monoclonaux (AcMos) produits contre les protéines P46 et P65<sub>C</sub> à la suite d'immunisation des souris BALB/c, sont spécifiques à *M. hyopneumoniae* et réagissent contre les protéines homologues recombinantes et natives, aussi bien par immunobuvardage de type Western que par ELISA. Les AcMos reconnaissent les trois souches de référence de *M. hyopneumoniae* (ATCC 25934 et 25095; souche J), mais aucune réactivité n'a été observée avec les autres espèces de mycoplasmes porcins incluant *Acholeplasma laidlawii*. Les huit AcMos anti-P46 sont d'isotypes IgG1 et IgG2a, alors que les sept AcMos anti-P65<sub>C</sub> sont tous d'isotype IgG1. Les coupes de poumon de porc infecté congelées ou paraffinées ont été utilisées dans les tests d'immunofluorescence indirecte (IFI) et d'immunoperoxydase (IP) pour la détection de *M. hyopneumoniae*.

Nous avons dans les deux tests utilisés, soit des AcMos individuellement ou un mélange d'AcMos dirigés contre la P46 et un autre avec ceux dirigés contre la P65<sub>C</sub>. La détection

de *M. hyopneumoniae* au niveau de l'épithélium bronchiolaire est très spécifique et ne variait pas en fonction que l'AcMo soit pris seul ou dans un mélange. Contrairement aux problèmes associés aux réactions croisées lors de l'usage des anticorps polyclonaux et des faux positifs qui en découlent (Freeman *et al.*, 1984a; Freeman *et al.*, 1984b; Mori *et al.*, 1987; Stipkovits *et al.*, 1991), les anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines P46 et P65<sub>C</sub> permettent une détection spécifique par immunofluorescence indirecte (IFI) et immunopéroxydase (IP). En effet, nous avons observé une fluorescence spécifique au niveau des cellules entourant l'épithélium bronchiolaire lors de l'examen des coupes congelées. Le test d'immunopéroxydase sur les coupes paraffinées nous permettait de mieux conserver la morphologie du tissu pulmonaire et, par la même occasion, d'observer les dommages tissulaires par la coloration brunâtre spécifique. À notre connaissance, c'est la première fois que des AcMos spécifiques à des protéines immunodominantes de *M. hyopneumoniae* sont utilisés pour le diagnostic immunohistochimique. En outre, l'utilisation de ces AcMos permet d'éliminer les réactions croisées causées par les anticorps polyclonaux dans le diagnostic de cette infection. Les tests d'IFI et d'IP utilisant les AcMos permettent une détection spécifique de *M. hyopneumoniae* à quarante neuf jours post-infection. En effet, cela est une grande amélioration au niveau de la sensibilité et de la spécificité, car il est rapporté dans la littérature (Sorensen *et al.*, 1997) qu'après 28 jours post-infection, la sensibilité et la spécificité de détection par ELISA et immunohistochimie sont normalement insuffisantes.

L'immunisation des souris et des porcelets nous a permis de vérifier l'immunogénicité des protéines recombinantes et leur antigénicité a été confirmée par un test ELISA indirect en utilisant des sérums de porcs convalescents. Dans la littérature, il n'y a pas de consensus sur la cinétique d'apparition des anticorps dirigés contre les protéines immunodominantes majeures de *M. hyopneumoniae*. En effet, selon certains auteurs, les anticorps anti-P65, et plus particulièrement ceux dirigés contre la région C-terminale, apparaissent en premier (Kim *et al.*, 1990). Selon d'autres, les anticorps dans les sérums convalescents reconnaissent en premier la protéine P46 et ce, à quatorze jours post-infection (Mori *et al.*, 1988). Durant notre étude, les sérums de porcs hyperimmunisés et convalescents peuvent détecter, aussi bien en ELISA que par immunobuvardage de type

Western, les protéines recombinantes P46, P65 et P97. Cette détection se fait entre 10 et 14 jours post-infection ou post-immunisation pour la protéine P46. Concernant les protéines P65 et P97, elles sont révélées entre vingt huit et trente cinq jours pour la première, et entre dix huit et vingt-un jours pour la deuxième. Nous avons évalué l'ELISA commercial (Dako) qui est basé sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-P74 avec les sérums de porcs infectés expérimentalement. Les anticorps anti-P74 ne sont détectés qu'entre 21 et 28 jours post-infection. En conclusion, la protéine recombinante P46 serait un bon candidat comme antigène dans un test de diagnostic sérologique comparé à la protéine P74 qui est utilisée commercialement. La détection des anticorps anti-P46 peut se faire avec aussi peu que 20 ng de protéine par puits. L'étude simultanée des sérums de porcs hyperimmunisés et infectés expérimentalement, nous a permis de proposer que la cinétique d'apparition des anticorps contre les protéines immunodominantes serait : anti-P46, anti-P74 et anti-P97 et en dernier anti-P65. En effet, l'hypothèse serait que la P46 aurait plus d'épitopes immunodominants comparée à la P65. En effet, lors d'une étude précédente (Cheikh Saad Bouh *et al.*, 2003) nous avons observé qu'après immunisation de porc avec un mélange des protéines recombinantes P46 et P65, les anticorps anti-P46 apparaissait toujours une à deux semaines avant ceux dirigés contre la P65 par un test ELISA utilisant les protéines homologues comme antigène. Concernant la P97, du fait que c'est une adhésine, elle serait plus impliquée dans l'induction de l'immunité mucosale, et plus particulièrement la production d'IgA. Étant donné que ces tests mesurent plus la réponse systémique par les IgG, cela pourrait expliquer ce retard de détection de la P97 par rapport à la P46. Pour ce qui est de la P74, le test permettant sa détection est basé sur le blocage par un anticorps monoclonal. Comme nous n'avons pas la protéine recombinante P74, la seule comparaison possible se basait sur le test commercial. Dans la littérature, il est rapporté que la P74 ne serait pas très spécifique à *M. hyopneumoniae* (Scarman *et al.*, 1997). Par conséquent, ce manque de spécificité expliquerait ce délai de 10 à 14 jours par rapport à la P46.

Toutes les méthodes de contrôle et de prévention de l'infection causée par *M. hyopneumoniae* sont basées sur une utilisation contrôlée des antibiotiques, couplées à des méthodes d'élevage rigoureuses (MEW, sevrage précoce, all-in all-out, ...) et elles font



face à plusieurs problèmes. Premièrement, elles sont extrêmement onéreuses, les coûts étant estimés à plusieurs centaines de millions de dollars par année aux États-Unis seulement. De plus, de part la résistance du mycoplasme contre plusieurs agents antimicrobiens, l'usage des antibiotiques dans la nourriture d'animaux commerciaux est moins bien perçu, surtout depuis que leurs effets probables sur le transfert de résistance entre bactéries ont été documentés (Witte, 1998; Witte *et al.*, 2000). Donc, pour prévenir et, éventuellement, éradiquer totalement *M. hyopneumoniae*, la vaccination semble être la meilleure alternative.

Les vaccins disponibles commercialement diffèrent dans leur préparation et démontrent des degrés d'efficacité variables chez les porcs. Certains vaccins consistant en des préparations de *M. hyopneumoniae* tués puis incorporés à un adjuvant ont démontré une protection partielle contre le développement de lésions pulmonaires dans des infections expérimentales; cependant, les porcs vaccinés ne semblent pas être protégés contre une infection naturelle (Kristensen *et al.*, 1981; Maes *et al.*, 1996; Mateusen *et al.*, 2002). Des vaccins faits d'extraits de membranes non purifiées de *M. hyopneumoniae* ont démontré une efficacité de protection variable et, dans certains cas, les lésions étaient plus sévères. Il a été démontré que l'administration de préparations membranaires de *M. hyopneumoniae* aux truies gestantes a résulté à un transfert passif d'une immunité protectrice chez les porcelets (Kobisch et Tillon, 1985; Kobisch *et al.*, 1987).

Plus récemment, des vaccins faits de sous-unités de membrane de *M. hyopneumoniae* ont été décrits. En effet, des porcs ont été vaccinés avec un mélange antigénique dénaturé préparé à partir d'extraits de membrane enrichis de protéines dont les poids moléculaires variaient entre 70 et 85 kDa (Djordjevic *et al.*, 1997). Avec ce type de préparation antigénique, les porcs vaccinés avaient une réduction significative de l'ampleur des lésions en comparaison aux porcelets contrôles non immunisés. Il n'y avait toutefois pas de corrélation entre la production d'anticorps de type IgA et IgG dans le sérum et les sécrétions respiratoires après la vaccination et le degré de protection contre la pneumonie enzootique (Thacker *et al.*, 1998).

Dans une autre étude, une protéine de fusion de 15 kDa, consistant en la portion C-terminale (11 kDa) de la sous-unité R2 de la réductase ribonucléotidique de *M. hyopneumoniae* a été administrée oralement aux souris en utilisant comme véhicule *Salmonella typhimurium aroA* (Fagan *et al.*, 1997). Cette immunisation a résulté en une production importante d'IgA dans les poumons, mais pas dans le sérum. Ce genre de vaccin peut stimuler une réponse locale dans les poumons. Cette étude suggère que d'autres vecteurs procaryotes, consistant en des bactéries vivantes atténuées, pourraient fonctionner pour présenter les antigènes spécifiques des mycoplasmes aux cellules du système immunitaire porcin.

Un rapport publié en 1998 a comparé l'efficacité de quatre bactérines commercialement disponibles (Thacker *et al.*, 1998). Tous ces vaccins ont induit une protection contre une infection expérimentale, mais à des niveaux extrêmement variables selon les porcs et le type de vaccin. De plus, il y avait une variation importante dans l'apparition des anticorps locaux et des lymphocytes sensibilisés chez les animaux. La spécificité des anticorps envers les différentes protéines immunodominantes de *M. hyopneumoniae* était aussi très variable, certaines de ces protéines n'étant pas reconnues par les sérums des animaux vaccinés. Donc, ces variations doivent être prises en considération lors de l'établissement d'un programme de vaccination à l'échelle des troupeaux.

Considérant les problèmes qu'ont les vaccins conventionnels à éliminer complètement l'infection causée par *M. hyopneumoniae* et que tous les vaccins expérimentaux semblent donner des résultats mitigés. Nous avons décidé en regard à cette problématique d'étudier le potentiel vaccinal des protéines P46, P65 et P97. Le choix de ces protéines est justifié par le fait que dans la littérature, la P46 et la P65 semblent impliquées dans la réponse immune spécifique et précoce. Quand à la P97, qui est une adhésine, elle initie l'attachement et par conséquent la colonisation. L'immunisation des porcs de 4-5 semaines d'âge avec deux doses de chacune des protéines recombinantes seule ou les trois protéines ensemble à seize jours d'intervalle a induit une bonne réponse immune. L'infection défi avec une souche virulente de *M. hyopneumoniae* a été effectuée trente sept jours après la première immunisation. Toute cette expérience a été faite en ayant comme contrôles : des porcs vaccinés avec un vaccin commercial (Pfizer); des porcs non

immunisés et infectés; des porcs non immunisés et non infectés. En effet, nous avons choisi ce vaccin comme contrôle car parmi les vaccins disponibles c'est celui qui semble avoir le plus de succès dans le champs. À l'autopsie, l'observation macroscopique des poumons de porcs vaccinés a démontré une réduction importante de la surface pulmonaire lésionnelle comparée à celle des porcs non vaccinés et infectés. Les porcs non immunisés mais infectés avaient 35-45 % de leur surface pulmonaire présentant des lésions pathognomoniques de la pneumonie enzootique. Quand aux porcs vaccinés avec les protéines recombinantes, cette surface variait de 1-8 % pour les porcs immunisés avec la protéine P46; 7-10 % pour les porcs vaccinés avec la protéine P65; 10-20 % pour les porcs vaccinés avec la protéine P97; 2-9 % pour les porcs vaccinés avec le mélange des trois protéines. En effet, ces observations suggèrent que l'immunisation avec les protéines recombinantes a réduit d'une manière très importante les lésions causées par *M. hyopneumoniae*.

Certains vaccins utilisant les protéines recombinantes de *M. hyopneumoniae* ont été expérimentés et ils sont basés essentiellement sur le système des protéines de fusion. En effet, la partie carboxy-terminale de la réductase ribonucléotidique fusionnée à la  $\beta$ -galactosidase fut utilisée pour immuniser des porcs (Fagan *et al.*, 1996). Selon les auteurs, ils ont observé une réduction des lésions après l'infection défi mais le problème de l'immunogénicité de la  $\beta$ -galactosidase était persistant du fait que la protéine haptène est de seulement 11 kDa comparée aux 117 kDa de la protéine porteuse qu'est la  $\beta$ -galactosidase. Par ailleurs, dans une autre étude, la protéine Mhp1 fusionnée à la GST a été utilisée chez le porc et selon les auteurs les résultats obtenus après l'infection défi ne seraient pas concluants (King *et al.*, 1997). En effet, le problème de ces deux essais utilisant les protéines recombinantes, est qu'ils n'ont pas ciblé les protéines immunodominantes majeures de *M. hyopneumoniae*.

L'intérêt de ce type de vaccination avec les protéines recombinantes, est qu'il est inoffensif comparé aux risques biologiques encourus lors de l'utilisation comme vecteurs vaccinaux *Salmonella typhimurium* ou *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Fagan *et al.*, 1997;

Shimoji *et al.*, 2003). En conclusion, les protéines recombinantes P46, P65 et P97 seraient des candidats potentiels pour un vaccin sous-unitaire. En effet, ces protéines rec. préviennent les lésions dues à l'infection par *M. hyopneumoniae*. L'immunisation permet de réduire les lésions à aussi peu que 1 % de la surface totale, comparée aux porcs non immunisés qui présentent des lésions sur 35 % de la surface pulmonaire.

Par ailleurs, pour la première fois une étude sur l'activité protéolytique des métalloprotéinases de la matrice (MMPs) dans le surnageant des lavages bronchoalvéolaires des poumons de porcs infectés par *M. hyopneumoniae* a été réalisée. Les MMPs sont physiologiquement impliquées dans le remodelage tissulaire, la régénérescence tissulaire ou dans les cycles menstruels. Dans certaines maladies pulmonaires (l'asthme, la fibrose kystique, l'arthrite rhumatoïde...), on remarque une quantité anormalement élevée de MMPs sécrétées (Atkinson et Senior, 2003). Durant notre étude, tous les porcs qui ont subi une infection défi présentaient une quantité anormalement élevée de MMP-9, à l'exception des porcs immunisés avec le vaccin commercial. Il est rapporté que les leucocytes en particulier les macrophages sont une source de MMPs. En effet, ces protéases permettent l'extravasation et la pénétration des leucocytes dans les tissus. La coloration à l'hématoxyline-phloxine-safran des coupes de poumons des porcs expérimentaux, a montré une grande infiltration de monocytes/macrophages dans la périphérie et la lumière des bronches et bronchioles des porcs ayant subi une infection défi, comme cela a été rapporté dans la littérature (Blanchard *et al.*, 1992b). Cette observation nous fournit l'hypothèse que la sécrétion de MMP-9 proviendrait des monocytes/macrophages pulmonaires. Par ailleurs, il est connu que les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 ou le TNF- $\alpha$  peuvent initier la transcription des gènes codant pour les MMPs. En effet, lors de la pneumonie enzootique à *M. hyopneumoniae*, il a été démontré que les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  étaient essentiellement sécrétées (Ulich *et al.*, 1991; Asai *et al.*, 1994; Nishimoto *et al.*, 1994). Par conséquent, la sécrétion de MMP-9 se ferait à partir des macrophages qui sont stimulés soit par le TNF- $\alpha$  ou l'IL-1.

En conclusion générale, les codons TGA des gènes P46, P65 et P97 ont été mutés en TGG, les protéines recombinantes sont exprimées chez *E. coli*. Nous avons démontré que les protéines recombinantes étaient immunogènes chez les souris et les porcs, par contre seulement les protéines P46 et P97 rec. semblent être très antigéniques. Sur le plan du diagnostic immunohistochimique, les AcMos ont montré une grande spécificité dans la détection sur des coupes de poumons. D'autre part, la cinétique d'apparition des anticorps lors d'une infection par *M. hyopneumoniae* est la suivante, anti-P46, anti-P97 et anti-P74 et enfin anti-P65. L'essai vaccinal a permis de conclure que les protéines recombinantes protégeaient les porcs des lésions dues à *M. hyopneumoniae* et que les cellules dans les infiltrations périfonchiolaires et périvasculaires sont essentiellement formées de monocytes/macrophages. En outre, une stimulation des macrophages par le TNF- $\alpha$  ou l'IL-1, entraînerait une sécrétion de MMP-9 dans les lavages bronchoalvéolaires.

Cette étude a permis de démontrer pour la première fois, que les AcMos spécifiques dirigés contre des protéines recombinantes permettaient un diagnostic immunohistochimique spécifique des infections à *M. hyopneumoniae* et que la cinétique d'apparition des anticorps contre les protéines immunodominantes de *M. hyopneumoniae* semble être différente de celle relatée dans la littérature. D'autre part, lors d'une infection par *M. hyopneumoniae* que les macrophages alvéolaires stimulés par TNF- $\alpha$  ou l'IL-1 sécrétaient la MMP-9 pour permettre leur extravasation et enfin que les protéines recombinantes P46, P65 et P97 sont de bons candidats pour un vaccin sous-unitaire.

## Perspectives

Pour valider le diagnostic par immunohistochimie et l'utilisation de la protéine recombinante P46 dans un ELISA indirect, il va falloir tester un grand nombre d'échantillons provenant du champs. Concernant la protection conférée par les protéines recombinantes : il faudra tester un grand nombre d'animaux pour rendre les résultats statistiquement représentatifs. Dans le but d'optimiser la dose vaccinale, il faudra essayer moins que 100 µg de protéine par dose en ayant un groupe de porcelets vaccinés à moins que 4 semaines d'âge dans le but d'optimiser la dose vaccinale. D'autre part, comme c'est connu que les adjuvants peuvent induire différents types de réponse immune, il faudra essayer d'autres adjuvants d'origine végétale et chimique pour standardiser « l'effet adjuvant ». En vue de mieux comprendre à quel type de réponse immune serait attribuée la réduction des lésions, il est nécessaire de doser et de caractériser les immunoglobulines au niveau local (LBA) et systémique. Considérant le fait qu'il est admis que l'immunité mucoale serait la plus apte à protéger contre les infections respiratoires, il serait important de cloner les gènes mutés dans les vecteurs eucaryotes comme pVAX1 et adénoviral. En effet, il est documenté que les immunisations génétiques semblent conférer aussi bien une réponse cellulaire qu'umorale tout en induisant une protection durable. Pour ce qui est de l'adénovirus, le fait qu'il soit administrable par voie oro-nasale permettrait la stimulation de l'immunité mucoale. Ces trois voies et méthodes d'immunisation permettraient de faire une étude comparative par rapport à la vaccination par voie classique en utilisant les protéines recombinantes.

Pour confirmer la conclusion sur les MMPs, il faudra doser le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 dans des aliquots de lavages bronchoalvéolaires de la même expérience qui sont congelés. En plus il faudra quantifier l'expression des ARNm dans les cellules des lavages bronchoalvéolaires. D'autre part, nous avons produit quatre anticorps monoclonaux dirigés contre la P97 totale et trois contre la P97 tronquée en N-terminale (P97<sub>c</sub>) (Annexe C). La caractérisation de ces AcMos va se poursuivre.

Sur le plan eucaryotique, nous avons cloné le gène P65 dans un vecteur pVAX1, l'expression transitoire a été vérifiée après transfection des cellules 293A (Annexe B). Il

serait intéressant de vérifier le pouvoir immunogène du plasmide recombinant et éventuellement la protection conférée. D'autre part, il faudra sous cloner les gènes mutés de P46 et P97 dans le vecteur pVAX1. Également il serait intéressant de cloner les gènes mutés P46, P65 et P97 dans un vecteur adénoviral en vue d'étudier et comparer la protection conférée suite à une immunisation par adénovirus recombinant.

## REMERCIEMENTS

En mémoire du **Dr. Serge Dea**, de m'avoir accueilli dans son laboratoire et d'avoir dirigé cette thèse. Merci pour tes qualités humaines, ta vivacité intellectuelle et ton soutien sans faille. Tu seras à jamais gravé dans ma mémoire et une fois de plus merci pour tout, repose en paix.

Mes sincères remerciements au **Dr. François Shareck** d'avoir co-dirigé ce travail. Merci pour ton encadrement, tes conseils scientifiques et humains. Ton ouverture d'esprit et ta disponibilité me suivront pendant très longtemps.

Je tiens à remercier, le **Dr. Yves St-Pierre** de m'avoir accueilli durant ma dernière année de doctorat dans son laboratoire. Merci pour ta pertinence scientifique, tes conseils et ta disponibilité sans faille.

Je voudrais également remercier, **Dr Claude Daniel, Dr. Josée Harel et Dr. Marcelo Gottschalk** d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Mes remerciements à madame **Doris Legault** pour son aide technique monumentale, sa sympathie et sa disponibilité.

Mes remerciements également au **Dr. Carl Gagnon** et aux différents étudiants du laboratoire pour leur aide durant les expériences d'infections expérimentales.

Je remercie madame **Louise Wilson** pour son aide technique.

Ma gratitude à la **Fondation Armand-Frappier** pour son soutien financier durant mes études doctorales.

À tous ceux et celles qui m'ont aimé et soutenu, un grand merci.



**BIBLIOGRAPHIE**

Abiven P., B. Blanchard, C. Saillard, M. Kobisch et J. M. Bove (1992). A specific DNA probe for detecting *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected piglets. Mol Cell Probes 6: 423-429.

Ahrens P. et N. F. Friis (1991). Identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* with a DNA probe. Lett Appl Microbiol 12: 249-253.

Akiyama Y. Y. M., Horibe H, Hirai S, Kitamori N, Toguchi H. (1994). pH-independent controlled-release microspheres using polyglycerol esters of fatty acids. J Pharm Sci 83: 1600-1607.

Alexander T. J., K. Thornton, G. Boon, R. J. Lysons et A. F. Gush (1980). Medicated early weaning to obtain pigs free from pathogens endemic in the herd of origin. Vet Rec 106: 114-119.

Aoudjit F., P. O. Esteve, M. Desrosiers, E. F. Potworowski et Y. St-Pierre (1997). Gelatinase B (MMP-9) production and expression by stromal cells in the normal and adult thymus and experimental thymic lymphoma. Int J Cancer 71: 71-78.

Armstrong C. H., A. B. Scheidt, H. L. Thacker, L. J. Runnels et M. J. Freeman (1984). Evaluation of criteria for the postmortem diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine. Can J Comp Med 48: 278-281.

Armstrong C. H., L. Sands-Freeman et M. J. Freeman (1987). Serological, pathological and cultural evaluations of swine infected experimentally with *Mycoplasma flocculare*. Can J Vet Res 51: 185-188.

Artiushin S., L. Stipkovits et F. C. Minion (1993). Development of polymerase chain reaction primers to detect *Mycoplasma hyopneumoniae*. Mol Cell Probes 7: 381-385.

Asai T., M. Okada, M. Ono, T. Irisawa, Y. Mori, Y. Yokomizo et S. Sato (1993). Increased levels of tumor necrosis factor and interleukin 1 in bronchoalveolar lavage fluids from pigs infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet Immunol Immunopathol 38: 253-260.

Asai T., M. Okada, M. Ono, Y. Mori, Y. Yokomizo et S. Sato (1994). Detection of interleukin-6 and prostaglandin E2 in bronchoalveolar lavage fluids of pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet Immunol Immunopathol 44: 97-102.

Atkinson J. J. et R. M. Senior (2003). Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. Am J Respir Cell Mol Biol 28: 12-24.

Attridge S. R., R. Davies et J. T. LaBrooy (1997). Oral delivery of foreign antigens by attenuated *Salmonella*: consequences of prior exposure to the vector strain. Vaccine 15: 155-162.

Aucouturier J., L. Dupuis et V. Ganne (2001). Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. Vaccine 19: 2666-2672.

Audibert F. M. et L. D. Lise (1993). Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. *Immunol Today* 14: 281-284.

Babiuk L. A. (1999). Broadening the approaches to developing more effective vaccines. *Vaccine* 17: 1587-1595.

Baccala R., L. R. Smith, M. Vestberg, P. A. Peterson, B. C. Cole et A. N. Theofilopoulos (1992). *Mycoplasma arthritidis* mitogen. V beta engaged in mice, rats, and humans, and requirement of HLA-DR alpha for presentation. *Arthritis Rheum* 35: 434-442.

Barnett P. V., L. Pullen, L. Williams et T. R. Doel (1996). International bank for foot-and-mouth disease vaccine: assessment of Montanide ISA 25 and ISA 206, two commercially available oil adjuvants. *Vaccine* 14: 1187-1198.

Baseman J. B., M. Lange, N. L. Criscimagna, J. A. Giron et C. A. Thomas (1995). Interplay between mycoplasmas and host target cells. *Microb Pathog* 19: 105-116.

Baseman J. B., S. P. Reddy et S. F. Dallo (1996). Interplay between mycoplasma surface proteins, airway cells, and the protean manifestations of mycoplasma-mediated human infections. *Am J Respir Crit Care Med* 154: S137-144.

Baseman J. B. et J. G. Tully (1997). Mycoplasmas: sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. *Emerg Infect Dis* 3: 21-32.

Baumeister A. K., M. Runge, M. Ganter, A. A. Feenstra, F. Delbeck et H. Kirchhoff (1998). Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchoalveolar lavage fluids of pigs by PCR. J Clin Microbiol 36: 1984-1988.

Bisset L. R. (1992). The *Mycoplasma genitalium* adhesin protein and several human class II MHC proteins exhibit sequence homology: possible ramifications for the development of autoimmunity. Autoimmunity 14: 167-168.

Blanchard A., L. D. Olson et M. F. Barile (1992a). Sexually transmitted mycoplasmas in humans. Mol Cell Biol Hum Dis Ser 1: 55-83.

Blanchard B., M. M. Vena, A. Cavalier, J. Le Lannic, J. Gouranton et M. Kobisch (1992b). Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet Microbiol 30: 329-341.

Blanchard B. et M. Kobisch (1995). [Vaccines against respiratory diseases of swine: example *Mycoplasma hyopneumoniae*]. Vet Res 26: 213-214.

Blanchard B., M. Kobisch, J. M. Bove et C. Saillard (1996). Polymerase chain reaction for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in tracheobronchiolar washings from pigs. Mol Cell Probes 10: 15-22.

Bove J. M. (1993). Molecular features of mollicutes. Clin Infect Dis 17 Suppl 1: S10-31.

Boye M., T. K. Jensen, P. Ahrens, T. Hagedorn-Olsen et N. F. Friis (2001). In situ hybridisation for identification and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyosynoviae* and *Mycoplasma hyorhinis* in formalin-fixed porcine tissue sections. *Apmis* 109: 656-664.

Calsamiglia M., C. Pijoan et A. Trigo (1999). Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. *J Vet Diagn Invest* 11: 246-251.

Caron J. (1999). Valeur diagnostique et variabilité de la protéine cytosolique P36 de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Mémoire de maîtrise.

Caron J., M. Ouardani et S. Dea (2000a). Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes. *J Clin Microbiol* 38: 1390-1396.

Caron J., N. Sawyer, B. Ben Abdel Moumen, K. Cheikh Saad Bouh et S. Dea (2000b). Species-specific monoclonal antibodies to *Escherichia coli*-expressed p36 cytosolic protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Clin Diagn Lab Immunol* 7: 528-535.

Caruso J. P. et R. F. Ross (1990). Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infections on alveolar macrophage functions in swine. *Am J Vet Res* 51: 227-231.

Chastel C. (1995). Links and interactions between mycoplasmas and viruses: past confusions and present realities. *Arch Virol* 140: 811-826.

Cheikh Saad Bouh K., F. Shareck et S. Dea (2003). Monoclonal Antibodies to *Escherichia coli*-Expressed P46 and P65 Membranous Proteins for Specific Immunodetection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lungs of Infected Pigs. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 10: 459-468.

Chen J. R., J. H. Lin, C. N. Weng et S. S. Lai (1998). Identification of a novel adhesin-like glycoprotein from *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol* 62: 97-110.

Chen Y., S. Wang, W. Yang, Y. Chen, H. Lin et D. Shiuan (2003). Expression and immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* heat shock protein antigen P42 by DNA vaccination. *Infect Immun* 71: 1155-1160.

Chou S. Y., T. L. Chung, R. J. Chen, L. H. Ro, P. I. Tsui et D. Shiuan (1997). Molecular cloning and analysis of a HSP (heat shock protein)-like 42 kDa antigen gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Biochem Mol Biol Int* 41: 821-831.

Ciprian A., C. Pijoan, T. Cruz, J. Camacho, J. Tortora, G. Colmenares, R. Lopez-Revilla et M. de la Garza (1988). *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. *Can J Vet Res* 52: 434-438.

CJ. M. et W. P. Switzer (1965). New species, *Mycoplasma hyopneumoniae*, a causative agent of virus pig pneumonia. *Vet. Med.* 60: 841-846.

Cohen M. L. (1992). Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science* 257: 1050-1055.

Cole B. C., E. Ahmed, B. A. Araneo, J. Shelby, C. Kamerath, S. Wei, S. McCall et C. L. Atkin (1993). Immunomodulation in vivo by the *Mycoplasma arthritis* superantigen, MAM. *Clin Infect Dis* 17 Suppl 1: S163-169.

Cole B. C., K. L. Knudtson, A. Oliphant, A. D. Sawitzke, A. Pole, M. Manohar, L. S. Benson, E. Ahmed et C. L. Atkin (1996). The sequence of the *Mycoplasma arthritis* superantigen, MAM: identification of functional domains and comparison with microbial superantigens and plant lectin mitogens. *J Exp Med* 183: 1105-1110.

Cox J. C. et A. R. Coulter (1997). Adjuvants--a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 15: 248-256.

Dallo S. F., A. L. Lazzell, A. Chavoya, S. P. Reddy et J. B. Baseman (1996). Biofunctional domains of the *Mycoplasma pneumoniae* P30 adhesin. *Infect Immun* 64: 2595-2601.

Dalsgaard K., L. Hilgers et G. Trouve (1990). Classical and new approaches to adjuvant use in domestic food animals. *Adv Vet Sci Comp Med* 35: 121-160.

DeBey M. C., C. D. Jacobson et R. F. Ross (1992). Histochemical and morphologic changes of porcine airway epithelial cells in response to infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am J Vet Res* 53: 1705-1710.

Debey M. C., J. A. Roth et R. F. Ross (1993). Enhancement of the increase in intracellular calcium concentration in stimulated neutrophils by *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Res Commun* 17: 249-257.

DeBey M. C. et R. F. Ross (1994). Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infect Immun* 62: 5312-5318.

Diaz E., M. Munthali, V. de Lorenzo et K. N. Timmis (1994). Universal barrier to lateral spread of specific genes among microorganisms. *Mol Microbiol* 13: 855-861.

Djordjevic S. P., G. J. Eamens, L. F. Romalis, P. J. Nicholls, V. Taylor et J. Chin (1997). Serum and mucosal antibody responses and protection in pigs vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae* with vaccines containing a denatured membrane antigen pool and adjuvant. *Aust Vet J* 75: 504-511.

D'Ortho M. P., P. H. Jarreau, C. Delacourt, I. Macquin-Mavier, M. Levame, S. Pezet, A. Harf et C. Lafuma (1994). Matrix metalloproteinase and elastase activities in LPS-induced acute lung injury in guinea pigs. *Am J Physiol* 266: L209-216.

Drlica K. et X. Zhao (1997). DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 377-392.

Dybvig K. (1990). Mycoplasmal genetics. *Annu Rev Microbiol* 44: 81-104.



Dybvig K. et L. L. Voelker (1996). Molecular biology of mycoplasmas. *Annu Rev Microbiol* 50: 25-57.

Ellis R. W. (1999). New technologies for making vaccines. *Vaccine* 17: 1596-1604.

Fagan P. K., S. P. Djordjevic, G. J. Eamens, J. Chin et M. J. Walker (1996). Molecular characterization of a ribonucleotide reductase (*nrdF*) gene fragment of *Mycoplasma hyopneumoniae* and assessment of the recombinant product as an experimental vaccine for enzootic pneumonia. *Infect Immun* 64: 1060-1064.

Fagan P. K., S. P. Djordjevic, J. Chin, G. J. Eamens et M. J. Walker (1997). Oral immunization of mice with attenuated *Salmonella typhimurium* aroA expressing a recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen (*NrdF*). *Infect Immun* 65: 2502-2507.

Fagan P. K., M. J. Walker, J. Chin, G. J. Eamens et S. P. Djordjevic (2001). Oral immunization of swine with attenuated *Salmonella typhimurium* aroA SL3261 expressing a recombinant antigen of *Mycoplasma hyopneumoniae* (*NrdF*) primes the immune system for a *NrdF* specific secretory IgA response in the lungs. *Microb Pathog* 30: 101-110.

Falk K., S. Hoie et B. M. Lium (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.

Faulkner C. B., J. W. Simecka, M. K. Davidson, J. K. Davis, T. R. Schoeb, J. R. Lindsey et M. P. Everson (1995). Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, interleukin 6, and gamma interferon in C3H/HeN and C57BL/6N mice in acute *Mycoplasma pulmonis* disease. *Infect Immun* 63: 4084-4090.

Feld N. C., P. Qvist, P. Ahrens, N. F. Friis et A. Meyling (1992). A monoclonal blocking ELISA detecting serum antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol* 30: 35-46.

Flynn J. L., W. R. Weiss, K. A. Norris, H. S. Seifert, S. Kumar et M. So (1990). Generation of a cytotoxic T-lymphocyte response using a Salmonella antigen-delivery system. *Mol Microbiol* 4: 2111-2118.

Freeman M. J., C. H. Armstrong, L. L. Sands-Freeman et M. Lopez-Osuna (1984a). Serological cross-reactivity of porcine reference antisera to *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. flocculare*, *M. hyorhinis* and *M. hyosynoviae* indicated by the enzyme-linked immunosorbent assay, complement fixation and indirect hemagglutination tests. *Can J Comp Med* 48: 202-207.

Freeman M. J., M. Lopez-Osuna, C. H. Armstrong et L. Sands-Freeman (1984b). Evaluation of the indirect hemagglutination assay as a practical serodiagnostic test for mycoplasmal pneumonia of swine. *Vet Microbiol* 9: 259-270.

Freundt E. A. et G. Winkelmann (1984). Activity of herbicolin A against *Mycoplasma*, *Acholeplasma*, *Ureaplasma*, and *Spiroplasma* species. *Antimicrob Agents Chemother* 26: 112-114.

Frey J., A. Haldimann, M. Kobisch et J. Nicolet (1994). Immune response against the L-lactate dehydrogenase of *Mycoplasma hyopneumoniae* in enzootic pneumonia of swine. *Microb Pathog* 17: 313-322.

Friis N. F. (1973). The pathogenicity of *Mycoplasma flocculare*. *Acta Vet Scand* 14: 344-346.

Friis N. F., P. Ahrens et H. Larsen (1991). *Mycoplasma hyosynoviae* isolation from the upper respiratory tract and tonsils of pigs. *Acta Vet Scand* 32: 425-429.

Futo S., Y. Seto, S. Mitsuse, Y. Mori, T. Suzuki et K. Kawai (1995a). Molecular cloning of a 46-kilodalton surface antigen (P46) gene from *Mycoplasma hyopneumoniae*: direct evidence of CGG codon usage for arginine. *J Bacteriol* 177: 1915-1917.

Futo S., Y. Seto, M. Okada, S. Sato, T. Suzuki, K. Kawai, Y. Imada et Y. Mori (1995b). Recombinant 46-kilodalton surface antigen (P46) of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *Escherichia coli* can be used for early specific diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 33: 680-683.

Gallichan W. S., R. N. Woolstencroft, T. Guarasci, M. J. McCluskie, H. L. Davis et K. L. Rosenthal (2001). Intranasal immunization with CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant dramatically increases IgA and protection against herpes simplex virus-2 in the genital tract. *J Immunol* 166: 3451-3457.

Geary S. J. et E. M. Walczak (1985). Isolation of a cytopathic factor from *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infect Immun* 48: 576-578.

Gentschev I., G. Dietrich, S. Spreng, A. Kolb-Maurer, V. Brinkmann, L. Grode, J. Hess, S. H. Kaufmann et W. Goebel (2001). Recombinant attenuated bacteria for the delivery of subunit vaccines. *Vaccine* 19: 2621-2628.

Gilkeson G. S., A. M. Pippen et D. S. Pisetsky (1995). Induction of cross-reactive anti-dsDNA antibodies in preautoimmune NZB/NZW mice by immunization with bacterial DNA. *J Clin Invest* 95: 1398-1402.

Gois M., F. Sisak, F. Kuksa et M. Sovadina (1975). Incidence and evaluation of the microbial flora in the lungs of pigs with enzootic pneumonia. *Zentralbl Veterinarmed B* 22: 205-219.

Goodwin R. F., P. AP. et W. P. (1965). Production of enzootic pneumonia in pigs with a mycoplasma. *Vet. Rec.* 77: 1247-1249.

Grau O., B. Slizewicz, P. Tuppin, V. Launay, E. Bourgeois, N. Sagot, M. Moynier, A. Lafeuillade, H. Bachelez, J. P. Clauvel et et al. (1995). Association of *Mycoplasma penetrans* with human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 172: 672-681.

Grdic D., R. Smith, A. Donachie, M. Kjerrulf, E. Hornquist, A. Mowat et N. Lycke (1999). The mucosal adjuvant effects of cholera toxin and immune-stimulating complexes differ in their requirement for IL-12, indicating different pathways of action. *Eur J Immunol* 29: 1774-1784.

Greenberger P. A. (1997). Immunologic aspects of lung diseases and cystic fibrosis. *Jama* 278: 1924-1930.

Haldimann A., J. Nicolet et J. Frey (1993). DNA sequence determination and biochemical analysis of the immunogenic protein P36, the lactate dehydrogenase (LDH) of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Gen Microbiol* 139: 317-323.

Hannan P. C., P. J. O'Hanlon et N. H. Rogers (1989). In vitro evaluation of various quinolone antibacterial agents against veterinary mycoplasmas and porcine respiratory bacterial pathogens. *Res Vet Sci* 46: 202-211.

Hannan P. C., Ripley, P. H. (1996). in vitro development of resistance in *Mycoplasma hyopneumoniae* to SDS PMd 296, tiamulin and two other antimicrobial agents. Proc. 14<sup>th</sup> international Pig Veterinary Society Congress, Bologna, 225.

Harasawa R., K. Koshimizu, O. Takeda, T. Uemori, K. Asada et I. Kato (1991). Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA by the polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 5: 103-109.

Hooper D. C. (2000). Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* 31 Suppl 2: S24-28.

Howard C. J. (1980). Variation in the susceptibility of bovine mycoplasmas to killing by the alternative complement pathway in bovine serum. *Immunology* 41: 561-568.

Hsu T., S. Artiushin et F. C. Minion (1997). Cloning and functional analysis of the P97 swine cilium adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Bacteriol* 179: 1317-1323.

Hsu T. et F. C. Minion (1998). Molecular analysis of the P97 cilium adhesin operon of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Gene* 214: 13-23.

Hughes H. P. et L. A. Babiuk (1992). The adjuvant potential of cytokines. *Biotechnol Ther* 3: 101-117.

Jacobs E., T. Watter, H. E. Schaefer et W. Bredt (1991). Comparison of host responses after intranasal infection of guinea-pigs with *Mycoplasma genitalium* or with *Mycoplasma pneumoniae*. *Microb Pathog* 10: 221-229.

Jensen T. K., B. Aalboek, J. Buttenschon, N. F. Friis, J. Kyrval et L. Ronsholt (1995). *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyosynoviae* infection in cases of fibrinous pericarditis in slaughter pigs. *Acta Vet Scand* 36: 575-577.

Jones T. C. et L. Hang (1977). Attachment and ingestion of mycoplasmas by mouse macrophages. I. Kinetics of the interaction and effects on phagocyte glucose metabolism. *Am J Pathol* 87: ENG.

Kaufmann S. H. (1993). Immunity to intracellular bacteria. *Annu Rev Immunol* 11: 129-163.

Kim M. F., M. B. Heidari, S. J. Stull, M. A. McIntosh et K. S. Wise (1990). Identification and mapping of an immunogenic region of *Mycoplasma hyopneumoniae* p65 surface lipoprotein expressed in *Escherichia coli* from a cloned genomic fragment. *Infect Immun* 58: 2637-2643.

King K. W., D. H. Faulds, E. L. Rosey et R. J. Yancey, Jr. (1997). Characterization of the gene encoding Mhp1 from *Mycoplasma hyopneumoniae* and examination of Mhp1's vaccine potential. *Vaccine* 15: 25-35.

Kirchhoff H. et R. Rosengarten (1984a). Isolation of a motile mycoplasma from fish. *J Gen Microbiol* 130 ( Pt 9): 2439-2445.

Klee S. R., B. D. Tzschaschel, I. Falt, A. Karnell, A. A. Lindberg, K. N. Timmis et C. A. Guzman (1997). Construction and characterization of a live attenuated vaccine candidate against *Shigella dysenteriae* type 1. *Infect Immun* 65: 2112-2118.

Klinkert M. Q., R. Herrmann et H. Schaller (1985). Surface proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* identified from an *Escherichia coli* expression plasmid library. *Infect Immun* 49: 329-335.

Kobisch M. et J. P. Tillon (1985). [Respiratory diseases of swine: some epidemiologic aspects]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 8: 65-71.

Kobisch M., L. Quillien, J. P. Tillon et H. Wroblewski (1987). The *Mycoplasma hyopneumoniae* plasma membrane as a vaccine against porcine enzootic pneumonia. *Ann Inst Pasteur Immunol* 138: 693-705.

Kobisch M. et N. F. Friis (1996). Swine mycoplasmoses. *Rev Sci Tech* 15: 1569-1605.

Kristensen B., P. Paroz, J. Nicolet, M. Wanner et A. L. de Weck (1981). Cell-mediated and humoral immune response in swine after vaccination and natural infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am J Vet Res* 42: 784-788.

Kurstak E. (1999). Towards new vaccines and modern vaccinology: introductory remarks. *Vaccine* 17: 1583-1586.

Kyriakis S. C., C. Alexopoulos, J. Vlemmas, K. Sarris, S. Lekkas, M. Koutsoviti-Papadopoulou et K. Saoulidis (2001). Field study on the efficacy of two different vaccination schedules with HYORESP in a *Mycoplasma hyopneumoniae*-infected commercial pig unit. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 48: 675-684.

Lalancette M., F. Aoudjit, E. F. Potworowski et Y. St-Pierre (2000). Resistance of ICAM-1-deficient mice to metastasis overcome by increased aggressiveness of lymphoma cells. *Blood* 95: 314-319.

Latz E., A. Schoenemeyer, A. Visintin, K. A. Fitzgerald, B. G. Monks, C. F. Knetter, E. Lien, N. J. Nilsen, T. Espevik et D. T. Golenbock (2004). TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 5: 190-198.



Le Potier M. F., P. Abiven, M. Kobisch, D. Crevat et P. Desmettre (1994). A blocking ELISA using a monoclonal antibody for the serological detection of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Res Vet Sci 56: 338-345.

Lewis P. J., G. J. Cox, S. van Drunen Littel-van den Hurk et L. A. Babiuk (1997). Polynucleotide vaccines in animals: enhancing and modulating responses. Vaccine 15: 861-864.

Liao C. W., I. C. Cheng, K. S. Yeh, F. Y. Lin et C. N. Weng (2001). Release characteristics of microspheres prepared by co-spray drying *Actinobacillus pleuropneumoniae* antigens and aqueous ethyl-cellulose dispersion. J Microencapsul 18: 285-297.

Lipford G. B., T. Sparwasser, M. Bauer, S. Zimmermann, E. S. Koch, K. Heeg et H. Wagner (1997). Immunostimulatory DNA: sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines. Eur J Immunol 27: 3420-3426.

Lo S. C., M. M. Hayes, J. G. Tully, R. Y. Wang, H. Kotani, P. F. Pierce, D. L. Rose et J. W. Shih (1992). *Mycoplasma penetrans* sp. nov., from the urogenital tract of patients with AIDS. Int J Syst Bacteriol 42: 357-364.

Maes D., M. Verdonck, H. Deluyker et A. de Kruif (1996). Enzootic pneumonia in pigs. Vet Q 18: 104-109.

Malech H. L. et J. I. Gallin (1987). Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. N Engl J Med 317: 687-694.

Maniloff J. (1988). Mycoplasma viruses. Crit Rev Microbiol 15: 339-389.

Marshall A. J., R. J. Miles et L. Richards (1995). The phagocytosis of mycoplasmas. J Med Microbiol 43: 239-250.

Mateusen B., D. Maes, M. Van Goubergen, M. Verdonck et A. de Kruif (2002). Effectiveness of treatment with lincomycin hydrochloride and/or vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* for controlling chronic respiratory disease in a herd of pigs. Vet Rec 151: 135-140.

Mattsson J. G., K. Bergstrom, P. Wallgren et K. E. Johansson (1995). Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16S rRNA gene. J Clin Microbiol 33: 893-897.

McCluskie M. J. et H. L. Davis (1999). CpG DNA as mucosal adjuvant. Vaccine 18: 231-237.

McCluskie M. J., R. D. Weeratna, A. M. Krieg et H. L. Davis (2000a). CpG DNA is an effective oral adjuvant to protein antigens in mice. Vaccine 19: 950-957.

McCluskie M. J. et H. L. Davis (2000b). Oral, intrarectal and intranasal immunizations using CpG and non-CpG oligodeoxynucleotides as adjuvants. Vaccine 19: 413-422.

McCluskie M. J., R. D. Weeratna et H. L. Davis (2001). The potential of oligodeoxynucleotides as mucosal and parenteral adjuvants. *Vaccine* 19: 2657-2660.

Mebus C. A. et N. R. Underdahl (1977). Scanning electron microscopy of trachea and bronchi from gnotobiotic pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am J Vet Res* 38: 1249-1254.

Medina E., P. Paglia, T. Nikolaus, A. Muller, M. Hensel et C. A. Guzman (1999). Pathogenicity island 2 mutants of *Salmonella typhimurium* are efficient carriers for heterologous antigens and enable modulation of immune responses. *Infect Immun* 67: 1093-1099.

Medina E. et C. A. Guzman (2000a). Modulation of immune responses following antigen administration by mucosal route. *FEMS Immunol Med Microbiol* 27: 305-311.

Medina E., P. Paglia, M. Rohde, M. P. Colombo et C. A. Guzman (2000b). Modulation of host immune responses stimulated by *Salmonella* vaccine carrier strains by using different promoters to drive the expression of the recombinant antigen. *Eur J Immunol* 30: 768-777.

Mori Y., T. Hamaoka et S. Sato (1987). Use of monoclonal antibody in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Isr J Med Sci* 23: 657-662.

Mori Y., T. Hamaoka, S. Sato et S. Takeuchi (1988). Immunoblotting analysis of antibody response in swine experimentally inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Immunol Immunopathol* 19: 239-250.

Murphy D., W. G. Van Alstine, L. K. Clark, S. Albrechts et K. Knox (1993). Aerosol vaccination of pigs against *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Am J Vet Res* 54: 1874-1880.

Nakano H., T. Yamazaki, M. Ikeda, H. Masai, S. Miyatake et T. Saito (1994). Purification of glutathione S-transferase fusion proteins as a non-degraded form by using a protease-negative *E. coli* strain, AD202. *Nucleic Acids Res* 22: 543-544.

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

Nicolet J., P. Paroz et S. Bruggmann (1980). Tween 20 soluble proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* as antigen for an enzyme linked immunosorbent assay. *Res Vet Sci* 29: 305-309.

Nicolet J. (1996). Animal mycoplasmoses: a general introduction. *Rev Sci Tech* 15: 1233-1240.

Nishimoto M., A. A., K. K., T. CC., O. K. et A. S. (1994). Gene expression of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in the lungs of *Mycoplasma pulmonis*-infected mice. *Microbiol Immunol* 38: 345-352.

Noel P., E. Tabone, J. P. Michot, M. Groleas, M. Hesch et A. M. Rifki (1989). [Detection of micrometastases in excised regional lymph nodes in cancer of the breast. Systematic use of KL1 anticytokeratin monoclonal antibodies in a prospective series of 120 T2 N-patients]. *Ann Pathol* 9: 265-270.

Ohno I., H. Ohtani, Y. Nitta, J. Suzuki, H. Hoshi, M. Honma, S. Isoyama, Y. Tanno, G. Tamura, K. Yamauchi, H. Nagura et K. Shirato (1997). Eosinophils as a source of matrix metalloproteinase-9 in asthmatic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16: 212-219.

Okada M., T. Sakano, K. Senna, T. Maruyama, J. Murofushi, H. Okonogi et S. Sato (1999). Evaluation of *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivated vaccine in pigs under field conditions. *J Vet Med Sci* 61: 1131-1135.

Okada M., T. Asai, M. Ono, T. Sakano et S. Sato (2000). Cytological and immunological changes in bronchoalveolar lavage fluid and histological observation of lung lesions in pigs immunized with *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivated vaccine prepared from broth culture supernate. *Vaccine* 18: 2825-2831.

Ouardani M., L. Wilson, R. Jette, C. Montpetit et S. Dea (1999). Multiplex PCR for detection and typing of porcine circoviruses. *J Clin Microbiol* 37: 3917-3924.

Park S. C., S. Yibchok-Anun, H. Cheng, T. F. Young, E. L. Thacker, F. C. Minion, R. F. Ross et W. H. Hsu (2002). *Mycoplasma hyopneumoniae* increases intracellular calcium release in porcine ciliated tracheal cells. *Infect Immun* 70: 2502-2506.

Pietsch K., S. Ehlers et E. Jacobs (1994). Cytokine gene expression in the lungs of BALB/c mice during primary and secondary intranasal infection with *Mycoplasma pneumoniae*. *Microbiology* 140 ( Pt 8): 2043-2048.

Piffer I. A. et R. F. Ross (1984). Effect of age on susceptibility of pigs to *Mycoplasma hyopneumoniae* pneumonia. *Am J Vet Res* 45: 478-481.

Piffer I. A., T. F. Young, A. Petenate et R. F. Ross (1984). Comparison of complement fixation test and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of early infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am J Vet Res* 45: 1122-1126.

Pijoan C. (1975). The effects of *Mycoplasma hyorhinis* and of *Mycoplasma hyopneumoniae* on pig kidney primary tissue culture. *Br Vet J* 131: 586-594.

Pointon A. M., D. Byrt et P. Heap (1985). Effect of enzootic pneumonia of pigs on growth performance. *Aust Vet J* 62: 13-18.

Rawadi G. et S. Roman-Roman (1996). *Mycoplasma* membrane lipoproteins induced proinflammatory cytokines by a mechanism distinct from that of lipopolysaccharide. *Infect Immun* 64: 637-643.

Razin S., D. Amikam et G. Glaser (1984a). *Mycoplasma* ribosomal RNA genes and their use as probes for detection and identification of Mollicutes. *Isr J Med Sci* 20: 758-761.

Razin S., M. Gross, M. Wormser, Y. Pollack et G. Glaser (1984b). Detection of mycoplasmas infecting cell cultures by DNA hybridization. *In Vitro* 20: 404-408.

Razin S. (1985). Molecular biology and genetics of mycoplasmas (Mollicutes). *Microbiol Rev* 49: 419-455.

Razin S. et E. Jacobs (1992). Mycoplasma adhesion. *J Gen Microbiol* 138 ( Pt 3): 407-422.

Roberts D. H. (1974). Experimental infection of pigs with *Mycoplasma hyopneumoniae* (*suipneumoniae*). *Br Vet J* 130: 68-74.

Root-Bernstein R. S. et S. H. Hobbs (1991). Homologies between mycoplasma adhesion peptide, CD4 and class II MHC proteins: a possible mechanism for HIV-mycoplasma synergism in AIDS. *Res Immunol* 142: 519-523.

Ross R. F. (1973). Predisposing factors in *Mycoplasma hyosynoviae* arthritis in swine. *J Infect Dis* 127: Suppl:S84-86.

Ross R. F. et M. L. Spear (1973). Role of the sow as a reservoir of infection for *Mycoplasma hyosynoviae*. *Am J Vet Res* 34: 373-378.

Ross R. F. (1992). Mycoplasmal diseases. In: Lemann AD, Straw BE, Glock RD, Mengeling WL, Penny RHC, Scholl E, editors. *Disease of Swine* 7th ed. Ames, IA: Iowa State University Press: 537-551.

Rykova E. Y., P. P. Laktionov et V. V. Vlassov (1999). Activation of spleen lymphocytes by plasmid DNA. *Vaccine* 17: 1193-1200.

Sanger F., S. Nicklen et A. R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467.

Scarman A. L., J. C. Chin, G. J. Eamens, S. F. Delaney et S. P. Djordjevic (1997). Identification of novel species-specific antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* by preparative SDS-PAGE ELISA profiling. *Microbiology* 143: 663-673.

Scherm B., G. F. Gerlach et M. Runge (2002). Analysis of heat shock protein 60 encoding genes of mycoplasmas and investigations concerning their role in immunity and infection. *Vet Microbiol* 89: 141-150.

Shapiro S. D. (1994). Elastolytic metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Potential roles in destructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 150: S160-164.

Sheldrake R. F. (1990). IgA immune responses in the respiratory tract of pigs. *Res Vet Sci* 49: 98-103.

Sheldrake R. F., L. F. Romalis et M. M. Saunders (1993). Serum and mucosal antibody responses against *Mycoplasma hyopneumoniae* following intraperitoneal vaccination and challenge of pigs with *M. hyopneumoniae*. *Res Vet Sci* 55: 371-376.



Shimoji Y., E. Oishi, T. Kitajima, Y. Muneta, S. Shimizu et Y. Mori (2002). *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-1 as a live vaccine vehicle for heterologous protein expression and intranasal immunization of pigs. *Infect Immun* 70: 226-232.

Shimoji Y., E. Oishi, Y. Muneta, H. Nosaka et Y. Mori (2003). Vaccine efficacy of the attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 expressing a recombinant protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin against mycoplasmal pneumonia of swine. *Vaccine* 21: 532-537.

Shirai M., C. D. Pendleton, J. Ahlers, T. Takeshita, M. Newman et J. A. Berzofsky (1994). Helper-cytotoxic T lymphocyte (CTL) determinant linkage required for priming of anti-HIV CD8+ CTL in vivo with peptide vaccine constructs. *J Immunol* 152: 549-556.

Sitjar M., E. P. Noyes, X. Simon et C. Pijoan (1996). Relationships among seroconversion to *Mycoplasma hyopneumoniae*, lung lesions, and production parameters in pigs. *Swine Health and Production* 4: 273-277.

Smith D. B. et K. S. Johnson (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67: 31-40.

Sorensen V., K. Barfod, N. C. Feld et L. Vraa-Andersen (1993). Application of enzyme-linked immunosorbent assay for the surveillance of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. *Rev Sci Tech* 12: 593-604.

Sorensen V., P. Ahrens, K. Barfod, A. A. Feenstra, N. C. Feld, N. F. Friis, V. Bille-Hansen, N. E. Jensen et M. W. Pedersen (1997). *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. *Vet Microbiol* 54: 23-34.

Sparwasser T., T. Miethke, G. Lipford, A. Erdmann, H. Hacker, K. Heeg et H. Wagner (1997). Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor-alpha-mediated shock. *Eur J Immunol* 27: 1671-1679.

Stabel T. J., J. E. Mayfield, D. C. Morfitt et M. J. Wannemuehler (1993). Oral immunization of mice and swine with an attenuated *Salmonella choleraesuis* [delta cya-12 delta(crp-cdt)19] mutant containing a recombinant plasmid. *Infect Immun* 61: 610-618.

Stemke G. W., R. Phan, T. F. Young et R. F. Ross (1994). Differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M flocculare*, and *M hyorhinae* on the basis of amplification of a 16S rRNA gene sequence. *Am J Vet Res* 55: 81-84.

Stipkovits L., J. Nicolet, A. Haldimann et J. Frey (1991). Use of antibodies against the P36 protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* for the identification of *M. hyopneumoniae* strains. *Mol Cell Probes* 5: 451-457.

Strasser M., J. Frey, G. Bestetti, M. Kobisch et J. Nicolet (1991). Cloning and expression of a species-specific early immunogenic 36- kilodalton protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 59: 1217-1222.

Su C. J., V. V. Tryon et J. B. Baseman (1987). Cloning and sequence analysis of cytoadhesin P1 gene from *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect Immun* 55: 3023-3029.

Suter M., M. Kobisch et J. Nicolet (1985). Stimulation of immunoglobulin-containing cells and isotype-specific antibody response in experimental *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in specific-pathogen-free pigs. *Infect Immun* 49: 615-620.

Suzuki T., S. Ichihara et S. Mizushima (1988). Purification and characterization of a signal peptide, a product of protein secretion across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *J Biochem (Tokyo)* 103: 470-473.

Tajima M. et T. Yagihashi (1982). Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* with the porcine respiratory epithelium as observed by electron microscopy. *Infect Immun* 37: 1162-1169.

Takahashi K., C. Kuniyasu, Y. Yoshida et E. Momotani (1978). Sensitivity in vitro to macrolide antibiotics and tetracyclines of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolated from pneumonic porcine lungs. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)* 18: 41-42.

Taschke C. et R. Herrmann (1986). Analysis of transcription and processing signals of the 16S-23S rRNA operon of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Mol Gen Genet* 205: 434-441.

Taylor G. et C. J. Howard (1980). Class-specific antibody responses to *Mycoplasma pulmonis* in sera and lungs of infected and vaccinated mice. *Infect Immun* 29: 1160-1168.

Teh H. S., M. Ho et L. D. Williams (1988). Suppression of cytotoxic responses by a supernatant factor derived from *Mycoplasma hyorhinis*-infected mammalian cell lines. *Infect Immun* 56: 197-203.

Tetley T. D. (1993). New perspectives on basic mechanisms in lung disease. 6. Proteinase imbalance: its role in lung disease. *Thorax* 48: 560-565.

Thacker E. L., B. J. Thacker, T. B. Boettcher et H. Jayappa (1998). Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation, and protection induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. *Swine Health and Production* 6: 107-112.

Thacker E. L., P. G. Halbur, R. F. Ross, R. Thanawongnuwech et B. J. Thacker (1999). *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. *J Clin Microbiol* 37: 620-627.

Thacker E. L., B. J. Thacker, M. Kuhn, P. A. Hawkins et W. R. Waters (2000a). Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. *Am J Vet Res* 61: 1384-1389.

Thacker E. L. (2001). Immunology of the porcine respiratory disease complex. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 17: 551-565.

Thacker E. L., B. J. Thacker et B. H. Janke (2001). Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine influenza virus. *J Clin Microbiol* 39: 2525-2530.

Theiss P., A. Karpas et K. S. Wise (1996). Antigenic topology of the P29 surface lipoprotein of *Mycoplasma fermentans*: differential display of epitopes results in high-frequency phase variation. *Infect Immun* 64: 1800-1809.

Thomas E., E. Grandemange, P. Pommier, S. Wessel-Robert et J. L. Davot (2000). Field evaluation of efficacy and tolerance of a 2% marbofloxacin injectable solution for the treatment of respiratory disease in fattening pigs. *Vet Q* 22: 131-135.

Tully J. G. (1993). Current status of the mollicute flora of humans. *Clin Infect Dis* 17 Suppl 1: S2-9.

Ulich T. R., S. M. Yin, K. Z. Guo, J. del Castillo, S. P. Eisenberg et R. C. Thompson (1991). The intratracheal administration of endotoxin and cytokines. III. The interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist inhibits endotoxin- and IL-1-induced acute inflammation. *Am J Pathol* 138: 521-524.

Van Alstine W. G., G. W. Stevenson et C. L. Kanitz (1996). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus does not exacerbate *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in young pigs. *Vet Microbiol* 49: 297-303.

VanCott J. L., S. N. Chatfield, M. Roberts, D. M. Hone, E. L. Hohmann, D. W. Pascual, M. Yamamoto, H. Kiyono et J. R. McGhee (1998). Regulation of host immune responses by modification of *Salmonella* virulence genes. *Nat Med* 4: 1247-1252.

Vogel F. R. (1995). Immunologic adjuvants for modern vaccine formulations. *Ann N Y Acad Sci* 754: 153-160.

Vollmer J., R. D. Weeratna, M. Jurk, U. Samulowitz, M. J. McCluskie, P. Payette, H. L. Davis, C. Schetter et A. M. Krieg (2004). Oligodeoxynucleotides lacking CpG dinucleotides mediate Toll-like receptor 9 dependent T helper type 2 biased immune stimulation. *Immunology* 113: 212-223.

Wang R. Y., J. W. Shih, S. H. Weiss, T. Grandinetti, P. F. Pierce, M. Lange, H. J. Alter, D. J. Wear, C. L. Davies, R. K. Mayur et et al. (1993). *Mycoplasma penetrans* infection in male homosexuals with AIDS: high seroprevalence and association with Kaposi's sarcoma. *Clin Infect Dis* 17: 724-729.

Weng C. N., Y. L. Tzan, S. D. Liu, S. Y. Lin et C. J. Lee (1992). Protective effects of an oral microencapsulated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine against experimental infection in pigs. *Res Vet Sci* 53: 42-46.

Whitton J. L., N. Sheng, M. B. Oldstone et T. A. McKee (1993). A "string-of-beads" vaccine, comprising linked minigenes, confers protection from lethal-dose virus challenge. *J Virol* 67: 348-352.

Williams P. P. (1978). In vitro susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* to fifty-one antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 14: 210-213.

Williams P. P. et J. E. Gallagher (1981). Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *M. hyorhinis* on ependymal cells of the porcine lateral ventricles as observed by scanning and transmission electron microscopy. *Scan Electron Microsc* 4: 133-140.

Wilton J. L., A. L. Scarman, M. J. Walker et S. P. Djordjevic (1998). Reiterated repeat region variability in the ciliary adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Microbiology* 144: 1931-1943.

Wise K. S. et M. F. Kim (1987). Major membrane surface proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* selectively modified by covalently bound lipid. *J Bacteriol* 169: 5546-5555.

Witte W. (1998). Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science* 279: 996-997.

Witte W., H. Tschape, I. Klare et G. Werner (2000). Antibiotics in animal feed. *Acta Vet Scand Suppl* 93: 37-44; discussion 44-35.

Wolff J. A., R. W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani et P. L. Felgner (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247: 1465-1468.

Wongnarkpet S., R. S. Morris et D. U. Pfeiffer (1999). Field efficacy of a combined use of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* vaccines in growing pigs. *Prev Vet Med* 39: 13-24.

Yagihashi T., T. Nunoya, T. Mitui et M. Tajima (1984). Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection on the development of *Haemophilus pleuropneumoniae* pneumonia in pigs. *Nippon Juigaku Zasshi* 46: 705-713.

Yagihashi T., S. Kazama et M. Tajima (1993). Seroepidemiology of mycoplasmal pneumonia of swine in Japan as surveyed by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Microbiol* 34: 155-166.

Yao P. M., B. Maitre, C. Delacourt, J. M. Buhler, A. Harf et C. Lafuma (1997). Divergent regulation of 92-kDa gelatinase and TIMP-1 by HBECs in response to IL-1beta and TNF-alpha. *Am J Physiol* 273: L866-874.

Young T. F. et R. F. Ross (1987). Assessment of antibody response of swine infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* by immunoblotting. *Am J Vet Res* 48: 651-656.

Young T. F., B. Z. Erickson, R. F. Ross et Y. Wannemuehler (1989). Hemagglutination and hemagglutination inhibition of turkey red blood cells with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am J Vet Res* 50: 1052-1055.

Zhang Q., T. F. Young et R. F. Ross (1994a). Glycolipid receptors for attachment of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine respiratory ciliated cells. *Infect Immun* 62: 4367-4373.

Zhang Q., T. F. Young et R. F. Ross (1994b). Microtiter plate adherence assay and receptor analogs for *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infect Immun* 62: 1616-1622.

Zhang Q., T. F. Young et R. F. Ross (1995). Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. *Infect Immun* 63: 1013-1019.



Zielinski G. C. et R. F. Ross (1993). Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine ciliated respiratory tract cells. Am J Vet Res 54: 1262-1269.

Zurita-Salinas C. S., A. Palacios-Boix, A. Yanez, F. Gonzalez et J. Alcocer-Varela (1996). Contamination with *Mycoplasma* spp. induces interleukin-13 expression by human skin fibroblasts in culture. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 15: 123-128.

**ANNEXES**

**Annexe A**

**LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS**

## Publications

J. Caron, , N. Sawyer, B. Ben Abdel Moumen, **K. Cheikh Saad Bouh** and S. Dea (2000) : Species-Specific Monoclonal Antibodies to the *E. coli*-expressed p36 Cytosolic Protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*.7(4) : 528-535 .

**K. Cheikh Saad Bouh**, F. Shareck and S. Dea (2003). Monoclonal Antibodies To *E. coli*-expressed P46 and P65 Membranous proteins for Specific Immunodetection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Lungs of Infected Pigs. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*.10 (3): 459-468.

**K. Cheikh Saad Bouh**, A. Boisvert, L. Wilson, F. Shareck and S. Dea (2004). Kinetics of the immune response in pigs to individual *E. coli*-expressed and authentic P46, P65 and P97 membrane-anchored proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vaccine (soumis)*

**K. Cheikh Saad Bouh**, Y. St-Pierre, F. Shareck and S. Dea (2004) Immunization of pigs with P46, P65 and P97 *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant proteins and study of their potential as sub-unit vaccines. *Vaccine (soumis)*

## Communications

J. Caron, M. Ouardani, B. B. A. Moumen, **K. Cheikh Saad Bouh** and S. Dea (1998) : Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs by PCR amplification of DNA fragments of the P36 and P46 genes. 79 th Conference of Research Workers in Animal Diseases (CRWAD), Chicago, *Illinois, USA, abstract : P96*.

J. Caron, **K. Cheikh Saad Bouh**, F. Shareck, N. Sawyer and S. Dea (1999) : Specificity of hyperimmune serum and monoclonal antibodies to recombinant P36 protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Congrès de la SCM, Montreal, Qc, Canada, abstract : VM5.

J. Caron, M. Ourdani, **K. Cheikh Saad Bouh** and S. Dea (1999) Molecular diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs by a multiplex PCR assay. Congrès de la SCM, Montreal, Qc, Canada, abstract : VMp21.

J. Caron, **K. Cheikh Saad Bouh**, B. Ben Abdel Moumen, N. Sawyer and S. Dea (1999) : Species-Specific Monoclonal Antibodies to the *E. coli*-expressed p36 Cytosolic Protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*.42<sup>ND</sup> Annual Meeting of American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (AAVLD), San Diego, California, U.S.A

J. Caron, **K. Cheikh Saad Bouh\***, B. Ben Abdel Moumen, N. Sawyer et S. Dea (2000). Production D'Anticorps monoclonaux Spécifiques à la Protéine Cytosolique P36 de *Mycoplasma hyopneumoniae* exprimée chez *E. coli*. Colloque International en Bactériologie Vétérinaire, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada , abstract : **P16**

J. Caron, M. Ouardani, **K. Cheikh Saad Bouh\*** et S. Dea (2000) PCR Multiplex Pour La Détection et La Différenciation Des Infections à *Mycoplasma hyopneumoniae* et *Mycoplasma hyorhinis* chez le Porc. Colloque International en Bactériologie Vétérinaire, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada , abstract : **P17**

**K. Cheikh Saad Bouh**, L. Wilson, M. Hernandez Perez et S. Dea (2000). Mutagénèse Dirigée des Gènes Codant pour les Protéines Membranaires P46 et P65 de *Mycoplasma hyopneumoniae* et Expression dans *E. coli*. Journées de Recherche en Productions animales du Conseil des Productions Animales du Québec (CPAQ), Québec, Qc, Canada ,abstract : **page 105**.

J. Caron, **K. Cheikh Saad Bouh\***, B. Ben Abdel Moumen, N. Sawyer et S. Dea (2000). Production d'anticorps monoclonaux contre les protéines P36 et P65 recombinantes de *Mycoplasma hyopneumoniae* et étude de leur réactivité spécifique contre les protéines natives. Journées de Recherche en Productions animales du Conseil des Productions Animales du Québec (CPAQ), Québec, Qc, Canada , abstract : **page 175**.

**K. Cheikh Saad Bouh\***, L. Wilson, A. Boisvert, N. Sawyer, F. Shareck and S. Dea (2000). Prokaryotic expression and antigenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* P46 and P65 membranous proteins. 81<sup>th</sup> Conference of Research Workers in Animal Diseases (CRWAD), Chicago, Illinois, USA, abstract : **No.152**

**K. Cheikh Saad Bouh\***, L. Wilson, A. Boisvert, N. Sawyer, F. Shareck and S. Dea (2001). *E. coli*-Expression of Membranous P46 and P65 proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* and production of Species-Specific Monoclonal Antibodies. X International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians (WAVLD), Salsomaggiore-Parma, Italy (4-7 juillet 2001).

**K. Cheikh Saad Bouh\***, A. Boisvert, F. Shareck and S. Dea (2002). Directed mutagenesis and *E. coli* expression of P46 and P65 membranous proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* and use of MAbs for indirect immunofluorescence (IIF) and Immunoperoxydase (IIP). 83<sup>th</sup> Conference of Research Workers in Animal Diseases (CRWAD), St. Louis, Missouri, USA, abstract : **No.4P**

**K. Cheikh Saad Bouh\***, C. A. Gagnon, I. Moreau and S. Dea (2002). *E. coli* expression and immunogenicity of P46, P65 and P97 membranous proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* and potential use as subunit vaccine. 83<sup>th</sup> Conference of Research Workers in Animal Diseases (CRWAD), St. Louis, Missouri, USA, abstract : **No.152**

**Annexe B**

**Clonage du gène p65 muté dans le vecteur pVAX1**

## IMMUNISATION GÉNÉTIQUE PAR UN VECTEUR EUCARYOTE RECOMBINANT

### Intérêt

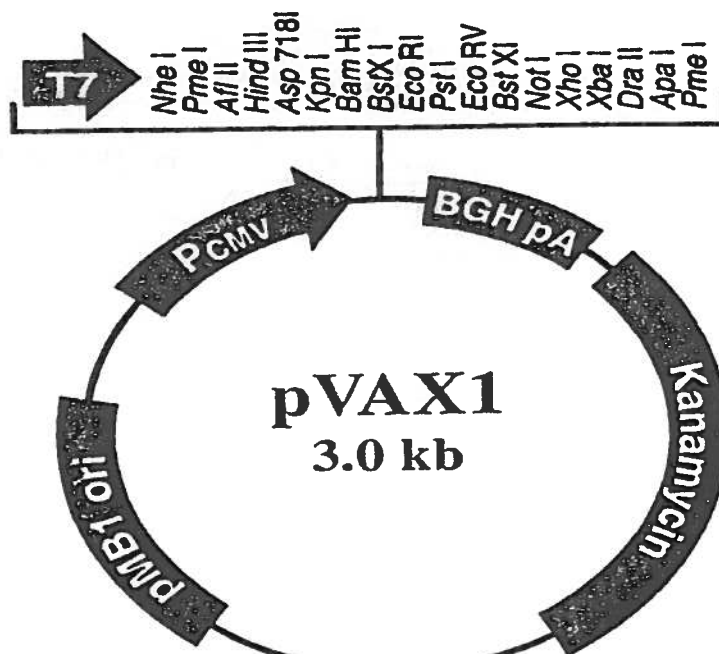
Ce type d'immunisation permet d'optimiser les éventuels clivages post-traductionnels des protéines d'intérêt et de permettre un repliement identique à celui observé lors de l'infection. D'autre part, cette méthode en plus de préserver la conformation naturelle des protéines permettra d'induire aussi bien la réponse immune humorale que cellulaire.

### OBJECTIF

Étudier l'efficacité de ce type d'immunisation dans la protection contre la pneumonie enzootique à *M. hyopneumoniae* et deuxièmement la comparer à l'immunisation classique par les protéines recombinantes.

### VECTEUR

Le vecteur plasmidique choisi est le pVAX1 provenant de la compagnie Invitrogen et dont la cartographie est la suivante :



Ce vecteur est un dérivé de pRc/CMV2 qui faisait 5.5 kb comparé à 3.0 kb pour le pVAX1 en suivant les recommandations de la FDA (Food and Drug Administration) américaine de 1996. Ces dernières stipulaient que l'utilisation à titre préventif de vaccins à base d'ADN plasmidique requiert que ces vecteurs plasmidiques soient les plus petits possibles pour éviter l'injection de séquences d'ADN non désirées. En plus de ce dépouillement de pVAX1 par rapport au vecteur d'origine pRc/CMV2, la cassette Ampicilline a été remplacée par une à la Kanamycine dans pVAX1.

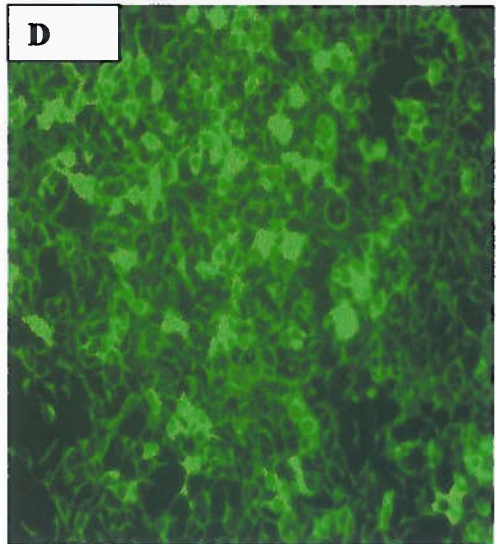
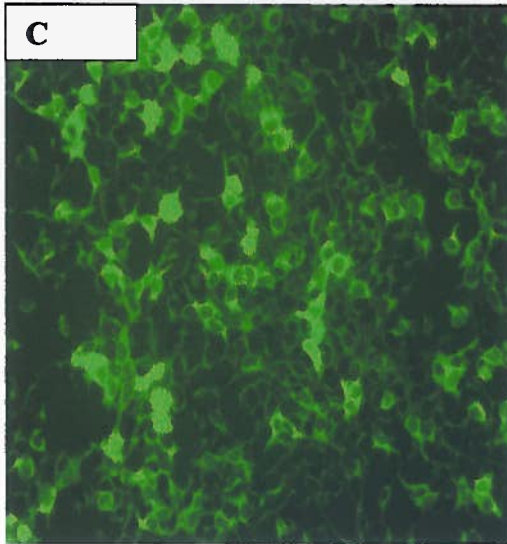
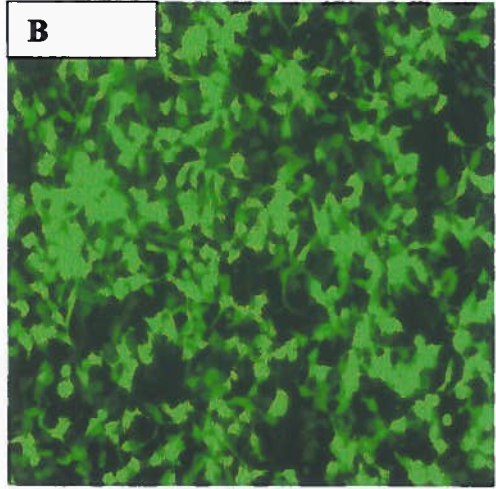
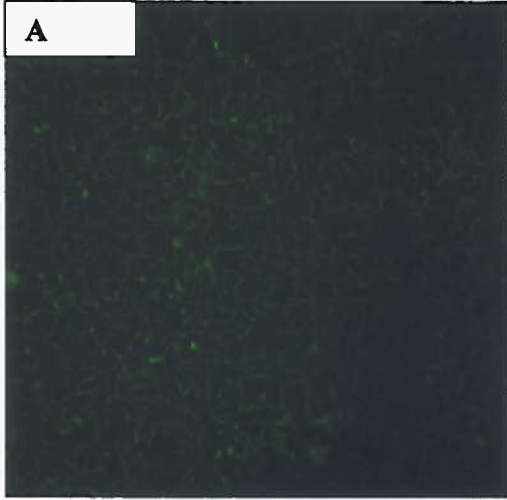
## **MÉTHODES**

Avant de vérifier le potentiel immunostimulateur et protecteur du vecteur recombinant (pVAX1-P65), nous avons transfecté des cellules 293A avec l'ADN plasmidique recombinant et avons vérifié l'expression transitoire par IF.



**EXPRESSION TRANSITOIRE APRÈS CLONAGE DU GÈNE P65 DANS LE VECTEUR EUCARYOTIQUE pVAX1. La figure montre une transfection avec 1µg d'ADN des cellules 293A. L'expression du gène est détectée par IF en utilisant les AcMos anti-P65.**

- A) cellules transfectées mais IF avec sérum négatif**
- B) Contrôle de transfection (pADGFP)**
- C) et D) cellules transfectées avec pVAX1 recombinant et IF 72 heures après.**



**Annexe C**

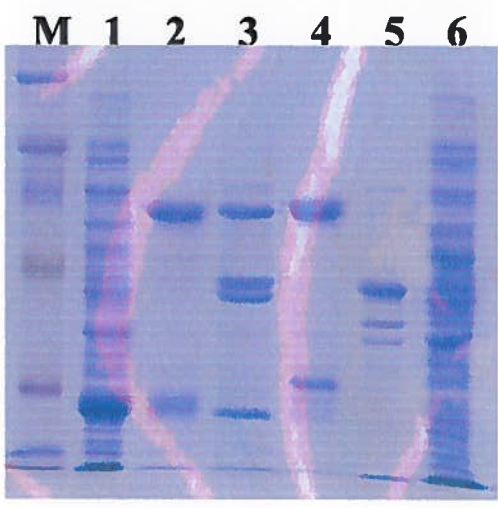
**Clonage et expression des protéines recombinantes P97<sub>N</sub> et P97<sub>C</sub>**

## **Expression des protéines recombinantes tronquées P97<sub>N</sub> et P97<sub>C</sub>**

Après avoir effectué la mutagenèse dirigée des 4 TGA du gène P97 en les remplaçant par des TGG, nous l'avons tronqué au niveau de deux sites. Un au niveau de la région C-terminale et un autre dans la région N-terminale du gène P97. Le clonage dans un vecteur procaryotique pGEX-4T1 et l'expression des protéines recombinantes a permis d'avoir respectivement 2 protéines fusionnées à la GST (GST- P97<sub>N</sub> et GST- P97<sub>C</sub>). Étant donné qu'on retrouve un site de clivage à la thrombine entre la GST et la protéine d'intérêt, la protéine fusionnée a subi une digestion à la thrombine pour enlever la GST.

**But:** Ces protéines tronquées serviront essentiellement dans la cartographie de P97 par le biais de la réactivité aux AcMos et au sérum de porcs convalescents. D'autre part, dans l'éventualité que la P97 montre un bon potentiel vaccinal, il serait important de comparer la protection conférée par la protéine totale par rapport à celles induites par les protéines tronquées. En effet, tout ceci dans le but de simplifier au maximum la composition d'un éventuel vaccin sous-unitaire.

**Gel SDS montrant l'expression des protéines tronquées fusionnées à la GST (GST-P97<sub>N</sub> et GST-P97<sub>C</sub>) et des protéines clivées par la thrombine. Puits 1) induction de la GST; Puits 2) la protéine GST-P97<sub>N</sub>; Puits 3) GST-P97<sub>N</sub> clivée par la thrombine; Puits 4) la protéine GST-P97<sub>C</sub>; Puits 5) GST-P97<sub>C</sub> clivée par la thrombine; Puits 6) bactéries non induites à l'IPTG; Puits M) le marqueur de poids moléculaire Rainbow.**



**Annexe D**

### Production et réactivité des AcMos anti P97 et P97<sub>C</sub>

Après immunisation de souris BALb/C par les protéines rec. P97 et P97<sub>C</sub>, des anticorps monoclonaux ont été produits par fusion cellulaire selon la méthode de Kohler et Milstein (1975).

En effet, quatre anticorps anti-P97 et trois dirigés contre la P97 tronquée en N-terminale (P97<sub>C</sub>) ont été sélectionnés.

Ces AcMos ont été testés par immunobuvardage de type Western contre 3 souches de référence de *M. hyopneumoniae* et contre deux autres espèces de mycoplasmes porcins (*M. hyorhinis* et *M. hyosynoviae*) et ces AcMos semblent très spécifiques à *M. hyopneumoniae*.

D'autre part, des tests sur la bactérie entière de la souche de référence de *M. hyopneumoniae* semble indiquer que certains de ces anticorps peuvent révéler plusieurs bandes probablement due à une réactivité avec deux sous unités de la P97.

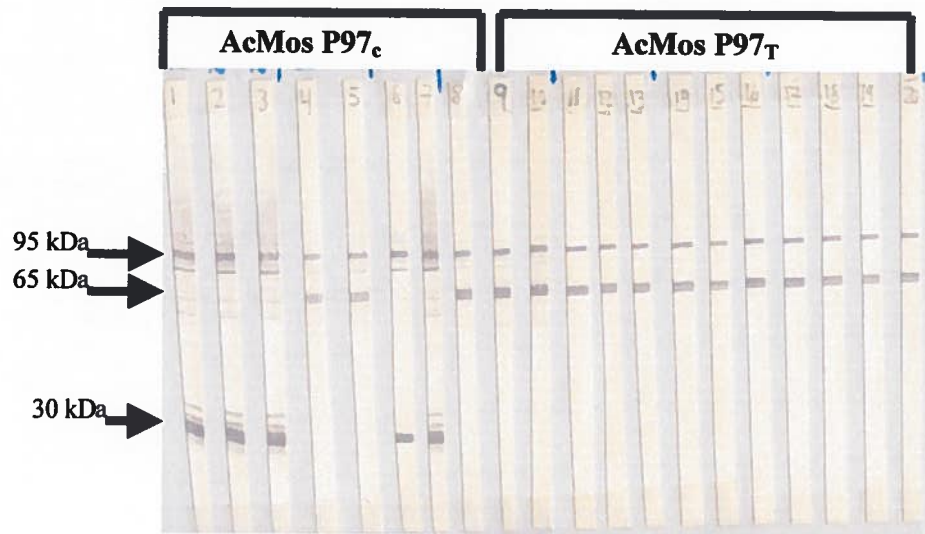
Ces derniers résultats préliminaires mériteraient une caractérisation plus poussée pour permettre d'élucider ce phénomène.



**Immunobuvardage de type Western sur la réactivité des AcMos en testant la souche homologue et deux souches de référence.**

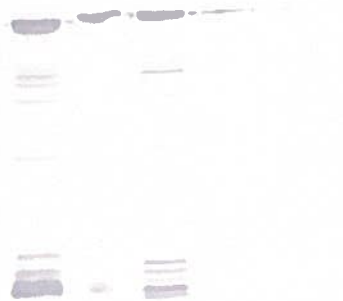
- A) Réactivité des AcMos anti-P97<sub>c</sub> et anti-P97 sur antigène complet de la souche de référence 25934.
- B) Réactivité des AcMos anti- P97<sub>c</sub> avec les souches de référence de *M. hyopneumoniae* et deux autres espèces de mycoplasmes porcins. Puits 1) 25934; Puits 2) 25095; Puits 3) J; Puits 4) *M. hyorhinis*; Puits 5) *M. hyosynoviae*.
- C) Réactivité des AcMos anti- P97 avec les souches de référence de *M. hyopneumoniae* et deux autres espèces de mycoplasmes porcins. Puits 1) 25934; Puits 2) 25095; Puits 3) J; Puits 4) *M. hyorhinis*; Puits 5) *M. hyosynoviae*

**A**



**B**

1 2 3 4 5



**AcMos P97<sub>c</sub>**

**C**

1 2 3 4 5



**AcMos P97<sub>T</sub>**

