

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

**Évaluation du potentiel vaccinal d'un adénovirus recombinant non
réplicatif exprimant l'adhésine P97 de *Mycoplasma hyopneumoniae*
contre la pneumonie enzootique porcine**

PAR

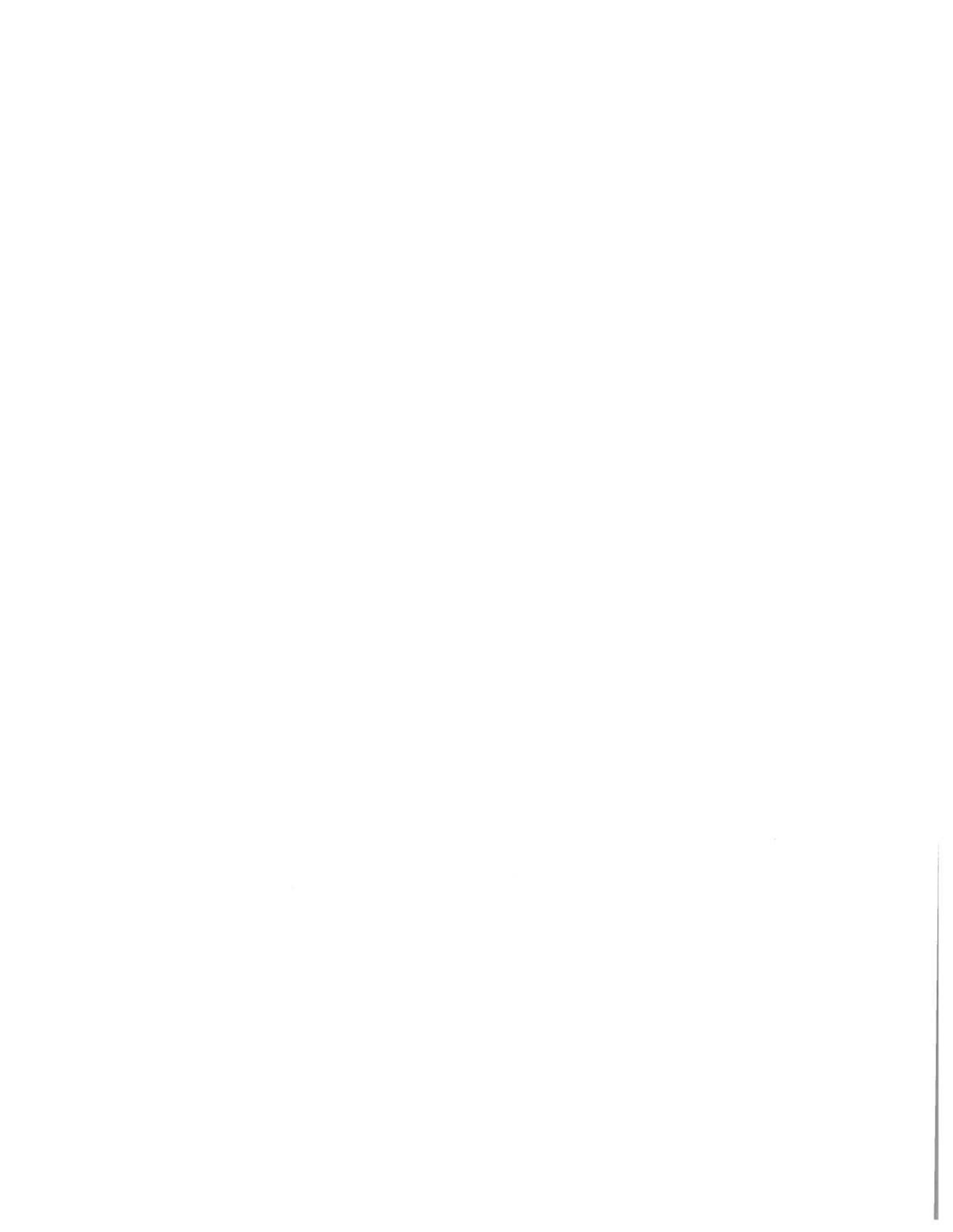
FAUST RENÉ OKAMBA ONDZIA

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

Jury d'évaluation

Présidente du jury et membre interne	Dr. Veronika von Messling INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Dr. Serge Messier Université de Montréal
Examineur externe	Dr. Guy Lemay Université de Montréal
Directeur de recherche	Dr. Maximilien Arella INRS-Institut Armand-Frappier
Codirecteur de recherche	Dr. Carl A. Gagnon Université de Montréal

©Droits réservés de Faust René Okamba Ondzia, 2009.



À mon Feu père

In memoriam

À ma mère

Pour son soutien et son amour sans égal

À Marie-Laure

Pour son amour, sa patience et ses encouragements

À Nora

Pour le bonheur qu'elle m'apporte au quotidien

À mon oncle Nicolas

Qui m'a appris à ne jamais désespérer

À mes frères et sœurs

Pour leur soutien durant toutes années

À Mauricette et Michel

Pour leur soutien moral

À tous mes amis

En souvenir des agréables moments

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

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xi
RÉSUMÉ	xiii
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
1. Généralités sur les Mollicutes.....	6
1.1. Définition et classification.....	6
1.2. Aspects structuraux et biochimiques.....	9
1.3. Aspect génomique.....	10
1.4. Croissance <i>in vitro</i>	11
2. Particularités de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	13
2.1. Importance économique et épidémiologie.....	13
2.2. Symptômes de la pneumonie enzootique porcine.....	15
2.3. Diagnostic.....	18
2.4. Pathogénèse de <i>M. hyopneumoniae</i>	20
2.4.1. Adhérence aux cellules de l'hôte.....	20
2.4.2. Interaction avec le système immunitaire.....	24
2.4.2.1. Immunité non spécifique.....	24
2.4.2.2. Immunité spécifique.....	25
2.4.2.3. Évasion du système immunitaire.....	26
2.5. Mesures de lutte contre <i>M. hyopneumoniae</i>	27
2.5.1. Antibiothérapie.....	27
2.5.2. Mesures zootechniques et préventives.....	28
2.5.3. Vaccination.....	30
2.5.3.1. Généralités.....	30
2.5.3.2. Paradigme de la réponse Th1 et Th2.....	33
2.5.3.3. Implication de la réponse Th1 ou Th2 contre <i>M. hyopneumoniae</i>	35

2.5.3.4. Vaccins existants contre <i>M. hyopneumoniae</i>	36
2.5.3.5. Vaccins expérimentaux.....	38
3. Adénovirus.....	40
3.1. Définition et classification.....	40
3.2. Aspect structural et génomique.....	42
3.3. Tropisme cellulaire et cycle viral.....	45
3.4. Vecteurs adénoviraux.....	47
3.4.1. Généralités.....	47
3.4.2. Avantages et inconvénients.....	49
3.4.3. Application en thérapie génique et oncolytique.....	51
3.4.4. Application en vaccination.....	53
Justification des travaux.....	56
Partie expérimentale I.....	57
« Construction de l'adénovirus recombinant non répliquatif exprimant la P97c de <i>M. hyopneumoniae</i> et évaluation de la réponse immunitaire spécifique anti-P97c chez la souris »	
Matériel et Méthodes.....	58
1. Gène de la P97 et anticorps monoclonaux.....	58
2. Adénovirus et vecteur de transfert.....	58
3. Cellules eucaryotes et bactériennes.....	60
4. Production et purification de la P97c recombinante.....	61
5. Construction d'adénovirus recombinants non répliquatif rAdP97c.....	63
5.1. Construction du vecteur de transfert recombinant.....	63
5.2. Recombinaison homologue et purification des plages de lyse.....	65
5.3. Production et purification d'adénovirus recombinants.....	67
5.4. Titrage d'adénovirus recombinants.....	70
6. Vérification de l'expression de la P97c.....	71
6.1. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide.....	71
6.2. Immunobuvardage de type Western.....	72
6.3. Immunofluorescence indirecte.....	72
7. Vaccination de souris.....	73
7.1. Protocole expérimental et échantillonnage.....	73
7.2. Détection des anticorps anti-P97c.....	74
7.3. Test d'inhibition de croissance de <i>M. hyopneumoniae</i> <i>in vitro</i>	75

7.4. Analyses statistiques.....	76
Résultats.....	77
1. Production de la protéine recombinante P97c.....	77
2. Construction du vecteur de transfert pAdP97c.....	79
3. Génération de l'adénovirus recombinant rAdP97c.....	81
4. Induction de la réponse immunitaire humorale par rAdP97c.....	83
4.1. Réponse immunitaire systémique.....	83
4.2. Réponse immunitaire mucoale.....	86
4.3. Profil d'isotypes d'IgG anti-P97c au niveau systémique et mucoale.....	86
5. Inhibition de croissance de <i>M. hyopneumoniae</i> par les anticorps anti-P97c.....	89
Conclusion.....	92
Partie expérimentale II.....	94
« Vaccination des porcs avec rAdP97c et évaluation de la protection conférée contre une infection épreuve par <i>M. hyopneumoniae</i> : comparaison avec le vaccin commercial Suvaxyn® MH-one »	
Matériel et Méthodes.....	95
1. Souches de <i>M. hyopneumoniae</i>	95
1.1. Vérification de l'identité des souches.....	95
1.2. Conditions de culture <i>in vitro</i> et titrage de <i>M. hyopneumoniae</i>	95
1.3. Extraction des protéines totales de <i>M. hyopneumoniae</i>	96
2. Expérimentation chez les porcs.....	97
2.1. Infections préliminaires.....	97
2.2. Vaccination et infection épreuve.....	98
2.3. Échantillonnage.....	100
3. Analyse de la réponse humorale.....	101
4. Analyse de la réponse à médiation cellulaire.....	103
4.1. Isolement des PBMCs.....	103
4.2. Tests de transformation lymphoblastique.....	104
5. Dosage de cytokines dans les lavages bronchoalvéolaires.....	105
6. Examen des lésions pulmonaires.....	107
7. Analyse cytologique des lavages bronchoalvéolaires.....	108
8. Analyse bactériologique.....	109
9. Test d'inhibition de croissance <i>in vitro</i> de <i>M. hyopneumoniae</i>	109

10. Analyses statistiques.....	110
Résultats.....	111
1. Sélection d'une souche virulente de <i>M. hyopneumoniae</i>	111
2. Évaluation de la protection conférée par les vaccins suite à une infection épreuve.....	113
2.1. Signes cliniques.....	113
2.2. Réduction des lésions pulmonaires macroscopiques.....	115
2.3. Réduction des lésions pulmonaires microscopiques.....	117
2.4. Prévention de la réponse inflammatoire.....	120
2.4.1. Réduction de l'accumulation des leucocytes.....	120
2.4.2. Réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires.....	123
2.5. Réduction du titre de l'agent pathogène.....	125
3. Évaluation de la réponse immunitaire post-vaccination et post-infection défi.....	127
3.1. Évaluation de la réponse humorale systémique.....	127
3.1.1. Induction des anticorps IgG et IgA totaux.....	127
3.1.2. Type de la réponse humorale anti-P97c au niveau systémique.....	132
3.2. Évaluation de la réponse humorale mucoale.....	135
3.2.1. Induction des anticorps IgG et IgA anti-P97c dans les salives et les lavages bronchoalvéolaires.....	135
3.2.2. Type de la réponse humorale anti-P97c au niveau des muqueuses respiratoires.....	137
3.3. Réponse à médiation cellulaire.....	140
4. Inhibition de croissance <i>in vitro</i> de <i>M. hyopneumoniae</i>	142
Conclusion.....	145
DISCUSSION GÉNÉRALE.....	146
CONCLUSION GÉNÉRALE et PERSPECTIVES.....	160
REMERCIEMENTS.....	164
BIBLIOGRAPHIE.....	166
ANNEXE A : publication avec comités de lecture.....	204
ANNEXE B : publication dans un résumé de congrès.....	206
ANNEXE C : participations aux congrès.....	207

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Observation par microscopie à balayage de la trachée de porcs infectés par <i>M. hyopneumoniae</i>	17
Figure 2.	Représentation schématique de la structure d'adhérence de en forme d'embout « tip organelle » de <i>M. pneumoniae</i>	21
Figure 3.	Organisation de l'adhésine P97 de souche 232 de <i>M. hyopneumoniae</i>	23
Figure 4.	Voies classiques de stimulation et de régulation des lymphocytes Th1 et Th2.....	34
Figure 5.	Variabilité de la composition antigénique et de protection parmi les bactérines anti- <i>M. hyopneumoniae</i>	37
Figure 6.	Classification des adénovirus.....	41
Figure 7.	Organisation génomique de l'adénovirus humain de sérotype 5.....	44
Figure 8.	Cartographie du vecteur de transfert.....	59
Figure 9.	Étapes de la construction l'adénovirus recombinant non répliatif rAdP97c.....	66
Figure 10.	Étapes d'amplification de l'adénovirus recombinant non répliatif rAdP97c.....	68

Figure 11.	Expression de la P97c dans <i>E. coli</i> et illustration schématique du clivage de la P97c.....	78
Figure 12.	Détection de l'expression de la P97c dans les cellules eucaryotes par immunofluorescence indirecte.....	80
Figure 13.	Détection de l'expression de la P97c dans les cellules eucaryotes par immunobuvardage de type Western.....	82
Figure 14.	Détection des anticorps IgG anti-P97c par immunobuvardage de type Western suite à l'immunisation des souris avec rAdP97c.....	85
Figure 15.	Profil d'isotypes d'IgG anti-P97c dans les sérums et les lavages bronchoalvéolaires suite à l'immunisation des souris avec rAdP97c...	88
Figure 16.	Inhibition de la croissance de <i>M. hyopneumoniae</i> par les anticorps de souris anti-P97c.....	91
Figure 17.	Comparaison de la portion de portion C-terminale de la P97 contenant les régions RR1 et RR2 des souches de <i>M. hyopneumoniae</i> utilisées dans cette étude	112
Figure 18.	Photographies des lésions pulmonaires macroscopiques observées chez les porcs vaccinés et infectés par <i>M. hyopneumoniae</i>	116
Figure 19.	Pourcentage des lésions macroscopiques pulmonaires observées chez les porcs vaccinés et infectés par <i>M. hyopneumoniae</i>	118
Figure 20.	Effet des vaccins sur la réduction des lésions microscopiques suite à l'infection par <i>M. hyopneumoniae</i>	119

Figure 21.	Effet des vaccins sur la proportion de leucoctyes dans les LBAs suite à l'infection par <i>M. hyopneumoniae</i>	121
Figure 22.	Effet des vaccins sur la réponse pro-inflammatoire suite à l'infection par <i>M. hyopneumoniae</i>	124
Figure 23.	Effet des vaccins sur la réduction du titre de <i>M. hyopneumoniae</i> dans les tissus pulmonaires et les lavages bronchoalvéolaires.....	126
Figure 24.	Cinétique de la réponse humorale systémique anti-P97c suite à la vaccination et à l'infection par <i>M. hyopneumoniae</i>	131
Figure 25.	Cinétique de la réponse des isotypes IgG1 et IgG2a sériques anti-P97c suite à la vaccination et à l'infection par <i>M. hyopneumoniae</i>	134
Figure 26.	Réponse humorale anti-P97c dans les salives suite à la vaccination et à l'infection par <i>M. hyopneumoniae</i>	136
Figure 27.	Réponse humorale anti-P97c dans les lavages bronchoalvéolaires suite à la vaccination et à l'infection par <i>M. hyopneumoniae</i>	138
Figure 28.	Profil d'isotypes d'IgG anti-P97c dans les salives et les lavages Broncho-alvéolaires des porcs vaccinés et infectés.....	139
Figure 29.	Réponse à médiation cellulaire suite à la vaccination et à l'infection par <i>M. hyopneumoniae</i>	141
Figure 30.	Inhibition <i>in vitro</i> de la croissance de <i>M. hyopneumoniae</i> par les anticorps anti-P97c de porcs.....	144

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Exemples de pathologies dues aux <i>Mollicutes</i>	7
Tableau 2.	Classification des <i>Mollicutes</i>	8
Tableau 3.	Avantages et inconvénients des vecteurs de transfert de gènes.....	48
Tableau 4.	Exemples d'utilisation des adénovirus comme vecteurs vaccinaux en médecine vétérinaire.....	55
Tableau 5.	Détection par ELISA des IgG and IgA anti-P97c dans les sérums et les lavages bronchoalvéolaires suite à l'immunisation des souris avec rAdP97c.....	87
Tableau 6.	Description des groupes expérimentaux	99
Tableau 7.	Anticorps secondaires utilisés pour les analyses sérologiques.....	102
Tableau 8.	Réactifs utilisés pour le dosage de cytokines.....	106
Tableau 9.	Évaluation de la prévention de la perte de poids suite à la vaccination et l'infection par <i>M. hyopneumoniae</i>	114
Tableau 10.	Détection des IgG sériques anti- <i>M. hyopneumoniae</i> à l'aide du kit «HerdChek <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> Antibody».....	130

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A :	adénine
AcMo :	anticorps monoclonaux
ADN :	acide désoxyribonucléique
AdV	adénovirus
AdV5	adénovirus Humain de sérotype 5
ARN	acide ribonucléique
ATCC :	American Type Culture Collection
ATP :	adénosine 5'-triphosphate
BSA :	albumine sérique bovin
C :	cytosine
CCU :	color changing units ou unité de changement de couleur
CMH :	complexe majeur d'histocompatibilité
CPA :	cellules présentatrices d'antigènes
CTL :	lymphocyte T cytotoxique
CVP-2 :	circovirus porcin de type 2
DMEM :	Milieu Dulbecco's Modified Eagle's
dNTP:	2'-désoxyribonucléoside 5'-triphosphate
DO :	densité optique
EDTA :	acide éthylènediamine tétraacétique
ELISA :	épreuve immunoenzymatique (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
FBS :	sérum de veau fœtal
FITC :	isothiocyanate de fluorescéine
G :	guanine
GFP :	green fluorescent protein ou protéine fluorescente verte
GMQ :	gain de poids moyen quotidien
GST:	Glutathione S-transferase
CMV:	cytomegalovirus
HRP :	péroxydase de Raifort
IFI :	immunofluorescence indirecte
IFN :	interféron
Ig :	immunoglobuline
IL :	interleukine
IPTG :	isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside

ITR :	séquences terminales inversées
Kb :	kilobases
kDa :	kilodalton
LBA :	lavage broncho-alvéolaire
min:	minute
PBMC :	cellules mononuclées du sang périphériques
Pb :	paire de bases
PBS :	solution saline phosphatée
PCR :	réaction de polymérisation en chaîne
PEP :	pneumonie enzootique porcine
PRDC :	complexe des maladies respiratoires porcines
SDS :	sodium sodium dodécylsulfate
SDS-PAGE	électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécylsulfate
SRRP :	syndrome reproducteur et respiratoire porcin
T :	thymidine
TCID ₅₀ :	dose infectieuse induisant un effet cytopathique dans 50% de cellules infectées
TCR :	récepteur exprimée à la surface des cellules T
Th:	lymphocyte T helper ou auxiliaire
TNF :	facteur de nécrose tumorale
TTL	test de transformation lymphoblastique
TP :	température pièce
VSRRP :	virus du Syndrome Reproducteur et Respiratoire Porcin

RÉSUMÉ

Mycoplasma hyopneumoniae est l'agent étiologique de la maladie connue sous le nom de pneumonie enzootique porcine (PEP) qui, de part ses effets néfastes sur les performances zootechniques, cause des pertes économiques considérables dans l'industrie porcine à travers le monde. Les stratégies de lutte contre *M. hyopneumoniae* comprennent des mesures non vaccinales (antibiothérapie et mesures d'hygiène) et la vaccination. Toutefois, malgré leur application, on ne parvient toujours pas à réduire la prévalence de l'agent pathogène dans les élevages. Les vaccins disponibles commercialement sont essentiellement de type bactérine c'est-à-dire fabriqués à partir de souches inactivées du mycoplasme. Il est admis que ces vaccins améliorent les performances zootechniques (par exemple le gain de poids moyen quotidien et la conversion alimentaire) et réduisent les lésions pulmonaires causées par *M. hyopneumoniae*. Ces vaccins présentent cependant des limitations : ils n'éliminent pas l'agent pathogène dans les tissus pulmonaires et ne protègent pas les porcs contre les infections subséquentes.

M. hyopneumoniae initie sa pathogénèse en s'adhérant intimement aux cellules épithéliales respiratoires. Puisque l'infection est restreinte au niveau des voies respiratoires, il est probable qu'un vaccin stimulant une réponse immunitaire locale, à la fois humorale et à médiation cellulaire, puisse être effectif contre l'agent pathogène. Ainsi, nos travaux s'inscrivent dans cette démarche et visent à développer un vaccin sous-unitaire contre *M. hyopneumoniae*. Pour ce faire, la portion C-terminale de la protéine adhésine P97 (P97c) a été considérée comme antigène vaccinal car elle médie l'adhérence du microorganisme aux cellules épithéliales ciliées du tractus respiratoire. Un adénovirus Humain de sérotype 5 (AdV5) a été considéré comme vecteur de la P97c pour son fort tropisme pour les cellules du tractus respiratoires. De plus, ce vecteur est aussi connu pour sa capacité à induire, contre le transgène, une réponse immunitaire de type Th1 (à médiation cellulaire) et de type Th2 (humorale) tant au niveau systémique que des muqueuses respiratoires.

Après avoir construit notre vecteur vaccinal, l'AdV5 recombinant non répliquatif exprimant la P97c (rAdP97c), l'expression de la P97c à tout abord été confirmée *in vitro* par immunofluorescence indirecte et immunobuvardage de type Western. Par la suite, nous avons démontré que l'immunisation des souris avec rAdP97c par voie intranasale et intramusculaire induisait une réponse en anticorps anti-P97c, composée d'IgG1 et d'IgG2a, à la fois au niveau systémique et des muqueuses respiratoires. De plus, cette réponse était capable d'inhiber la croissance de *M. hyopneumoniae* *in vitro*. Suite à la vaccination des porcs par voie intranasale avec le rAdP97c et à l'infection par la souche virulente 232 de *M. hyopneumoniae*, nous avons constaté que le vecteur rAdP97c induit une réponse immunitaire spécifique contre la P97c. En effet, une forte réponse humorale a été détectée au niveau systémique, dans les salives et dans les lavages broncho-alvéolaires (LBAs). Une réponse à médiation cellulaire caractérisée par la sécrétion d'INF- γ a également été révélée. Il a été intéressant de noter que les porcs vaccinés avec le rAdP97c présentaient une réduction significative des lésions pulmonaires macroscopiques et microscopiques ainsi qu'une diminution de la quantité de l'agent pathogène dans les LBAs et les poumons par rapport aux porcs non vaccinés/infectés. Toutefois, le rAdP97c s'est avéré moins protecteur que le vaccin commercial « Suvaxyn® MH-One ». Ce dernier s'est montré également plus efficace que le vecteur rAdP97c en termes d'amélioration du gain de poids moyen quotidien (GMQ) et de prévention de la réponse inflammatoire causée par *M. hyopneumoniae*.

En conclusion, nos travaux ont montré que notre système vaccinal, rAdP97c, a un effet partiellement protecteur comparativement au vaccin commercial qui lui est multi-antigénique. Néanmoins, ce système pourrait représenter une alternative intéressante aux vaccins actuels, si l'on y ajoute d'autres antigènes immunodominants de l'agent pathogène.



Étudiant

Faust René Okamba


Directeur de recherche

Dr Maximilien Arella


Co-directeur de recherche

Dr. Carl A. Gagnon

- INTRODUCTION GÉNÉRALE -

Depuis plusieurs années les maladies respiratoires regroupées sous la terminologie de complexe des maladies respiratoires porcines (Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC)) sont prédominantes dans l'industrie porcine. Le PRDC est souvent due à l'interaction synergique de multiples agents pathogènes incluant les virus comme le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP) et le circovirus porcin de type 2 (CVP-2) ainsi que les bactéries dont *Mycoplasma hyopneumoniae* figure parmi les plus importantes (Thacker, 2006).

Mycoplasma hyopneumoniae est l'agent étiologique de la maladie connue sous le nom de pneumonie enzootique porcine (PEP). Cette maladie respiratoire chronique est retrouvée chez les porcs à tout moment de leur stade de développement et on estime que près de 80% des élevages à travers le monde sont infectés par l'agent pathogène (Maes *et al.*, 2007). La PEP cause des pertes économiques considérables à l'industrie porcine mondiale de part ses effets néfastes sur les performances zootechniques des porcs. Ces pertes ont été chiffrées à plus de 300 M\$ rien qu'aux États-Unis d'Amérique (Thacker, 2006).

La PEP est souvent sous estimée en raison de l'absence de symptômes marqués. Cependant, il est clairement démontré que *M. hyopneumoniae* cause un retard de croissance chez les animaux gravement touchés, lequel est, en partie, responsable des pertes économiques enregistrées dans les élevages. De plus, il est aujourd'hui établi que *M. hyopneumoniae* joue un rôle central dans le PRDC en potentialisant d'autres infections telles que celles du VSRRP, du CPV-2 et de l'*Actinobacillus pleuropneumoniae* (Thacker *et al.*, 1999; Opriessnig *et al.*, 2006 ; Marois *et al.*, 2009).

Les stratégies de lutte contre *M. hyopneumoniae* comprennent les mesures non vaccinales (antibiothérapie et mesures d'hygiène) et vaccinales. Toutefois, malgré leur application étendue, on ne parvient toujours pas à réduire la prévalence de cet agent pathogène. Les vaccins disponibles dans le commerce sont essentiellement de type bactérine, c'est-à-dire fabriqués à partir de souches inactivées du mycoplasme. Sans

contredit, ces vaccins améliorent les performances zootechniques et réduisent les lésions pulmonaires causées par *M. hyopneumoniae*. Toutefois, ils n'induisent pas une immunité durable et stérilisante et, par conséquent, ne protègent pas les animaux contre les infections subséquentes et n'éliminent pas le statut de porteur (Thacker *et al.*, 1998 ; Baccaro *et al.*, 2006; Sibila *et al.*, 2007). Leur coût de production est élevé en raison du fait que la croissance de ce microorganisme est lente et fastidieuse. De plus, les bactérines interfèrent avec les tests de diagnostic sérologique car elles contiennent la totalité (ou presque) des antigènes bactériens.

Afin de pallier les inconvénients des bactérines, plusieurs équipes tentent de développer de nouveaux types de vaccins qui sont essentiellement de type sous-unitaire. Nos travaux s'inscrivent dans cette démarche et nous avons choisi la protéine P97, plus précisément sa portion C-terminale (P97c) qui contient les régions désignées RR1 et RR2, comme antigène vaccinal car elle médie l'adhérence de *M. hyopneumoniae* aux cellules de l'hôte. D'autre part, nous nous sommes intéressés à un adénovirus comme vecteur vaccinal pour sa capacité à susciter préférentiellement une réponse immunitaire cellulaire (Tatsis et Ertl, 2004), laquelle serait importante dans la protection contre *M. hyopneumoniae* (Thacker *et al.*, 2000a, Shimoji *et al.*, 2003). De plus, les vecteurs adénoviraux sont aussi connus pour être capables de stimuler une immunité muqueuse spécifique contre le transgène au niveau des muqueuses respiratoires (Santossuosso *et al.*, 2006), laquelle est décrite comme cruciale pour la protection contre les agents pathogènes utilisant les muqueuses comme porte d'entrée (Neutra *et al.*, 2006).

La première partie de cette thèse portera sur la revue de littérature dans laquelle nous décrirons les caractéristiques et la pathogénicité de *M. hyopneumoniae* ainsi que d'autres organismes similaires. Nous y évoquerons également les éléments essentiels du diagnostic et de lutte contre cet agent pathogène. Puisque nos travaux portent également sur l'utilisation d'un adénovirus comme vecteur vaccinal, un chapitre de la revue de littérature y sera consacré.

La seconde partie de cette thèse décrira les travaux de laboratoire effectués. Ainsi, la construction de notre système vaccinal à savoir l'AdV5 non répliatif exprimant la P97c (rAdP97c) sera détaillée. Finalement, la capacité du virus rAdP97c à stimuler une réponse immunitaire spécifique contre la P97c et une protection contre l'infection expérimentale de porcs par *M. hyopneumoniae* seront évaluées.

- REVUE BIBLIOGRAPHIQUE-

1. Généralités sur les *Mollicutes*

1.1 Définition et classification

Le terme « mycoplasme » est communément utilisé pour désigner les bactéries de la classe des *Mollicutes* (du latin, *mollis* = mou ; *cutis* = peau), étymologiquement «organismes à peau molle ou sans paroi». Au sens strict, ce terme devrait uniquement désigner les espèces du genre *Mycoplasma* dont fait partie par *M. hyopneumoniae*. La première espèce de *Mollicutes* a été découverte à la fin du 19^{ème} siècle par Nocard et Roux (1896). Il s'agit de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC (small-colony), aujourd'hui connu comme l'agent étiologique de la pleuropneumonie bovine. Par la suite, au cours des années, d'autres espèces ont été identifiées comme agents étiologiques des pathologies importantes tant en médecine humaine que vétérinaire. Quelques-unes de ces espèces et les pathologies auxquelles elles sont associées sont revues au **tableau 1**.

La classification actuelle des *Mollicutes* comprend plusieurs ordres qui sont présentés au **tableau 2**. L'ordre des *Mycoplasmatales*, dont fait partie *M. hyopneumoniae*, est la plus importante en termes de nombre d'espèces répertoriées à date et plusieurs d'entre elles ont un rôle pathologique en médecine humaine et vétérinaire. D'après les analyses comparatives des séquences d'ARN ribosomal 16S, les *Mollicutes* sont phylogénétiquement plus proches des clostridies (bactéries du genre *Clostridium*) que des autres bactéries à paroi. Comme les *Mollicutes*, les clostridies ont un faible pourcentage en guanine (G) + cytosine (C). Il a été postulé que les mycoplasmes dériveraient de ces bactéries suite à un processus dit d'évolution régressive qui comprend la réduction de la taille du génome et la perte de la paroi (Woese *et al.*, 1980; Weisburg *et al.*, 1989).

Tableau 1. Exemples de pathologies dues aux *Mollicutes*^a

Hôte	Mycoplasme	Tropisme tissulaire ^b	Pathologies associées
Humain	<i>M. pneumoniae</i>	Tractus respiratoire	Pneumonie atypique ou communautaire
Humain	<i>M. penetrans</i>	Tractus urogénital	Vaginoses bactériennes
Humain	<i>M. genitalium</i>	Tractus urogénital	Vaginoses bactériennes
Humain	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Tractus urogénital	Urétrites non gonococciques
Ruminants	<i>M. bovis</i>	Tractus respiratoire	Mammite bovine
Ruminants	<i>M. mycoides</i>	Tractus respiratoire	Pleuropneumonie bovine
Ruminants	<i>M. agalactiae</i>	Glandes mammaires	Syndrome d'Agalactie contagieuse
Oiseaux	<i>M. gallisepticum</i>	Tractus respiratoire	Troubles respiratoires chroniques chez la poule, sinusite infectieuse chez la dinde
Oiseaux	<i>M. synoviae</i>	Articulations	Synovite infectieuse chez la poule et chez la dinde
Porc	<i>M. hyopneumoniae</i>	Tractus respiratoire	Pneumonie enzootique porcine

^a, compilé de Razin *et al.* 1998 et de Caswell et Archambault, 2008.

^b, localisation principale de l'agent pathogène.

Tableau 2. Classification des *Mollicutes*.

Classification	Taille du génome en kb (% G+C) ^a	Exigence en stérol	Principales caractéristiques	Hôtes
Ordre I : <i>Mycoplasmatales</i> Famille I : <i>Mycoplasmataceae</i>				
Genre I : <i>Mycoplasma</i> (n > 100)	500-1300 (23-41)	Oui	Croissance optimale à 37 °C	Humain, animaux
Genre II : <i>Ureaplasma</i> (n = 6)	760-1170 (27-30)	Oui	Hydrolyse l'urée	Humain, animaux
Ordre II : <i>Entomoplasmatales</i> Famille I : <i>Entomoplasmataceae</i>				
Genre I : <i>Entomoplasma</i> (n=5)	790-1140 (27-29)	Oui	Croissance optimale à 30 °C	Insectes, plantes
Genre II : <i>Mesoplasma</i> (n = 12)	870-1100 (27-30)	Non	Croissance optimale à 30 °C	Insectes, plantes
Famille II : <i>Spiroplasmataceae</i> Genre : <i>Spiroplasma</i> (n = 33)	780-2220 (24-31)	Oui	Morphologie hélicoïdale	Insectes, plantes
Ordre III : <i>Acheloplasmatales</i> Famille : <i>Acheloplasmataceae</i>				
Genre : <i>Acheloplasma</i> (n = 13)	1500-1650 (26-36)	Non	Croissance optimale à 30-37 °C	Animaux, plantes, insectes
Ordre IV : <i>Aneuropiasmatales</i> Famille : <i>Aneuropiasmataceae</i>				
Genre I : <i>Aneuroplasma</i> (n=4)	1500-1600 (29-34)	Oui	Anaérobies obligatoires	Rumen des bovins /ovins
Genre II : <i>Asteroplasma</i> (n = 1)	1500 (40)	Non	Anaérobies obligatoires	Rumen des bovins /ovins
Phytoplasma	640-1185 (23-29)	Non connu	Non cultivées <i>in vitro</i> à date	Insectes, Plantes

n, nombre d'espèces répertoriées jusqu'à date. Adapté de Razin *et al.*, 1998.
^a, données obtenues par expériences de PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis).

1.2. Aspects structuraux et biochimiques

Tel que mentionné précédemment, les *Mollicutes* sont des microorganismes dépourvues de paroi et incapables de synthétiser le peptidoglycane lequel est à l'origine de la structure rigide chez les bactéries à paroi. Leurs cellules sont simplement entourées par une membrane plasmique de structure classique c'est-à-dire composée d'une double couche lipidique et de protéines membranaires qui, contrairement à celle des bactéries à paroi, est très riche en lipoprotéines diacylées (Morr *et al.*, 2002).

En raison de l'absence de paroi, les *Mollicutes* sont naturellement insensibles aux β -lactamines (inhibiteurs de la synthèse de la paroi) et à leurs analogues. Ils sont aussi très sensibles au choc osmotique (Razin *et al.*, 1998). Ils sont également sensibles à la lyse par le système du complément et, par conséquent, leur croissance *in vitro* peut être inhibée par des anticorps spécifiques (Bredt *et al.*, 1977). Toujours en raison du manque de la paroi, les *Mollicutes* ont une apparence polymorphe et ne sont pas colorables par la méthode de Gram. Toutefois, certaines espèces peuvent exhiber des formes bien définies, soit ramifiées (par exemple *M. pneumoniae*), soit hélicoïdales (*Spiroplasma*). Ces espèces possèderaient des éléments ressemblant au cytosquelette qui assurent le maintien de ces formes (Trachtenberg, 2006; Balish, 2006). Par exemple, les spiroplasmes produisent une protéine de 59 kDa appelée *fib* qui est responsable de leur forme hélicoïdale (Jacob *et al.*, 1997). Chez *M. pneumoniae*, plusieurs protéines dont celles désignées HW1-3 sont impliquées dans sa morphogénèse filamenteuse. Ces protéines participent également à la formation des structures en forme d'embouts «tip organelles» qui permettent à ce microorganisme d'adhérer aux cellules de l'hôte (Rottem, 2003). Quant aux cellules de *M. hyopneumoniae*, elles sont de forme ronde ou ovale, d'un diamètre moyen de 200 à 500 nm, et sont entourées par une capsule polysaccharidique qui assurerait une fonction anti-phagocytaire (Tajima *et al.*, 1985).

La plupart des *Mollicutes* sont anaérobiques facultatifs. Ils utilisent comme source principale d'énergie le métabolisme du glucose ou de l'arginine (genre *Mycoplasma*) ou encore de l'urée pour le genre *Ureaplasma* (Smith *et al.*, 1993; Razin *et al.*, 1998).

1.3. Aspect génomique

Depuis les dix dernières années, les séquences génomiques de *Mollicutes* ont été abondamment publiées : *M. genitalium* (Fraser *et al.*, 1995), *M. pneumoniae* (Himmelreich *et al.*, 1996), *U. urealyticum* (Glass *et al.*, 2000), *M. pulmonis* (Chambaud *et al.*, 2001), *M. penetrans* (Sasaki *et al.*, 2002), *M. hyopneumoniae* (Minion *et al.*, 2004, Vasconcelos *et al.*, 2005), *M. mycoides* (Westberg *et al.*, 2004). Tous ces génomes sont remarquables par leur petite taille comprise entre 500 et 1500 kpb. Le génome de *M. genitalium* (500 kpb) est le plus petit génome bactérien connu à l'heure actuelle. Il existe une certaine hétérogénéité génétique à l'intérieur d'une même espèce. Par exemple chez *M. hyopneumoniae*, une variabilité au niveau de la taille du génome a été constatée entre les souches J (897,405 pb), 7448 (920,079 pb) et 232 (892,758 pb). Cette variabilité est principalement due à la présence des séquences répétées dont le nombre et la taille varient entre ces souches (Minion *et al.*, 2004 ; Vasconcelos *et al.*, 2005). Elle se manifeste également au niveau de l'expression des protéines où une différence de 25 à 30%, en termes de nombre total des protéines exprimées, peut être observée entre différentes souches (Calus *et al.*, 2007).

Tel que déjà mentionné, les génomes des *Mollicutes* sont aussi caractérisés par leur richesse en adénine (A) et thymidine (T). En fait, ceux-ci ne comprennent qu'entre 23 et 41% de G+C tandis que chez les autres bactéries ce pourcentage est compris entre 25 et 70%. On pense que cette prédominance en A et T est à l'origine d'une pression évolutive qui a conduit les *Mollicutes* (sauf les acholeplasmes et les spiroplasmes) à ne pas utiliser le code génétique universel (Razin *et al.*, 1998). En effet, ils utilisent le codon stop universel TGA comme tryptophane (Peterson *et al.*, 1997). De ce fait, il est indispensable de muter les codons TGA afin d'exprimer les gènes qui en contiennent

dans un système hétérologue, comme par exemple *Escherichia coli* (Inamine *et al.*, 1990, Cheikh Saad Bouh *et al.*, 2003). Contrairement aux autres procaryotes, les *Mollicutes* contiennent peu de codons GGN, CCN, GCN et CGN et, par conséquent, peu de protéines riches en glycine, proline, alanine et en arginine.

Les *Mollicutes* se distinguent aussi par l'absence de nombreux gènes qui sont retrouvés chez la plupart des bactéries à paroi. À titre d'exemple, *M. pneumoniae* ne possède que 677 gènes contre 1703 chez *Hemophilus influenzae* et contre 4288 gènes chez *E. coli* (Razin *et al.*, 1998). Ces gènes manquants sont, entre autres, ceux impliqués dans la biosynthèse des acides aminés essentiels, de la biosynthèse de la paroi et de ceux codant pour les enzymes du cycle de Krebs. En revanche, les mycoplasmes comme *M. pneumoniae* et *M. genitalium* disposent de nombreux gènes codant pour des protéines impliquées dans leur adhérence aux cellules de l'hôte. Ce qui implique que l'évolution des mycoplasmes les a conduits à adopter un mode de vie parasitaire, lequel est fondé sur la captation des ressources nutritives de l'hôte. D'où la difficulté à les cultiver *in vitro* (Razin *et al.*, 1998).

1.4. Croissance *in vitro*

Les *Mollicutes* peuvent être cultivés sur des milieux acellulaires mais ils exigent des milieux complexes ou bouillon de culture. En général, ces milieux de croissance contiennent de fortes concentrations de sérum (environ 20%) et d'extrait de levure. Ceci complique la compréhension de leurs voies métaboliques des ces microorganismes ces milieux fournissent directement dans leur composition presque la totalité des métabolites nécessaires. À l'exception des espèces du genre *Acheloplasma*, la plupart des *Mollicutes* ont besoin du cholestérol, lequel aide à stabiliser la membrane plasmique, et des acides gras dans leur milieu de croissance (Razin *et al.*, 1998).

Leur croissance est difficile et de durée variable selon les espèces et même selon les souches. En milieux liquides, les *Mollicutes* sontensemencés en faisant des

dilutions décimales pour éliminer des inhibiteurs tissulaires et éventuellement faire une étude quantitative (Bébéar et Bébéar, 2007). Les milieux gélosés sont ensemencés en touche et l'incubation a lieu de préférence en atmosphère humide à 5% de CO₂. La plupart des espèces forment de très petites colonies Observables en microscopie à contraste de phase ou électronique et qui ont un aspect « d'œufs sur le plat ou d'œufs frits » avec une zone centrale opaque et une zone périphérique étendue. Cela est due au fait que les bactéries ont tendance à pénétrer dans la gélose ; le centre de la colonie apparait donc foncé que la périphérie d'où les bactéries sont plus en surface (Razin *et al.*, 1998).

En ce qui concerne la culture de *M. hyopneumoniae*, c'est le milieu PPLO «pour *Pleuropneumonia-Like Organisms*» ou de Friss (Friss, 1975) modifié qui sont les plus utilisés. L'isolement primaire de ce mycoplasma peut nécessiter 7 à 30 jours d'incubation, sous une atmosphère riche en CO₂ (Kobisch et Friis, 1996). Sa culture en milieu liquide se fait dans un milieu supplémenté de glucose et de rouge de phénol comme un indicateur de la croissance. La croissance de *M. hyopneumoniae* cause l'acidification du milieu, ce qui se traduit par le changement de la couleur rouge du milieu (due au rouge de phénol) en jaune-orangé. Une récente étude rapporte que les souches plus virulentes de *M. hyopneumoniae* poussent relativement plus vite que les souches moins virulentes (Meyns *et al.*, 2007).

À cause de leur faible croissance, les *Mollicutes* ne troublent généralement pas le milieu de culture. Cette propriété associée à leur petite taille (filtrable avec des filtres de porosité 0,2 µm) fait d'eux les plus importants contaminants de cultures cellulaires (Wang *et al.*, 2004). Les plus retrouvées dans les cultures cellulaires sont : *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. hyorhinitis*, *M. orale*, and *A. laidlawii* (Ossewaarde *et al.*, 1996 ; Tang *et al.*, 2000). Ces espèces n'induisent aucune apparence particulière et seuls des tests spécifiques peuvent en détecter la présence. Toutefois, on peut observer lorsque les cellules sont contaminées par ces microorganismes un changement du métabolisme

cellulaire, une diminution la prolifération cellulaire et l'acidification du milieu de culture (Wang *et al.*, 2004).

2. Particularités de *Mycoplasma hyopneumoniae*

M. hyopneumoniae fait partie de l'ordre *Mycoplasmatales* et la famille des *Mycoplasmataceae*. Elle est l'agent étiologique de la PEP aussi connue sous le nom de broncho-pneumonie enzootique. Cet agent pathogène a été isolé pour la première fois dans les années 1960 (Mare et Switzer, 1965), et depuis, il sévit continuellement dans les élevages porcins à travers le monde.

2.1. Importance économique et épidémiologie

La PEP est une affection respiratoire chronique qui est retrouvée chez les porcs à tout moment de leur stade de développement (Ross, 1992). Vu son importance, elle est actuellement classée parmi les maladies porcines à surveiller par le MAPAQ (Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec) et la FPPQ (Fédération des producteurs de porcs du Québec). Toutefois, on ne dispose pas de données précises sur l'impact économique de la PEP au Québec et dans les autres provinces du Canada. Par ailleurs, aux États-Unis d'Amérique, il a été rapporté que cette maladie occasionne des pertes économiques de plus de 300 M\$/an (Thacker *et al.*, 2006). Ces pertes sont associées à la baisse des performances zootechniques (par exemple la réduction du gain moyen de poids (GMP) et à l'augmentation des coûts de médication pour combattre non seulement *M. hyopneumoniae* mais aussi celle d'autres agents pathogènes porcins dont il peut exacerber le pouvoir pathogène (Thacker, 2006). En effet, *M. hyopneumoniae* peut causer une réduction GMQ de 2,8 à 44,1% dépendamment de la virulence de la souche impliquée et des conditions d'élevage (Straw *et al.*, 1989). Ce ralentissement de croissance a pour conséquence directe une augmentation de l'âge des animaux à l'abattage de plusieurs jours, ce qui engendre des coûts additionnels de

production à l'engraissement par animaux et, par conséquent, des pertes économiques qui peuvent atteindre plusieurs milliers de dollars.

La crainte de la présence de *M. hyopneumoniae* dans les élevages porcins est surtout due au fait qu'il peut potentialiser d'autres infections. En effet, il est considéré comme un agent pathogène qui joue un rôle central dans le PRDC dans la mesure où sa présence est souvent associée à celle d'autres agents pathogènes comme *Pasteurella Multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*(APP), VSRRP et CVP-2 (Thacker, 2006). L'APP est l'agent responsable de la pleuropneumonie du porc. Il est avec *M. hyopneumoniae* parmi les bactéries qui causent le plus de dommages dans l'industrie porcine. L'APP produit des cytotoxines, désignées ApxI, ApxII et ApxIII, qui affaiblissent le système immunitaire et causent des dommages tissulaires (Bossé *et al.*, 2002). Une récente étude, basée sur un modèle de co-infection de porcs suggère que *M. hyopneumoniae* exacerbe l'infection de l'APP (Marois *et al.*, 2009).

D'autres études expérimentales, également été basées sur les modèles de co-infection, ont démontré que *M. hyopneumoniae* majore les signes cliniques et les lésions macroscopiques et microscopiques ainsi que la réponse pro-inflammatoire associés au VSRRP (Thacker *et al.*, 1999, Thanawongnuwech *et al.*, 2001). Ce virus est responsable du SRRP qui est sans contredit la maladie virale la plus importante dans l'industrie porcine à travers le monde. Elle occasionnerait des pertes économiques chiffrées à plusieurs millions de dollars /an rien qu'aux États-Unis (Zimmermann *et al.*, 2006). Le SRRP se manifeste par des avortements, une augmentation des porcelets mort-nés et de la mortalité dans les troupeaux reproducteurs, ainsi que des problèmes respiratoires importants surtout chez les jeunes porcelets (Rossow, 1998). Il est également suggéré que *M. hyopneumoniae* exacerbe les pathologies dues au CVP-2 (Opriessnig *et al.*, 2006), lequel est directement associé au syndrome de dépérissement en post-sevrage (SDPS) chez les porcs (Maes *et al.*, 2008).

La PEP est l'une des maladies les plus répandues dans la production porcine; on estime que près de 80% d'élevages à travers le monde sont infectés par l'agent pathogène (Maes *et al.*, 2008). Elle se transmet principalement par voie horizontale suite à l'introduction d'un porc porteur et excréteur dans la ferme (Marois *et al.*, 2007, Vicca *et al.*, 2003). Une transmission via les aérogènes, sur une distance minimale de 3.2 km, serait également possible (Goodwin, 1985). La persistance de la PEP dans un élevage est attribuable aux truies qui contaminent les porcelets dans le cas d'un élevage naisseur-finiisseur. La persistance de la PEP dans les élevages est aussi due à la présence des animaux porteurs mais asymptomatiques et qui, par conséquent, jouent le rôle de réservoir de *M. hyopneumoniae* (Calsamiglia *et al.*, 1999).

2.2. Symptômes de la pneumonie enzootique porcine

Les porcs infectés par *M. hyopneumoniae* présentent une légère hyperthermie et de la toux sèche non reproductive qui peut perdurer pendant plusieurs semaines. Cette toux se manifeste généralement après une période d'incubation variant de 2 à 4 semaines (Kobisch et Friis, 1996). L'infection ne cause généralement pas de mortalité au sein du troupeau, mais peut se manifester par un haut taux de morbidité. Les animaux gravement touchés manifestent une perte de croissance ou du gain de poids moyen quotidien (GMQ) par rapport aux autres. L'évolution de la maladie est généralement d'allure chronique et est influencée par plusieurs facteurs incluant la virulence des souches, le statut génétique des animaux, la présence d'autres agents pathogènes et les méthodes d'exploitation de la ferme (Sibila *et al.*, 2004 ; Meyns *et al.*, 2007).

M. hyopneumoniae induit une pneumonie catarrhale affectant généralement les lobes antérieurs mais, en cas de surinfections, tous les lobes pulmonaires du porc peuvent être affectés. Ainsi, un exsudat de type séreux peut être observé dans la trachée, les bronches et les bronchioles. Les lésions pulmonaires macroscopiques apparaissent généralement à partir de la quatrième semaine post-infection et cicatrisent

au cours de l'évolution de la maladie. Durant la cicatrisation, on observe de profonds sillons cicatriciels et une hépatisation de couleur rouge (Kobisch et Friss, 1996). Lors de la phase aiguë de l'infection, les examens histologiques montrent une pneumonie interstitielle caractérisée par des infiltrats septaux péribronchiques et périvasculaires contenant des cellules mononuclées (Kwon *et al.*, 2002). Au cours de la phase chronique ou de cicatrisation, on remarque la présence de nodules volumineux de tissu lymphoréticulaire qui comprime la lumière bronchiolaire (Kobisch et Marois, 2008). Il semblerait que la cinétique de l'apparition et la sévérité de ces lésions serait dépendante de la virulence des souches et du statut sanitaire des animaux (absence ou présence d'infections secondaires) (Vicca *et al.*, 2003).

Tel qu'illustré à la **figure 1**, *M. hyopneumoniae* cause la perte progressive des cils suivi d'une désquamation des cellules épithéliales respiratoires au niveau desquelles il adhère (DeBey et Ross, 1994). L'un des mécanismes suggéré pour expliquer ces phénomènes serait la disruption des canaux ioniques. Celle-ci résulterait en une augmentation de la concentration du Ca^{2+} dans les cellules épithéliales. Ce mécanisme est dépendant d'un récepteur couplé à la protéine G qui en stimulant la voie de phospholipase C provoque la sortie du Ca^{2+} du réticulum endoplasmique et ainsi son accumulation dans le cytoplasme des cellules épithéliales (Park *et al.*, 2002). Récemment, Hwang *et al.*, (2006) ont décrit que cette augmentation du Ca^{2+} dans les cellules épithéliales porcines ne serait pas dépendante de l'adhérence de *M. hyopneumoniae*. En effet, ces auteurs ont observé *in vitro* que l'inhibition de l'adhérence du mycoplasme par un antisérum ne réduit pas de façon significative la production du Ca^{2+} . Toutefois, il n'a pas été précisé si cette inhibition de l'adhérence a été complète ou partielle. Alors, ces mêmes auteurs pensent que l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire serait provoquée par un facteur soluble. Une lipoprotéine (mhp379) de 33 kDa a été suspectée comme un tel facteur en raison du fait que son activité exonucléasique est dépendante du Ca^{2+} (Schmidt *et al.*, 2007).

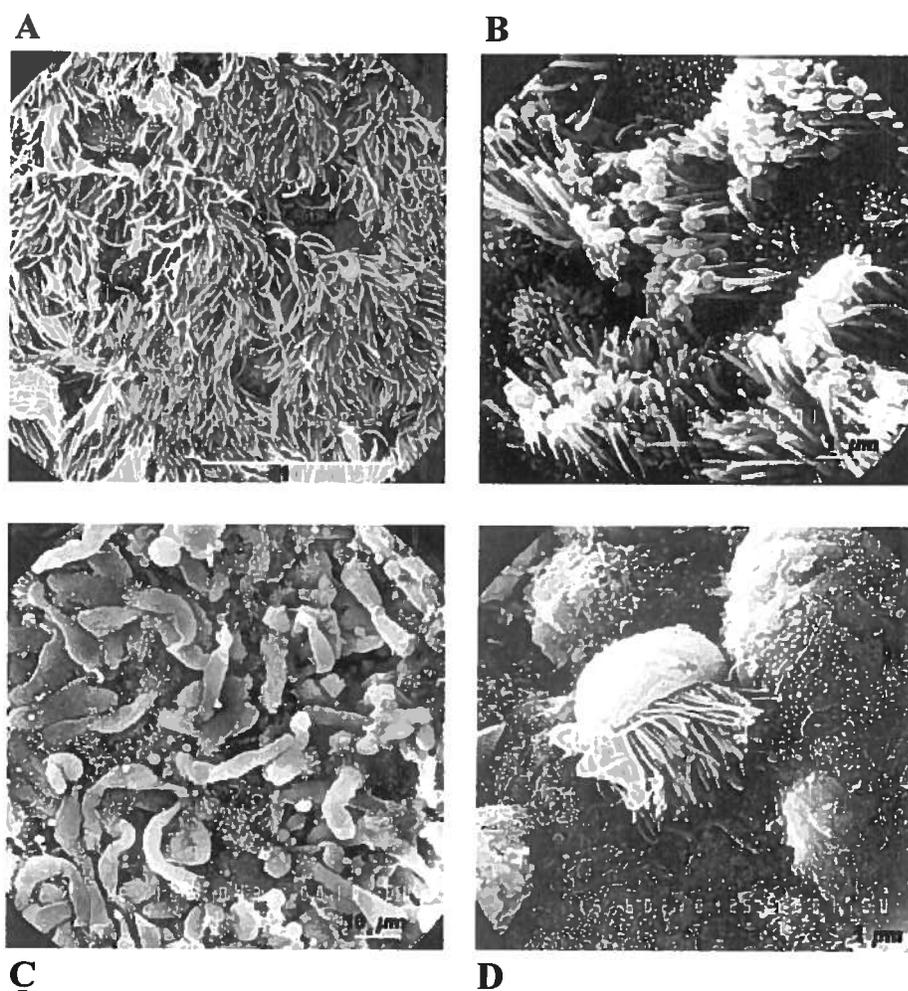


Figure 1. Observation par microscopie électronique à balayage de la trachée de porcs infectés par *M. hyopneumoniae*. Le cliché A montre les cils vibratiles des cellules ciliées de l'épithélium trachéal, ainsi que des cellules à microvillosités chez un porc sain. Les clichés B, C et D montrent les cellules épithéliales ciliées infectées par *M. hyopneumoniae* 3 semaines post-infection (B) où on observe des mycoplasmes à l'apex des cils vibratiles, et 5 semaines post-infection (C et D) où on observe une désquamation des cellules ciliées et la disparition des cils. Tirée de Kobisch et Marois, 2008.

2.3. Diagnostic

- **Diagnostic clinique et nécropsique:** une toux sèche et quinteuse, une diminution du GMQ, un faible taux de mortalité et un fort taux de morbidité sont des indicateurs cliniques qui peuvent orienter le clinicien vers l'infection à *M. hyopneumoniae*. Le diagnostic nécropsique porte essentiellement sur l'examen des lésions pulmonaires macroscopiques et s'effectue le plus souvent à l'abattoir. Il est important dans la mesure où il donne un reflet direct sur l'état sanitaire du troupeau et incite à la mise en place de mesures de contrôle. L'examen des poumons se fait généralement par un contrôle visuel et une palpation du parenchyme. Ainsi, selon la grille de quantification de lésions pulmonaires macroscopiques utilisée, il est possible d'attribuer une note de 0 à 4 décrivant l'étendue et/ou la sévérité des lésions pulmonaires. Il est aussi possible de quantifier directement les lésions en attribuant un pourcentage globale à chacun des lobes pulmonaires et ainsi déduire le pourcentage total de lésions pulmonaires observées (Sorensen *et al.*, 2006).

- **Diagnostic bactériologique:** ce type de diagnostic débute par la culture de l'agent pathogène isolé à partir d'écouvillons nasaux, des lavages broncho-alvéolaires (LBA) ou de tissus pulmonaires. Cette méthode n'est cependant pas compatible avec un diagnostic de routine, pour la simple raison que la croissance de *M. hyopneumoniae* est très lente et requiert un milieu de culture complexe. De plus, d'autres mycoplasmes qui sont également retrouvés chez le porc, tels que *M. hyorhinis* et *M. flocculare*, peuvent compliquer son isolement (Kobisch et Friis, 1996).

- **Diagnostic immunologique:** le diagnostic de routine de *M. hyopneumoniae* est basé sur la technique ELISA ou immuno-empreinte (diagnostic sérologique). Il cherche à détecter les anticorps, essentiellement les IgG, produits chez les porcs infectés par l'agent pathogène dans le sérum. Ces anticorps peuvent aussi être décelés dans le colostrum et le LBA (Sorensen *et al.*, 1992; Rautiainen *et al.*, 2000). Le principal avantage de cette approche est qu'elle peut se faire sur un grand nombre d'échantillons

et qu'elle est rapide. De plus, plusieurs trousse ELISA sont disponibles commercialement. Il présente cependant des inconvénients tels que le délai de lent de séroconversion (Murphy *et al.*, 1993) et la possibilité d'avoir de faux positifs est grande, en raison du fait que *M. hyopneumoniae* partage des déterminants antigéniques avec d'autres mycoplasmes porcins (Freeman *et al.*, 1984). Ce problème peut cependant être évité en utilisant une seule protéine spécifique et conservée de l'agent pathogène comme antigène dans le test ELISA (Feld *et al.*, 1992 ; Futo *et al.*, 1995).

Il est aussi possible de diagnostiquer *M. hyopneumoniae* par immunofluorescence à partir de coupes minces de tissus pulmonaires. Dans ce cas, les échantillons à analyser sont marqués par un antisérum (IgG, IgM) couplé à un fluorochrome, et la présence de l'agent pathogène est alors révélée sous forme d'un liseré fluorescent sur l'épithélium bronchiolaire (L'Ecuyer et Boulanger, 1970). Les inconvénients majeurs de cette approche sont qu'elle ne peut être effectuée que *post mortem*, et peut également fournir de faux positifs.

- **Diagnostic moléculaire:** Artiushin *et al.*, (1993) ont démontré pour la première fois qu'il est possible de détecter *M. hyopneumoniae* et de le différencier des autres mycoplasmes porcins par la PCR. Les amorces utilisées ont permis d'amplifier un fragment de 200 pb du gène de l'ARNr 16S à partir de l'ADN génomique *M. hyopneumoniae* et non de *M. hyorhinis* et de *M. flocculare*. Toujours avec les amorces ciblant le gène de l'ARNr 16S, Baumeister *et al.*, (1998) ont détecté *M. hyopneumoniae* dans les LBAs et observé une bonne corrélation entre les résultats de PCR et ceux de l'immunofluorescence. Une PCR imbriquée ou emboîtée « nested PCR » a été développée pour dépister *M. hyopneumoniae* dans les écouvillons nasaux. Cette PCR nécessite peu d'ADN et est basée sur l'utilisation combinée de 2 paires d'amorces (Calsamiglia *et al.*, 1999, 2000). D'après ces auteurs, cette approche fournit un taux de succès supérieur à 50%. La PCR imbriquée a été aussi utilisée avec succès pour déceler le mycoplasme dans les lavages trachéo-bronchoalvéolaires (Stark *et al.*, 1998; Verdin *et al.*, 2000). Cependant, étant plus sensible que la PCR classique, cette technologie est

susceptible de fournir de faux positifs (Stakenborg *et al.*, 2006). D'autres techniques de PCR comme la PCR multiplex (Stakenborg *et al.*, 2006) ou en temps réel « real-time PCR » (Dubosson *et al.*, 2004 ; Strait *et al.*, 2008) sont également mises à profit pour le diagnostic de *M. hyopneumoniae*.

2.4. Pathogénèse de *M. hyopneumoniae*

Peu de choses sont connues sur les mécanismes de pathogénèse de *M. hyopneumoniae*. Néanmoins, comme pour beaucoup d'autres mycoplasmes, ces mécanismes comprennent son adhérence aux cellules hôtes et sa capacité à moduler et à éviter les réponses immunitaires du porc (Razin *et al.*, 1998).

2.4.1. Adhérence aux cellules de l'hôte

Pour la plupart des bactéries, l'adhérence aux cellules hôtes constitue la première étape de l'infection et de la colonisation du tractus respiratoire. Elle résulte de l'interaction des protéines bactériennes appelées adhésines avec leurs récepteurs exprimés à la surface de cellules de l'hôte (Patti et Hook, 1994). C'est un processus qui peut être multifactoriel c'est-à-dire qui peut impliquer plusieurs protéines de surfaces ou adhésines. Par exemple, chez *P. multocida* au moins 4 types d'adhésines interagissent avec les composants de la matrice extracellulaire des cellules hôtes (Mullen *et al.*, 2008). Plusieurs adhésines ont été également identifiées chez *Staphylococcus aureus* (Clarke et Foster, 2006). Chez les mycoplasmes, la complexité du processus d'adhérence est bien illustrée chez *M. pneumoniae*. Tel que mentionné précédemment, ce mycoplasme forme des structures en forme d'embouts où sont localisées plusieurs protéines impliquées dans l'adhérence (**figure 2**). Les protéines désignées P40 et P90 sont intimement associées et jouent le rôle d'adhésines principales, tandis que celles désignées HMW1 et 3 sont des adhésines accessoires (Rottem *et al.*, 2003 ; Willby *et al.*, 2004). La perte de l'une d'entre elles résulte en des phénotypes peu ou non adhérents (Popham *et al.*, 1997).

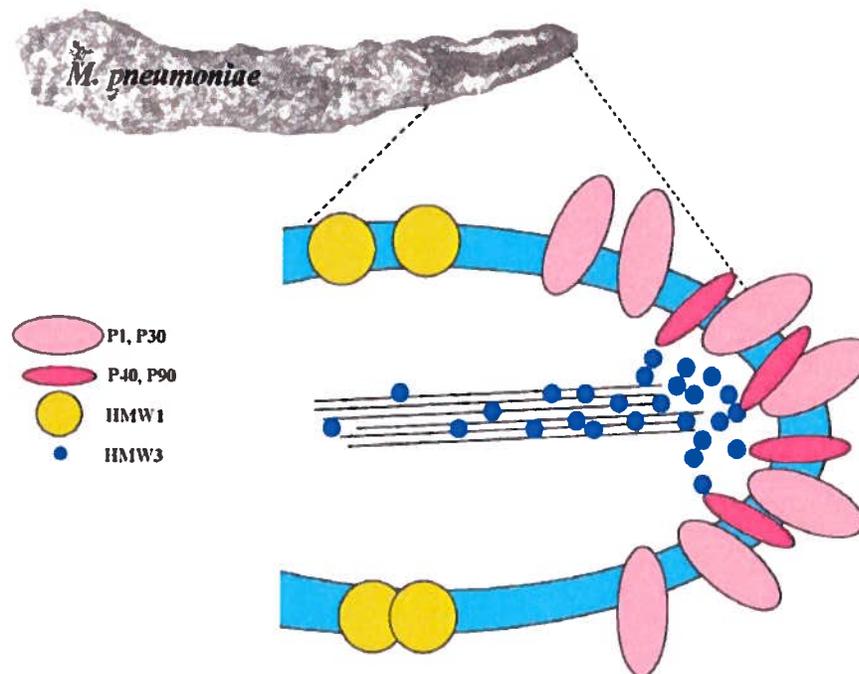


Figure 2. Représentation schématique de la structure d'adhérence en forme d'embout « tip organelle » de *M. pneumoniae*. Les différentes adhesines qui sont directement (P1 et P30) ou indirectement (P40, P90, HMW1 et 3) impliquées dans l'adhérence du microorganisme aux cellules de l'hôte sont indiquées en différentes couleurs. Les bâtonnets représentent les microtubules. La membrane plasmique est en bleu ciel. Tirée de Rottem, 2003.

Contrairement à *M. pneumoniae*, *M. hyopneumoniae* n'élabore pas de structures d'adhérence particulières (Zielinski, et. Ross, 1993). Plusieurs protéines sont suspectées comme étant des adhesines. À ce jour, seule une d'entre elles désignée P97 a été la mieux caractérisée. Il s'agit en réalité d'une protéine qui a un poids moléculaire supérieur à 97 kDa mais qui est ainsi nommée en raison de sa migration au même niveau qu'une protéine d'environ 97 kDa sur un gel SDS-PAGE « pour *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*» (Zhang *et al.*, 1995 ; Hsu *et al.*,

1997). La P97 est synthétisée sous forme d'une pré-protéine qui est clivée au niveau de l'acide aminé 195 pour générer la P97 (Djordjevic *et al.*, 2004). Selon ces auteurs, la P97 est rarement sous sa forme complète à la surface du mycoplasme. Elle subit également d'autres clivages post-traductionnels et les fragments protéiques résultants sont dispersés le long de la membrane du mycoplasme. L'importance des modifications dans l'adhérence ou la pathogénèse de *M. hyopneumoniae* n'est pas connue.

Tel que schématisé à la **figure 3**, la P97 contient dans sa portion C-terminale deux régions, désignées RR1 et RR2, qui contiennent des motifs répétés (Hsu et Minion, 1998^b). Le nombre de ces motifs répétés varie selon les souches de *M.* (Stakenborg *et al.*, 2006). La région RR1 qui est composée de motifs AAKPV(E) et serait directement impliquée dans l'adhérence ; au moins 7 répétitions de motif AAKPV(E) y sont requises (Hsu et Minion, 1998^a, Minion *et al.*, 2000). La région RR2 comprend les motifs GAE(S)PN(S)QGKKAЕ et interagirait avec les composants de la matrice extracellulaire comme l'héparine sulfate (Jenkins *et al.*, 2006).

La P97 a été identifiée comme une adhésine sur la base du fait que les anticorps dirigés contre la région RR1 inhibent l'adhérence *M. hyopneumoniae* aux cellules épithéliales respiratoires porcines *in vitro* (Zhang *et al.*, 1995). Toutefois, les mêmes auteurs ont constaté que cette inhibition n'est que partielle, suggérant que d'autres protéines sont aussi impliquées dans le processus d'adhérence du microorganisme. Ainsi, une protéine de 102 kDa (P102) est aussi considérée comme une candidate car elle est exprimée en opéron avec la P97 (Hsu et Minion, 1998^b). Elle serait impliquée dans l'adhérence de *M. hyopneumoniae* en interagissant directement avec les cellules hôtes ou en supportant l'activité de la P97 (Adams *et al.*, 2005). Une autre adhésine potentielle serait la P110. Celle-ci est composée d'une sous-unité de 54 kDa et de deux sous-unités de 28 kDa. Il a été observé que les anticorps anti-P110 réduisent l'adhérence du mycoplasme aux cellules cibles *in vitro* (Chen *et al.*, 1998). Plus récemment, une protéine nommée P159 a été considérée comme une candidate sérieuse. Comme la P97, elle subit des clivages post-traductionnels et les produits des clivages

sont aussi localisés à la surface membranaire de *M. hyopneumoniae*. De plus, elle se lie également à l'héparine sulfate et augmente l'adhérence du microorganisme à la ligne cellulaire PK15 (lignée de cellules épithéliales porcine) (Burnett *et al.*, 2006).

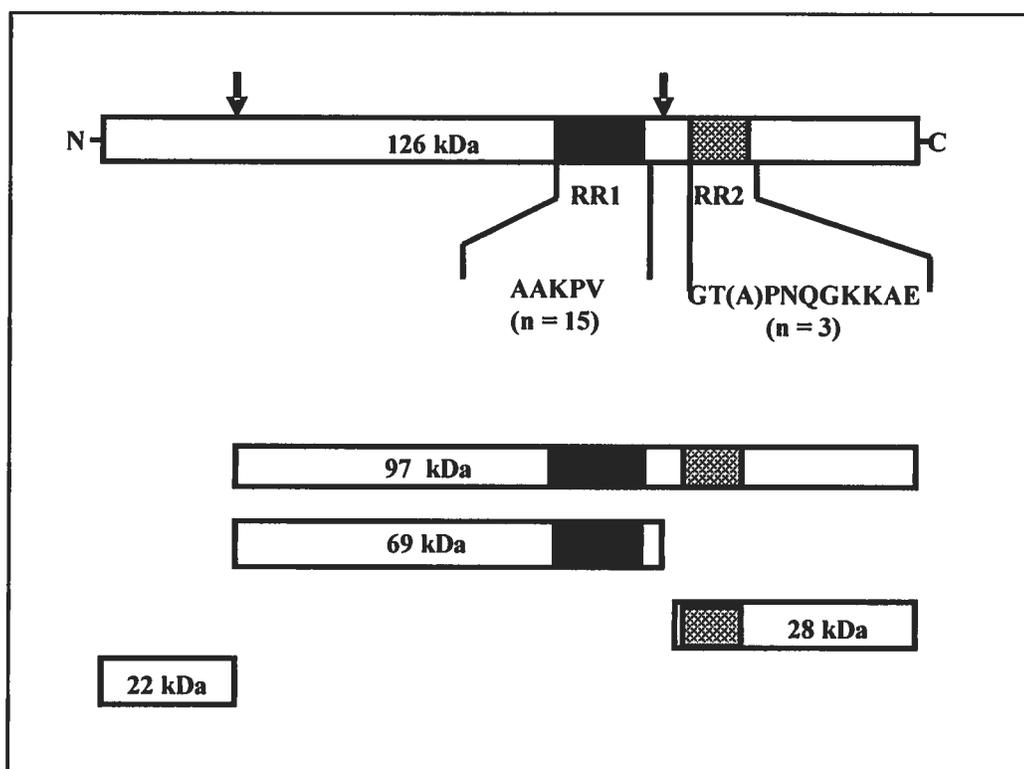


Figure 3. Organisation de l'adhésine P97 de la souche 232 de *M. hyopneumoniae*.

La protéine est produite sous forme d'une pré-protéine de 126 kDa qui subit des modifications post-traductionnelles en N et C-terminale pour générer des polypeptides 22, 28 et 66 et 97 kDa). Cette protéine contient deux régions répétées, RR1 et RR2 (les unités de répétitions sont montrées). Les flèches indiquent les sites de clivage. Aadaptée de Djordjevic *et al.*, 2004.

2.4.2. Interaction avec le système immunitaire

Comme la plupart des autres mycoplasmes, l'infection à *M. hyopneumoniae* suscite une réponse immunitaire. Paradoxalement, cette réponse n'est pas incapable de contrôler l'infection puis qu'elle est d'allure chronique. En générale, les infections à mycoplasme ont un double effet sur le système immunitaire: sur-activation et immunosuppression, ce qui provoquerait des pathologies associées (Razin *et al.*, 1998).

2.4.2.1. Immunité non spécifique

Durant l'infection à *M. hyopneumoniae*, on observe une réduction des macrophages et une accumulation des neutrophiles dans les LBAs (Okada *et al.*, 2000, Sarradell *et al.*, 2003). Il semblerait que cet agent pathogène soit aussi capable d'inhiber la phagocytose (Asai *et al.*, 1996). Il a été suggéré que cette inhibition pourrait être liée à la forte production de prostaglandine E₂ (PGE₂) qui observée dans les LBAs des animaux infectés par l'agent pathogène (Muneta *et al.*, 2006). En effet, cette la PGE₂ est bien connue comme un supprimeur de la phagocytose (Sergeeva *et al.*, 1997). Par ailleurs, elle favorise la réponse immunitaire de type Th2 et inhibe la celle de type Th1 (Betz et Fox; 1991). Elle aussi connue comme stimulatrice de la production de cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-18 (Demeure *et al.*, 1997). Cette cytokine a été directement associée à la persistance des infections certaines bactéries pathogènes telle comme *Listeria monocytogenes* (Matthias *et al.*, 2008).

Il y a de plus en plus d'évidences qu'une part de la pathogénèse des mycoplasmes est attribuée à une forte réponse inflammatoire (Razin *et al.*, 1998). Dans les LBAs des porcs infectés par *M. hyopneumoniae*, on dénote une forte sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-18 et le TNF- α . La production de TNF- α corrèle avec l'activation des macrophages alvéolaires (Muneta *et al.*, 2003). L'implication de cette cytokine dans la pathogénèse de *M. hyopneumoniae* a été suggérée suite à l'observation que la réduction des lésions pulmonaires chez les porcs vaccinés s'accompagne également de la baisse du niveau de TNF- α dans les LBAs

(Okada *et al.*, 2000). Le TNF- α est aussi connu pour stimuler l'activité cytotoxique des macrophages, des lymphocytes T CD8⁺ et des cellules NK. Cette activité cytotoxique serait responsable des lésions pulmonaires associées aux infections à mycoplasmes (Razin *et al.*, 1998). Le TNF- α stimule également la production d'IL-8, une chimiokine impliquée dans le recrutement des neutrophiles (Kobayashi, 2006), lesquels causeraient l'obstruction des voies respiratoires lors de l'infection par *M. hyopneumoniae* (Sarradell *et al.*, 2003).

2.4.2.2. Immunité spécifique

L'immunité spécifique induite par *M. hyopneumoniae* met en jeu à la fois les lymphocytes B et T. Lors d'infections expérimentales, cellules ainsi que les plasmocytes sont observés dans les BALT (bronchus-associated lymphoid tissue) (Messier *et al.*, 1990; Sarradell *et al.*, 2003). Les plasmocytes sécrétant d'IgA sont majoritairement localisés dans le tractus respiratoire inférieur, alors que ceux produisant les IgG sont principalement présents dans le tractus respiratoire supérieur (Sarradell *et al.*, 2003). Les anticorps anti-mycoplasme sont également détectés dans le sang, mais la séroconversion est lente indiquant que l'organisme est peu immunogène ou inhibe la réponse immunitaire de l'hôte. Il a été suggéré que les IgG et IgA participent à l'opsonisation de *M. hyopneumoniae* et facilitent son élimination (Marshall *et al.*, 1995). En revanche, d'autres auteurs pensent que la réponse humorale ne joue qu'un rôle limité dans la protection contre cet agent pathogène, car il persiste dans les BALT en dépit de la présence d'IgG et d'IgA (Simecka, 2005; Djordjevic *et al.*, 1997).

Suite à l'infection par *M. hyopneumoniae*, on observe une augmentation marquée des cellules T CD4⁺ et une réduction des cellules T CD8⁺ dans les LBAs (Sarradell *et al.*, 2003). Cette activation excessive des lymphocytes T CD4⁺ pourrait jouer un rôle important dans la pathogénèse du mycoplasme. En effet, chez la souris, il a été constaté que la déplétion des cellules T CD4⁺ réduit et retarde la pneumonie causée par *M.*

pulmonis. En revanche, celle des cellules T CD8⁺ favorise la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et exacerbe la pneumonie (Jones *et al.*, 2002). Il a été également observé que la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ chez les porcs réduit la sévérité des lésions pulmonaires causées par *M. hyopneumoniae* suggérant que ces cellules pourraient être impliquées dans sa pathogénèse (Tajima *et al.*, 1985).

Certaines études avancent que *M. hyopneumoniae* inhibe la réponse à médiation cellulaire. Cette hypothèse est basée sur le fait les PBMCs « pour *Peripheral Blood Mononuclear Cells* » provenant des porcs infectés par *M. hyopneumoniae* prolifèrent moins en présence d'un mitogène comme la concanavaline A que celles de animaux non infectés (Kishima et Ross, 1985 ; Fagan *et al.*, 1996). Des études rapportent aussi que *M. hyopneumoniae* peut avoir une activité mitogénique non spécifique sur les lymphocytes T et B (Messier *et al.*, 1990 ; 1991). Une telle stimulation de cellules immunitaires serait la cause des pathologies dues aux Mollicutes de lésions au site d'infection B (Razin *et al.*, 1998).

2.4.2.3. Évasion du système immunitaire

Comme de nombreux agents pathogènes, les *Mollicutes* possèdent la capacité de modifier de façon itérative certains de leur antigènes, plus particulièrement les lipoprotéines (Razin *et al.*, 1998). Ce mécanisme de variation antigénique peut permettre la persistance de l'infection car le système immunitaire doit pour chaque nouvel antigène développer une nouvelle réponse. Ce phénomène est bien décrit *in vitro* chez *M. hyopneumoniae* (De Castro *et al.*, 2006) ainsi que chez d'autres mycoplasmes (Theiss *et al.*, 1993 ; Droesse *et al.*, 1995 ; Ma *et al.*, 2007). Toutefois, le lien avec l'évasion du système immunitaire n'est pas encore clairement établi.

La capacité de certaines espèces de *Mollicutes* à se loger dans les cellules hôtes non-phagocytaires a été démontrée (Rottem, 2003). Cela remet en cause le concept que les mycoplasmes soient strictement des parasites extracellulaires. Cette localisation

intracellulaire pourrait donc être un autre moyen efficace pour échapper à la réponse immunitaire de l'hôte et l'action des antibiotiques.

2.5. Mesures de lutte contre *M. hyopneumoniae*

L'élimination de *M. hyopneumoniae* est difficile et plusieurs mesures sont utilisées pour réduire la prévalence de cet agent pathogène dans les élevages afin de limiter les pertes économiques encourues.

2.5.1. Antibiothérapie

Il y a peu de principes actifs contre les *Mollicutes*. En raison de l'absence de paroi, ils sont naturellement insensibles aux β -lactames. Ils sont aussi insensibles aux sulfamides car ils ne synthétisent pas l'acide folique. De plus, ils sont également résistants à l'acide nalidixique (inhibe la réplication d'ADN des bactéries Gram -) et à la rifampicine car leur ARN polymérase diffère par sa structure de l'ARN polymérase des eubactéries (Thomas *et al.*, 2000 ; Mateusen *et al.*, 2001 ; Le Carrou *et al.*, 2006). Néanmoins, un certain nombre d'antibiotiques sont actifs contre *M. hyopneumoniae* et leur choix s'effectue en fonction de la voie d'administration, la biodisponibilité de la molécule dans l'appareil respiratoire, et de certaines conditions zootechniques.

Les macrolides et apparentés (tylosine, tiamuline, lincomycine etc...) inhibent la synthèse protéique : ils empêchent l'élongation de la chaîne peptidique en se fixant à la sous-unité 50S des ribosomes bactériens. Ce sont des antibiotiques bactériostatiques avec une grande affinité pour les sécrétions bronchiques et sont les plus utilisés contre *M. hyopneumoniae*. Ces antibiotiques peuvent être incorporés dans la moulée (Vicca *et al.*, 2005). Les tétracyclines (Chlortétracycline, oxytétracycline, doxycycline) sont aussi des inhibiteurs de la synthèse protéique. Ils semblent être efficaces aussi bien par voie orale que parentale (Bousquet *et al.*, 1998). Toutefois, une résistance de l'agent pathogène vis-à-vis de ces antibiotiques a été rapportée (Innato *et al.*, 1994, Vicca *et al.*, 2004, Stakenborg *et al.*, 2005).

Le moment où les antibiotiques sont administrés aux porcs conditionne en partie la réussite du traitement. Nous pouvons distinguer en gros deux schémas thérapeutiques : le premier dit classique, consiste à traiter les animaux lors de l'apparition des signes cliniques : plus le traitement est précoce par rapport au moment de l'infection, plus son efficacité est grande (Le Grand et Kobisch, 1996). L'association de plusieurs antibiotiques (macrolides et tétracyclines) est souvent réalisée et résulte en de meilleurs résultats. Le problème est que cela est coûteux pour les éleveurs et favorise l'apparition des souches résistantes (Stakenborg *et al.*, 2005, Le Carrou *et al.*, 2006). L'autre schéma thérapeutique est dit empirique ou traitement séquentiel «pulse dosing». Il est couramment pratiqué aux États-Unis et consiste à traiter tous les animaux sur de courtes périodes répétées (2-5 jours) durant la période d'engraissement. Cette approche réduirait les coûts de traitements et de permettrait aux animaux de développer une immunité vis-à-vis du mycoplasme (Walter *et al.*, 2000).

En dépit du fait que ses effets positifs en termes de réduction des pertes économiques causées par *M. hyopneumoniae*, l'usage des antibiotiques dans la nourriture d'animaux destinés au commerce soulève de plus en plus de questions auprès du public et des autorités réglementaires. De plus, l'antibiothérapie est très coûteuse et, ce faisant, bien souvent mal suivie par les éleveurs et difficile à mettre en place, en particulier dans les pays en voie de développement. Et, même un bon traitement n'élimine pas l'agent pathogène.

2.5.2. Mesures zootechniques et préventives

Les mesures zootechniques contre la PEP visent à optimiser les conditions environnementales et d'élevages afin de réduire au maximum les facteurs de risque et de minimiser l'expression de la maladie (Maes *et al.*, 2008). Ces mesures comprennent entre autres:

- l'évaluation systématique du statut sanitaire et sérologique du troupeau.
- la mise en quarantaine des animaux suspects ou positifs.

- la ségrégation d'animaux d'âge et d'origines différentes. Cela a pour but de minimiser le risque d'introduction de différentes souches de *M. hyopneumoniae* ainsi que d'autres agents pathogènes comme le VSRRP et CVP-2 qui peuvent concourir à l'expression du développement du PEP (Maes *et al.*, 2008).

- La réduction de la densité des troupeaux. Toutefois, les études portant sur cet aspect ont fourni des résultats contradictoires. En France, il a été observé qu'une densité animale trop grande augmente le risque de transmission de *M. hyopneumoniae* (Pointon *et al.*, 1985). En Norvège, une corrélation a été également notée entre la fréquence d'apparition de la PEP et la taille des troupeaux (Flesja et Solberg, 1984). Tandis qu'en Belgique, aucune corrélation n'a été observée (Maes *et al.*, 2001).

Les mesures préventives quant à elles visent à limiter la présence de *M. hyopneumoniae* dans les élevages. Différentes approches peuvent être employées : la première consiste à produire des animaux exempts d'organismes pathogènes spécifiques ou SPF « Specific Pathogen Free » ce qui implique que la mise-bas doit être effectuée par césarienne ou hystérectomie et l'élevage dans un milieu stérile (Twiehaus et Underdahl, 1975). Une autre approche est le système du tout plein, tout vide « all in, all out ». Celle-ci préconise de séparer les animaux en fonction de leur âge. Cette ségrégation réduit la transmission de l'agent pathogène des plus vieux aux plus jeunes et renforce l'homogénéité du troupeau (Clark *et al.*, 1989). Le système de sevrage précoce ou « Isowean » préconise quant à lui de sevrer les porcelets très tôt après la mise-bas et de les élever dans des sites isolés pour prévenir leur contamination (Harris *et al.*, 1990). Enfin, le système de sevrage hâtif médicamenteux ou MEW (*Medicated Early Weaning*) implique que, durant la gestation et immédiatement après la mise-bas, les truies soient traitées intensivement aux antibiotiques et que les porcelets soient séparés des truies, avant même la prise du colostrum, et maintenus sous antibiotiques pendant une période d'au moins 10 jours. Le système MEW est appliqué en Amérique du Nord. D'après certaines études, il prévient relativement bien l'établissement de l'infection par *M. hyopneumoniae* (Alexander *et al.*, 1980).

En définitive, la mise en place de ces mesures est lourde et requiert un encadrement technique et des coûts financiers considérables qui sont difficilement supportables par la plupart des éleveurs (Maes *et al.*, 2008). La vaccination est donc l'une des meilleures pistes indiquées pour parvenir à réduire la prévalence *M. hyopneumoniae* dans les élevages porcins.

2.5.3. Vaccination

2.5.3.1. Généralités

Le but de la vaccination est de permettre aux sujets vaccinés de développer une réponse immunitaire adaptative spécifique vis-à-vis d'un agent infectieux. Le type de la réponse induite prédominante, humorale (de type Th2) ou à médiation cellulaire (de type Th1), dépend du type de vaccin, de l'effet adjuvant et de la manière dont l'antigène est apprêté par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) pour ainsi être présenté aux cellules lymphocytaires (Levine et Szein, 2004). Quelque soit leur mode de préparation, on peut classer les vaccins en deux grandes catégories : les vaccins inertes ou tués et les vaccins vivants ou atténués.

Les vaccins inertes stimulent la réponse immunitaire en présentant l'antigène par la voie exogène. Dans ce cas, l'antigène est tout d'abord endocyté puis dégradé en peptides (d'environ 13 à 34 acides aminés) dans l'endosome de la cellule présentatrice d'antigènes (CPA). Par la suite, l'endosome fusionne avec une vésicule de l'appareil de Golgi contenant la molécule du CMHII ; dans l'endosome, la chaîne invariante *Ii* est dissociée de la molécule du CMHII et peut alors fixer le peptide antigénique. Après la fusion de la vésicule de Golgi avec la membrane plasmique cellulaire, le peptide antigénique est exposé la surface de la CPA puis reconnu par le TCR, pendant que la molécule du CMHI interagit avec la molécule CD4 qui est exprimée à la surface du lymphocyte T CD4⁺. Une fois activée, ce dernier sécrète les cytokines de type Th2 qui vont orienter la réponse immunitaire de préférence vers le type Th2 (Romagnani, 1997). Les vaccins inertes peuvent aussi stimuler une réponse de type Th1 lorsqu'ils

sont administrés en présence d'adjuvants qui favorisent ce type de réponse (Wales *et al.*, 2007). Il est à noter que certains vaccins internes comme ceux à ADN ne présentent l'antigène par voie endogène, comme le font les certains vaccins vivants, et stimulent une réponse immunitaire de type Th1 ou à médiation cellulaire.

En revanche, les vaccins vivants qui sont capables de pénétrer dans les CPA présentent l'antigène par la voie endogène. Par cette voie, l'antigène exprimé est dégradé en peptides (d'environ 8 à 10 acides aminés) dans le cytosol des CPA. Le peptide antigénique est ensuite transporté par la molécule TAP (pour *Transporter associated with Antigen Processing*) dans le réticulum endoplasmique où il est chargé sur la molécule du CMH I puis exposé à la surface cellulaire. Le complexe peptide /CMH I est reconnu par le complexe TCR/CD8 à la surface du lymphocyte T CD8+ qui est alors activé. Cette activation requiert la présence de molécules de co-stimulation portées par la CPA et le lymphocyte T CD8+ (Germain et Stefanova, 1999). Une fois activée, ce dernier se différencie en lymphocytes T cytotoxiques (CTL) grâce à l'aide apportée par les cellules T CD4+ de type Th1.

Les cellules CTL ont pour but d'éliminer les cellules infectées par un agent pathogène ou les cellules cancéreuses. Pour cela, ils utilisent plusieurs mécanismes. Tout d'abord, les cytokines (comme le TNF- α et l'INF- γ ayant une action cytotoxique) sont sécrétées à proximité des cellules cibles entraînant ainsi leur mort. Toutefois, le mécanisme de référence est la cytotoxicité médiée par la voie perforine/granzyme. La perforine relarguée par les CTL induit la mort des cellules cibles en formant des pores dans la membrane plasmique. En plus de cela, la lyse est accompagnée d'une détérioration cellulaire qui est, quant à elle, médiée par des sérines protéases appelées granzymes. Ces protéases induisent une apoptose rapide des cellules cibles après leur entrée dans ces mêmes cellules qui est facilitée par les pores membranaires formés par la perforine (Peters *et al.*, 1991; Lowin *et al.*; 1995). Les granzymes impliquées dans la lyse cellulaire sont les granzymes A et B: les granzymes B induisent l'apoptose de la cellule cible via une voie dépendante des caspases tandis que les granzymes A

emmènent à un programme de mort cellulaire indépendant des caspases (Sutton *et al.*, 2003).

Il est à noter que les vaccins inertes peuvent également susciter une réponse de type Th1 ou CTL via le processus de présentation croisée ou « *cross-presentation* » (Heath et Carbone, 2001). La présentation croisée désigne une voie de *processing* supplémentaire, propre aux cellules dendritiques, qui donne à des antigènes internalisés l'accès aux mécanismes décrits plus haut, permettant leur dégradation, transport et assemblage avec les molécules du CMH-I. Elle permet aux cellules dendritiques de déclencher et de soutenir la réponse cellulaire cytotoxique contre des agents pathogènes qui ne les infectent pas. Par rapport au *processing* des protéines endogènes, la présentation croisée implique la communication entre la voie endosomique, responsable de l'acquisition des antigènes, et les compartiments impliqués dans leur *processing*, le cytosol et le RE. La nature précise de cette communication reste incertaine, mais plusieurs modèles ont été proposés (Saveanu et van Endert 2005). Un premier modèle proposait l'existence d'un mécanisme de transport membranaire entre les endosomes et le cytosol, qui permettrait aux antigènes internalisés d'accéder au *pool* d'antigènes cytosoliques. Un autre modèle est celui du « RE-phagosome ». Il suggère au contraire que le phagosome, formé avec un apport important de membranes et de protéines du RE, fonctionnerait comme un compartiment spécialisé qui associe tous les éléments requis pour le *processing* des antigènes. Cependant, une analyse rigoureuse n'a pas confirmé une contribution de membranes du RE à la formation du phagosome, mettant ainsi en doute le modèle du RE-phagosome. Par ailleurs, ce modèle intègre difficilement le rôle important, dans la *cross-presentation*, du routage des molécules de classe I dans la voie endosomale (Lizee *et al.*, 2003). En conclusion, il n'existe pas encore de modèle précis permettant de décrire les détails du mécanisme cellulaire de la *cross-presentation*.

2.5.3.2. Paradigme de la réponse Th1 et Th2

Depuis le début des années 1970, il était généralement accepté que les lymphocytes T étaient composés de deux types. Ceux qui expriment le marqueur CD4 et ceux qui expriment le marqueur CD8. Cependant, il a été formellement démontré en 1986 que les lymphocytes T CD4⁺ murins pouvaient être subdivisés en deux sous groupes, désignés Th1 et Th2 sur la base de leur profil cytokinaire (Mosmann *et al.*, 1986). Cette conclusion a été confirmée chez l'Humain suite aux travaux de Parronchi *et al.*, (1991). Tel que schématisé à la **figure 4**, les cellules Th1 secrètent l'INF- γ et IL-2 lesquels stimulent les lymphocytes B à produire les anticorps de type IgG2a et soutiennent la réponse immunitaire CTL. Tandis que les cellules Th2 produisent des cytokines de type Th2 dont l'IL-4, IL-5 et l'IL-13 qui favorisent la production d'IgE et d'IgG1 par les lymphocytes B.

Suite à la vaccination, plusieurs facteurs influencent le développement de la réponse immunitaire vers le type Th1 ou vers le type Th2. Tout d'abord le type de vaccins. Tel que mentionné précédemment, les vaccins présentant les antigènes aux cellules T par voie exogène stimulent de préférence une réponse immunitaire de type Th2 ou humorale alors que ceux présentant l'antigène de manière endogène suscitent une réponse immunitaire de type Th1 ou à médiation cellulaire. La nature de l'antigène vaccinal lui-même (dans le cas des vaccins sous-unitaires) et sa dose peuvent aussi influencer le type de la réponse. En effet, les antigènes dits « T-cell indépendants » activent les lymphocytes B de manière polyclonale sans l'aide des cellules TCD4⁺. Ce sont généralement les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries gram⁻ ou des antigènes dans lesquels un épitope immunodominant est sous forme polymérique. Les antigènes T-cell indépendants stimulent principalement la production d'IgM et n'induisent pas une mémoire immunologique. En revanche, les antigènes dits « T-cell dépendants » requièrent la participation des cellules T CD4⁺ pour activer les lymphocytes B. Ils stimulent la production aussi bien d'IgM que d'IgG, d'IgA et d'IgE, et induisent une réponse immunologique. De fortes doses de ces antigènes favorisent la réponse de type Th1 tandis que de faibles doses favorisent une réponse de type Th2 (Liew, 2002).

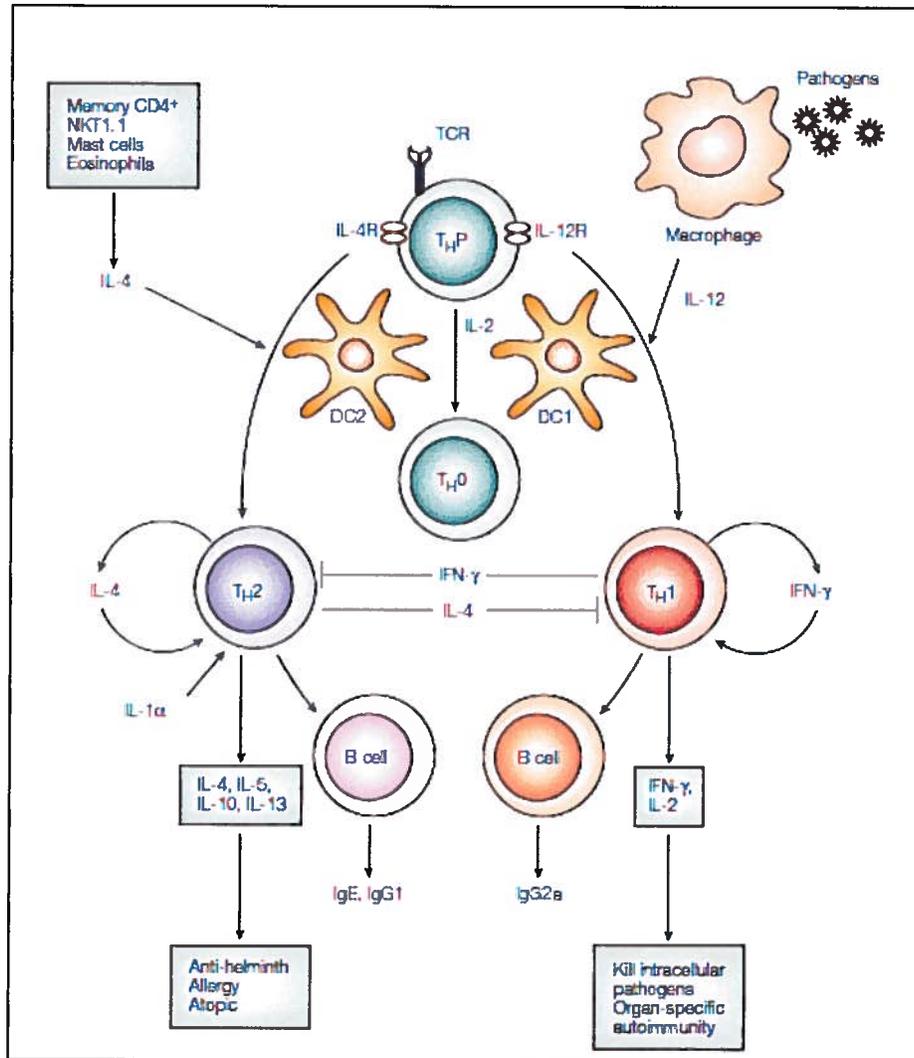


Figure 4. Voies classiques de stimulation et de régulation des lymphocytes Th1 et Th2. Le même précurseur (T_HP) peut se différencier en lymphocytes Th0, Th1 ou Th2 dépendamment de l'environnement de cytokines. Fonctionnellement, les lymphocytes Th1 médient la destruction des agents pathogènes intracellulaires et aident les lymphocytes B à produire les IgG2a. Les Th2, pour leur part, soutiennent la production d'IgG1 par les lymphocytes B et aident à la protection contre les agents pathogènes extracellulaires. Les deux types de cellules Th1 et Th2 peuvent inhiber les fonctions des unes ou des autres par le biais d'une forte production d'INF- γ ou d'IL-4, respectivement Tirée de Liew, 2002.

Il est important de noter que le paradigme Th1/Th2 n'est pas clairement défini chez le porc. En effet, les lymphocytes T porcins possèdent des caractéristiques biologiques qui les différencient de ceux de l'Humain et de la souris. Par exemple, les lymphocytes T double positifs (CD4+CD8+) peuvent être trouvés dans les sites extra-thymiques chez les porcs sains, alors que cette population est présente chez l'Humain et chez la souris seulement lors de pathologies (Charemtantanakul et Roth, 2006). Il a été aussi décrit que les lymphocytes CD4+CD8+ agissent comme des cellules Th et expriment les molécules du CMHII (Saalmuller *et al.*, 2002), ce qui n'est pas le cas chez l'Humain et la souris. De plus, on dénombre plus de cellules CD8+ que CD4+ dans le sang périphérique alors que ce rapport est inversé chez les deux autres espèces (Roth et Thacker, 2006).

2.5.3.3. Implication de la réponse Th1 ou Th2 contre *M. hyopneumoniae*

Le rôle de la réponse de type Th1 ou Th2 dans la protection contre *M. hyopneumoniae* n'est pas clairement défini. *M. hyopneumoniae* est considéré comme un agent pathogène extracellulaire. De ce fait, la réponse de type Th2 ou humorale devrait jouer un rôle clé dans la protection. Il est postulé que les IgA sécrétées bloqueraient l'adhérence de *M. hyopneumoniae* aux cellules respiratoires ciliées, tandis que les IgG seraient impliqués dans l'opsonophagocytose de l'agent pathogène (Sheldrake *et al.*, 1993). Toutefois, Djordjevic *et al.*, (1997) ont observé que la réponse humorale ne corrèle pas avec la protection contre l'agent pathogène. Par ailleurs, il y a de plus en plus d'évidences que les mycoplasmes sont capables de s'établir et persister à l'intérieur des cellules de l'hôte (Rottem, 2003). De ce fait, la réponse de type Th1 pourrait jouer un rôle crucial dans la protection contre *M. hyopneumoniae*. En effet, il a été observé que la protection contre l'agent pathogène corrèle avec la sécrétion de l'IFN- γ par les PBMCs (Thacker *et al.*, 2000). L'IFN- γ est l'un des principaux médiateurs de la résistance à l'infection des bactéries intracellulaires puisqu'elle est inductrice des mécanismes bactéricides des macrophages (Nathan *et al.*, 1984). Elle est déterminante dans l'immunité protectrice contre divers agents pathogènes tels que

Mycobacterium tuberculosis (Cooper *et al.*, 1993) et *Staphylococcus aureus* (Beekhuizen *et al.*, 2007).

2.5.3.4. Vaccins existants contre *M. hyopneumoniae*

Les vaccins contre *M. hyopneumoniae* qui sont actuellement disponibles dans le commerce sont exclusivement de type inactivé. Ils sont préparés à partir d'une souche inactivé du microorganisme et sont communément appelés bactérines car ils contiennent théoriquement tous les antigènes de l'agent pathogène. Parmi ces vaccins, on peut citer ceux qui sont commercialisés sous l'appellation M+PAC®, Ingelvac® M.hyo-1, Suvaxyn® MH-one; et Stellamune® *Mycoplasma*. Ces vaccins sont tous injectables et adjuvés. Des études indépendantes démontrent que ces vaccins sont efficaces contre PEP : ils réduisent de façon significative le taux de pneumonie et préviennent la perte de croissance associée à l'infection à *M. hyopneumoniae* chez les animaux vaccinés (Thacker *et al.*, 1998; Baccaro *et al.*, 2006). Par ailleurs, des études décrivent aussi que ces vaccins n'empêchent pas la transmission de l'agent pathogène et donc le statut de porteur (Meyns *et al.*, 2007; Sibila *et al.*, 2007). Ceci s'expliquerait par le fait que ces vaccins sont administrés par voie parentérale et, par conséquent, ne suscitent pas une forte réponse immunitaire au niveau des muqueuses respiratoires, lesquelles constituent la porte d'entrée et le lieu d'infection de *M. hyopneumoniae*.

Tel qu'illustré à la **figure 5A**, les bactérines commerciales peuvent différer dans leur composition antigénique (Thacker *et al.*, (1998). Cela serait lié au fait que différentes souches de *M. hyopneumoniae* sont utilisées dans la préparation de ces bactérines. Par conséquent, le degré de protection contre la PEP varie aussi parmi les différents bactérines (**figure 5B**). Le niveau de protection serait surtout influencé par la qualité et non par la quantité des antigènes présents dans la bactérine.

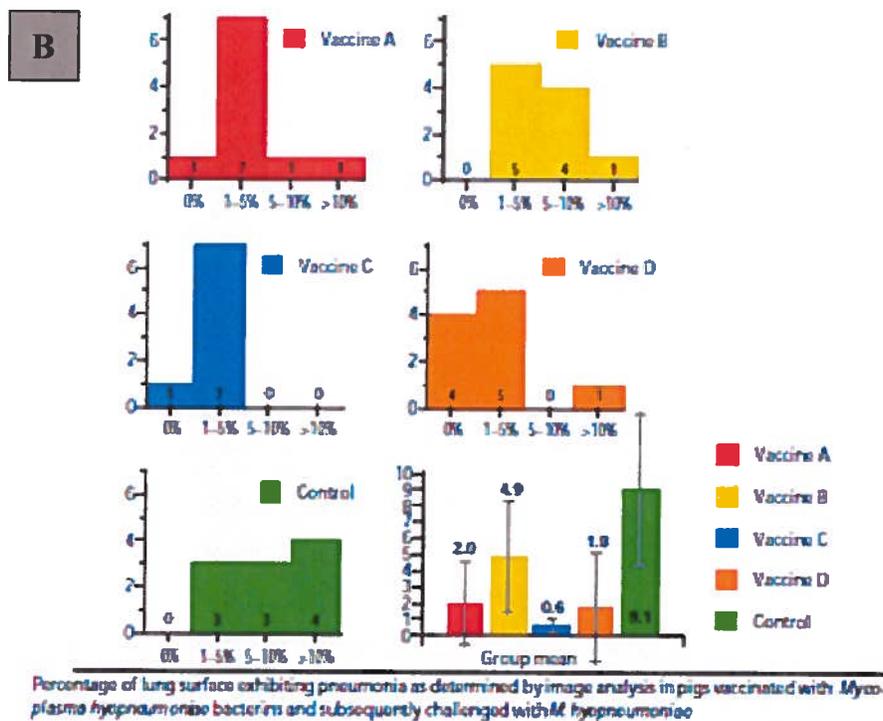
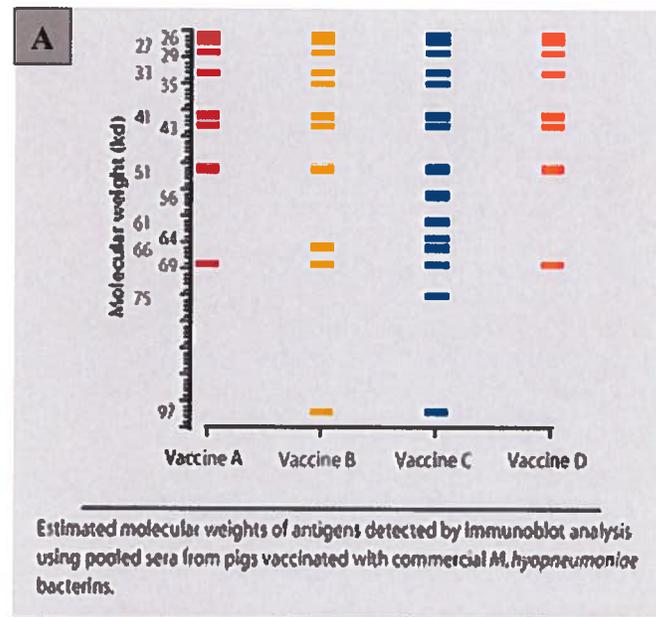


Figure 5. Variabilité de la composition antigénique (A) et de protection (B) parmi les bactérines anti-*M. hyopneumoniae*. Tirées de Thacker *et al.*, 1998.

Malgré leur efficacité, les bactérines imposent quelques contraintes. Par exemple, il est conseillé d'évaluer le statut sérologique des porcelets avant de les vacciner, car il a été décrit que les anticorps colostraux peuvent réduire l'efficacité du vaccin (Beilage et Schreiber, 2002). Il est aussi conseillé d'examiner le statut sanitaire de l'élevage puisque certaines infections intercurrentes telles que celle du CVP-2 peuvent être exacerbées suite à la vaccination avec les bactérines anti-*M. hyopneumoniae* (Opriessnig *et al.*, 2006). Un autre inconvénient majeur des bactérines est qu'elles ne permettent pas de différencier, par les tests de diagnostic sérologiques, les animaux vaccinés de ceux qui ont été naturellement infectés.

2.5.3.5. Vaccins expérimentaux

Afin de pallier aux inconvénients des bactérines, des vaccins sous-unitaires sont en cours de développement. Ces vaccins visent : (i) à éviter le problème de variabilité antigénique qui selon certains auteurs explique la protection partielle de certaines bactérines dans les conditions de champ (Haesebrouck *et al.*, 2004), (ii) à induire une réponse immunitaire muco-sale au niveau du tractus respiratoire et susciter une à la fois une réponse immunitaire de type Th1 et de type Th2; (iv) de permettre autant que possible la différenciation entre les porcs vaccinés et ceux infectés. Ces vaccins doivent aussi être faciles à produire en grande quantité.

Jusqu'à date peu de choses sont connues sur la nature des antigènes protecteurs de *M. hyopneumoniae* ainsi que sur leur degré d'homologie ou de conservation parmi les souches. Néanmoins, on sait que l'adhésine P97 est immunogénique et est retrouvée chez toutes les souches du mycoplasme qui ont été étudiées à ce jour (Wilton *et al.*, 1998 ; Stakenborg *et al.*, 2006). Comme décrit précédemment, cette protéine contient deux régions RR1 et RR2 qui sont impliquées dans l'interaction de *M. hyopneumoniae* aux cellules épithéliales et à la matrice extracellulaire de l'hôte. De ce fait, l'essentiel des vaccins sous-unitaires qui sont actuellement en développement cible la région RR1 de la P97. Le premier vaccin impliquant la P97 comme antigène a été testé par King *et*

al., en 1997. Ces auteurs ont observé que la vaccination de porcs avec la P97, sous la forme d'une protéine recombinante complexée à l'adjuvant de Freund, réduit la pneumonie causée par *M. hyopneumoniae*. Toutefois, ils n'ont pas noté une différence significative avec les animaux non vaccinés, rapportent en même temps ces auteurs. Cette faible protection serait attribuée au type de vaccin utilisé. En effet, il est bien connu que les protéines recombinantes induisent de préférence une réponse immunitaire humorale au niveau systémique et celle-ci ne serait pas suffisante pour conférer une protection effective contre *M. hyopneumoniae* (Messier *et al.*, 1990 ; Thacker *et al.*, 2000). Cette faible protection serait aussi due à la voie intramusculaire d'inoculation du vaccin qui généralement ne résulte pas en la stimulation d'une réponse immunitaire mucoale. Celle-ci est généralement induite si l'antigène est complexé à un adjuvant comme la toxine détoxifiée du cholera (CT) ou la sous-unité B de l'entérotoxine labile à la chaleur d'*E. coli* qui sont capables de stimuler une telle réponse (Freytag et Clements, 1999). L'importance de l'immunité mucoale contre *M. hyopneumoniae* a été mise en évidence par Shimoji *et al.*, (2003) qui ont observé que la vaccination de porcs par voie intranasale avec la souche YS-19 d'*Erysipelothrix rhusiopathiae* exprimant la région RR1 de la P97 réduit de manière significative la sévérité de la pneumonie induite par *M. hyopneumoniae*.

D'autres approches vaccinales utilisant également la région RR1 de la P97 ou d'autres antigènes sont aussi décrites dans la littérature mais n'ont pas, à notre connaissance, fait l'objet d'évaluation chez le porc contre l'infection épreuve par l'agent pathogène. Par exemple, il est rapporté qu'un vaccin chimérique composé de la région RR1 de la P97 fusionnée à la sous-unité B de l'entérotoxine labile à la chaleur d'*E. coli* induit une réponse systémique et mucoale de type Th1 et Th2 anti- RR1 chez la souris (Conceição *et al.*, 2006). D'autre part, Chen *et al.*, (2006) ont décrit que l'immunisation intranasale de souris avec une souche atténuée de *Salmonella typhimurium* exprimant la région RR1 suscite une réponse Th1 et la production sérique d'IgG anti-R1 mais pas celle d'IgA au niveau des muqueuses respiratoires. Finalement, il a été trouvé qu'un vaccin à ADN exprimant l'antigène P42 induit une réponse de type

Th1 (présence d'IgG2a) et Th2 (présence d'IgG1) chez la souris et que ces anticorps sont capables d'inhiber *in vitro* la croissance de *M. hyopneumoniae* (Chen *et al.*, 2003).

Notre projet de recherche s'inscrit également dans la démarche de développement d'un vaccin sous-unitaire contre *M. hyopneumoniae*. Nous avons envisagé d'utiliser un adénovirus comme vecteur de la P97 pour des raisons qui seront expliquées dans la section suivante.

3. Adénovirus

3.1. Définition et classification

Les adénovirus (AdV) ont été identifiés en 1953 à partir de prélèvements d'amygdales et de sécrétions respiratoires d'enfants infectés et de militaires atteints d'infections respiratoires aiguës (Rowe *et al.*, 1953). Depuis cette date, les adénovirus ont été retrouvés chez de nombreux hôtes et ils sont regroupés dans une seule famille virale nommé *Adenoviridae*. Tel qu'illustré à la **figure 6**, la classification actuelle des AdV, établie sur la base d'identité de séquences de certains gènes, regroupe 4 genres (Davison *et al.*, 2003). Les AdV du genre *Mastadenovirus* infectent une large gamme de mammifères. Le genre *Aviadenovirus* infecte uniquement les oiseaux. Les Ads du genre *Atadenovirus* se caractérisent par un fort pourcentage de A+T au sein de leur génome, d'où leur nom. Ce genre comporte une variété assez importante d'hôtes similaires à ceux des genres précédents. Le genre *Siadenovirus*, ne comporte actuellement que deux espèces, le FrAdV-1 et TAdV-3 qui ont été isolées chez une espèce de grenouille et les oiseaux, respectivement. Leur génome contient un gène codant pour une sialidase, d'où leur nom. Enfin, le seul adénovirus connu pour infecter les poissons est génétiquement plus éloigné des 4 premiers genres et pourrait constituer le cinquième genre de la famille des *Adenoviridae*.

Chacun de ces genres renferme plusieurs sérotypes qui sont différenciés sur la base de leur résistance à la neutralisation par des anticorps induits par d'autres sérotypes et qui

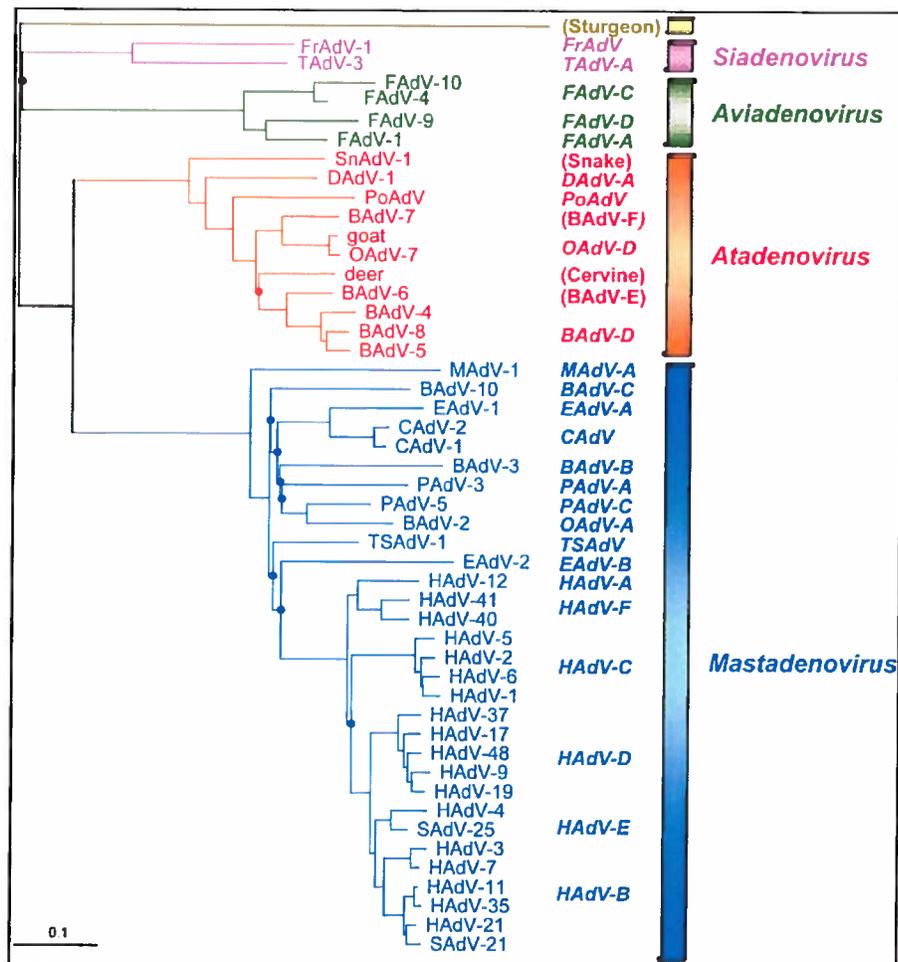


Figure 6. Classification des adénovirus. Basée sur la comparaison des séquences de gènes codant pour l'hexon. Les différents genres et leurs espèces sont illustrés en différentes couleurs. Les abréviations des noms des virus sont indiquées à la fin des branches : B, bovin; C, canin; D, canard; E, équine; F, volaille; Fr, crapaud; H, Humain; M, murin; O, ovin; P, porcine; Po, opossum; Sn, serpent; T, dinde; Ts, Tupaia. (Tirée de Davison *et al.*, 2003).

sont répartis en différents groupes. Par exemple, chez l'Humain il y a au moins 51 sérotypes qui sont subdivisés en 6 groupes (A-F) (Ebner *et al.*, 2006). C'est le sérotype 5 (AdV5), appartenant au groupe C, qui est actuellement le mieux caractérisé et le plus utilisé comme vecteur dans les essais vaccinaux et thérapeutiques (Ferreira *et al.*, 2005 ; Douglas, 2007). Chez le porc, seulement 5 sérotypes ont été identifiés à ce jour ; ils sont répartis dans 3 groupes (A-C) (Hammond et Johnson, 2005).

En général, les AdV sont faiblement pathogènes chez l'Humain et les animaux mais certains sérotypes peuvent être associés à des pathologies comme les entéropathies ou les pneumonies aiguës ou les encéphalites méningées chez les sujets immunodéprimés (Feber, 2001).

3.2. Aspect structural et génomique.

Les AdV sont des virus (de 60 à 90 nm de diamètre) non enveloppés à symétrie icosaédrique. Leur capsid est formée de 252 capsomères (240 hexons et 12 pentons) (Russell, 2000). Les capsomères situés aux sommets de l'icosaèdre sont des pentons prolongés par une fibre de longueur variable et terminée par une structure globulaire contenant l'antigène γ qui est responsable de la propriété d'hémagglutination (Eiz *et al.*, 1997). La capsid est construite à partir de 7 des 12 protéines présentes dans le virus. L'hexon, la base du penton et la fibre, respectivement désignés protéines II, III et IV sont les protéines structurales majeures, alors que les protéines désignées IIIa, VI, VIII et IX (Rux *et al.*, 2004) constituent des protéines structurales mineures et permettent la stabilisation de la capsid.

Tel qu'illustré à la **figure 7**, le génome viral est une molécule linéaire d'ADN double brin dont la taille varie suivant le sérotype et l'hôte (Shenk, 2001). Les deux brins d'ADN possèdent à leurs extrémités des séquences répétées inversées (ITR, pour inverted terminal repeat sequence), de 36 à 200 pb, qui servent d'origine de réplication du génome viral (Muzyczka, 1992). Une protéine de 55 kDa appelée TP (*pour terminal protein*) est attachée de façon covalente aux extrémités de chacun des brins d'ADN, et

qui sert d'amorce protéique de la réplication de l'ADN viral (Webster *et al.*, 1997). Cette protéine jouerait également un rôle important de protection de l'ADN viral contre la dégradation (Van Oostrum et Burnett, 1985). L'ADN viral est quant à lui entièrement recouvert par la protéine VII et IX qui permettent son compactage au sein de la capside. (Van Oostrum et Burnett, 1985).

Le génome des AdV est organisé en plusieurs régions (**figure 7**): les régions précoces (E1-E4), intermédiaires et les régions tardives (L1-L5). Les régions précoces s'expriment au début du cycle viral. Les protéines codées par la région E1A modulent le métabolisme des cellules pour les rendre plus susceptibles à la réplication virale (Klimkait et Doerfler, 1987). Dans les cellules quiescentes, la sous région E1A se lie à la protéine p300 pour induire la synthèse de l'ADN et la transformation cellulaire (Stein *et al.*, 1990 ; Mymryk et Bayley, 1993). La p300 a pour fonction de réprimer la protéine c-Myc afin de réguler négativement la transition des cellules de la phase G₀/G₁ à la phase S en réprimant la protéine c-Myc (Baluchamy *et al.*, 2003 ; 2007). La sous région E1B code une protéine de 55 kDa qui inactive la p53, une molécule qui agit comme un facteur de transcription pour augmenter l'expression de nombreux gènes cellulaires (Urs et Dobbstein, 2004).

La région E4 code au moins 7 protéines toxiques pour la cellule qui induisent l'apoptose de manière indépendante de la p53. La protéine E4orf6 bloque l'accumulation de p53. E4orf4 se lie à une protéine phosphatase p2a, entraînant la déphosphorylation d'activateurs de E1A et autres facteurs de transcription, ce qui aboutit à la diminution de l'expression de E4 (autorégulation). La région E4 synthétise aussi les protéines qui favorisent la persistance du virus dans les tissus infectés en inhibant, entre autres, l'activité de l'INF de type I et II, et qui initient l'expression des gènes tardifs (L1-L5) en empêchant la synthèse des protéines cellulaires (Ullman *et al.*, 2007).

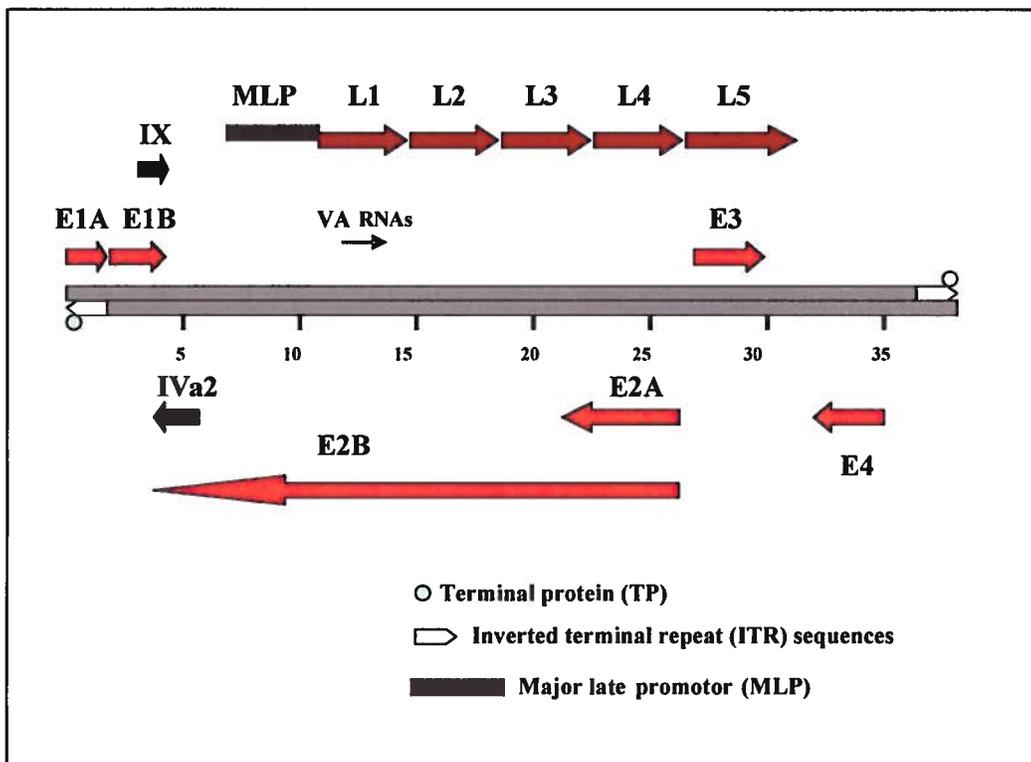


Figure 7. Organisation génomique de l'adénovirus humain de sérotype 5. L'ADN linéaire double brin est représenté au centre. Il renferme les séquences répétées inversées (ITR) et la protéine TP aux extrémités. Les régions précoces sont montrées en rouge, les tardives en rouge foncé et les régions intermédiaires en noir. Les flèches indiquent le sens de la transcription. Adaptée de Dobner et Kzhyshkowska, 2001.

La région E3 n'est pas essentielle pour la croissance virale, mais elle possède des fonctions immunorégulatrices. Son expression dépend d'activateurs synthétisés lors de l'expression de E1A et E4. La région E3 permet à la cellule infectée d'échapper au système immunitaire. En effet, elle code pour une protéine de 19 KDa qui en s'associant aux molécules CMHI, les retient dans le réticulum endoplasmique. Ce qui empêche l'exposition des ces molécules à la surface des cellules infectées. Il s'agit donc d'un mécanisme qui prévient la lyse des cellules infectées par les lymphocytes T

CD8+ (Ginsberg *et al.*, 1989). La région E3 code aussi plusieurs protéines qui interfèrent avec l'inflammation (*Tumor Necrosis Factor*). Ces protéines de E3 empêchent la fixation du TNF sur son récepteur. Une protéine de la région E3 produite très tardivement jouerait un rôle dans la destruction de la cellule (Jeffrey *et al.*, 2003).

L'expression de la région E2, comme celle de E3, dépend d'activateurs produits par E1A et E4. Cette région E2 est impliquée dans la réplication de l'ADN viral. E2A code une *DNA binding protein* (DBP) p72 qui recouvre l'ADN monocaténaire néosynthétisé et le protège de l'activité des nucléases cellulaires. E2B code une protéine terminale p55 liée de façon covalente aux extrémités 5' de l'ADN bicaténaire et sert d'amorce à la réplication (Chang et Shenk, 1990).

La transcription des gènes tardifs est sous le contrôle du promoteur MLP (major late promotor). Ces gènes ainsi que ceux de la région intermédiaire sont impliqués dans la production des composants structuraux ainsi que dans l'encapsidation et la maturation des particules virales (Young, 2003).

3.3. Tropicisme cellulaire et cycle viral

Le cycle de réplication des AdV est initié par leur attachement du virus à la cellule hôte via le récepteur CAR (*Coxsackie and Adenovirus Receptor*). Comme son nom l'indique, ce récepteur est commun aux virus coxsackie B3 de la famille des *Picornaviridae* et aux AdV de la famille A, C, D, et E. Le CAR est une glycoprotéine transmembranaire de 46 kDa appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Il est exprimé sur un large spectre de type cellulaire ce qui explique le large tropisme des AdV (Howitt *et al.*, 2003). Le cycle viral peut être divisé en trois étapes ; une phase précoce correspondant à l'attachement et à l'entrée du virus, suivi d'une phase de réplication du génome viral et de production des protéines virales et d'une phase d'assemblage et de libération des virions. L'entrée du virus dans la cellule se fait suite à un processus d'endocytose clathrine-dépendant (Wickham *et al.*, 1993; Wang *et al.*,

2000). Une fois à l'intérieur de la cellule, le virus se décapside progressivement et le contenu de la vésicule endosomale s'acidifie. Cette acidification est due à l'interaction directe ou indirecte du penton-base avec la pompe à protons endosomale. La membrane endosomale est ensuite lysée et la particule virale libérée dans le cytoplasme poursuit sa décapsidation puis est acheminée jusqu'aux pores nucléaires par un processus actif faisant intervenir les microtubules, la PKA (*protein kinase A*) et la p38/MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (Suomalainen *et al.*, 2001).

Une fois libérée dans le cytoplasme, la particule virale se lie à la face cytoplasmique de la membrane nucléaire et libère le génome viral dans le noyau. L'ADN viral s'associe à la matrice nucléaire par ses protéines terminales et peut dès lors être transcrit et répliqué, et cela se fait en deux phases (Shenk, 2001): 1) la phase précoce qui, tel que mentionné précédemment, a lieu avant la réplication du génome viral. Elle conditionne les cellules de l'hôte à la réplication du virus et elle assure la synthèse des produits nécessaires à la réplication de l'ADN et à l'échappement de la surveillance immunitaire. 2) la phase tardive a lieu pendant et après la réplication du génome viral. Finalement, l'assemblage et de la libération des virions se fait dans le noyau, et les protéines de structure doivent migrer dans le noyau.

Contrairement aux rétrovirus, le cycle infectieux des AdV n'est pas dépendant du statut prolifératif de la cellule infectée. En effet, tel que mentionné précédemment, les AdV sont en mesure de se répliquer dans une cellule quiescente en l'imposant d'exprimer les activités endogènes caractéristiques de la cellule en phase S. Celles-ci sont alors détournées au profit de la production virale. Ainsi dans une cellule très permissive, le cycle complet de l'AdV5 dure moins de 30 heures et s'achève par la libération d'environ 1000 (Shenk, 2001) particules virales. Ce rendement est impressionnant et constitue l'un des attraits pour les AdV comme vecteurs vaccinaux et thérapeutiques. Un autre avantage des AdV par rapport aux rétrovirus est que leur génome ne s'intègre pas dans le génome de la cellule hôte, d'où l'absence d'insertion mutationnelle qui peut engendrer des cancers (Kamiya *et al.*, 2001).

3.4. Vecteurs adénoviraux

3.4.1. Généralités

En plus des vecteurs AdV, différents autres vecteurs ont été développés dans l'optique d'introduire des gènes hétérologues d'intérêt vaccinal ou thérapeutique dans les cellules de mammifères. Ces vecteurs, dont les avantages et inconvénients sont résumés dans le **tableau 3**, sont soit de nature virale (virus adéno-associé, rétrovirus, lentivirus, poxvirus) ou non virale incluant l'ADN nu et des liposomes. Nous ne ferons pas dans cette revue une description détaillée de ces vecteurs, mais aborderons dans les sections ultérieures, au besoin, leur application en thérapie (génique ou oncolytique) ou en vaccination.

Les liposomes sont des vecteurs non viraux qui sont présentement les plus étudiés. Ce sont des corpuscules lipidiques artificiels qui sont chargés positivement et qui peuvent enrober des transgènes de grande taille. En raison de leur nature lipidique, ils peuvent fusionner avec des cellules, permettant ainsi la pénétration de l'ADN, mais toutefois avec une efficacité beaucoup moindre que les vecteurs viraux (Akita et Harashima, 2008). Un avantage certain par rapport à ces derniers est que, dans la où ils ne contiennent aucun peptide, les liposomes ne provoquent donc pas de réponse immunitaire.

Bien que, par rapport aux vecteurs non viraux, les vecteurs viraux fournissent l'avantage d'un transfert extrêmement efficace des transgènes dans les cellules hôtes, ils possèdent cependant un certain nombre d'inconvénients (variant en fonction de la nature du virus) incluant: une expression relativement faible ou transitoire du transgène, la possibilité de déclencher une réponse immunitaire, l'incapacité pour certains virus de pénétrer dans les cellules ne se divisant pas ou quiescentes et l'éventualité d'une oncogénèse qui peut résulter d'une insertion mutationnelle ou à proximité d'un proto-oncogène de leur génome dans l'ADN de la cellule hôte. Cette éventualité est l'une des caractéristiques des rétrovirus, une famille de virus à ARN qui opèrent une transcription inverse de leur ARN viral en ADN double brin lequel va aléatoirement s'intégrer dans le génome de la cellule hôte. Bien que la mutagénèse par insertion semble être un

Tableau 3. Avantages et inconvénients des principaux vecteurs de transfert de gènes*

Type de Vecteurs	Avantages	Inconvénients	Références
Adénovirus	<ul style="list-style-type: none"> - infectent les cellules en division et quiescentes - capacité d'insertion variable (7,5 à 14 Kb) - forte expression du transgène - production aisée (à de titres de 10^{11} à 10^{12} virus/ml) - aucun risque d'intégration mutationalnelle 	<ul style="list-style-type: none"> - expression transitoire du transgène - très immunogènes 	Russel, 2000
Rétrovirus	<ul style="list-style-type: none"> - bonne pénétration cellulaire - intégration chromosomiques du transgène - expression stable du transgène - peu immunogènes 	<ul style="list-style-type: none"> - Capacité d'insertion limitée (< 8 kb) - n'infectent pas les cellules quiescentes - risque d'insertion mutationalnelle - production difficile 	Weber <i>et al.</i> , 2001
Lentivirus	<ul style="list-style-type: none"> - infectent les cellules en division et quiescentes - peu immunogènes - intégration chromosomique du transgène 	<ul style="list-style-type: none"> - Capacité d'insertion limitée (< 8 kb) - risque d'insertion mutationalnelle - production difficile 	Sarkis <i>et al.</i> , 2008
Virus adéno-associé	<ul style="list-style-type: none"> - non pathogènes - expression stable du transgène - intégration du transgène 	<ul style="list-style-type: none"> - Capacité d'insertion très limitée (<4,5 kb) - peu infectieux - risque d'insertion mutationalnelle - production difficile 	Carter et Samulski, 2000
Virus de la vaccine	<ul style="list-style-type: none"> - capacité d'insertion importante (> 20 kb) - peu immunogène - forte expression du transgène - production relativement aisée (à de titres d'environ 10^{10} virus/ml) 	<ul style="list-style-type: none"> - n'infecte pas les cellules quiescentes - perturbation du métabolisme cellulaire (diminution de l'expression des protéines endogènes) 	Vanderplasschen et Pastoret, 2000
Vecteurs non viraux (ADN nu, liposomes)	<ul style="list-style-type: none"> - taille illimitée du transgène - non immunogènes - production aisée (pas de limite de "titre") 	<ul style="list-style-type: none"> - transfection peu efficace - difficile de cibler spécifiquement les cellules - déstabilisation <i>in vivo</i> 	Herweijer et Wolff, 2003 Akita et Harashima, 2008

* , les avantages et les inconvénients sont relatifs dépendamment de l'application (vaccinale ou thérapeutique) visée.

événement rare, elle a été décrite chez les singes après administration d'une dose massive d'un rétrovirus répliatif qui a conduit au développement d'un lymphome de cellules T (Donahue *et al.*, 1992).

3.4.2. Avantages et inconvénients

Tel que démontré par le nombre de publications parues dans plusieurs moteurs de recherche de données bibliographiques, les AdV semblent être les vecteurs les plus étudiés comme moyen de transfert des transgènes. En effet, les sérotypes 2 et 5 humains sont actuellement très bien caractérisés aux niveaux génétique et biochimique, ce qui autorise leur utilisation comme vecteurs d'expression *in vitro* et *in vivo* (Russell, 2000). Différents arguments sont en faveur de l'utilisation des AdV, en particulier de l'AdV5, comme vecteur. Tel que mentionné précédemment, son spectre cellulaire est large incluant les cellules tumorales. De plus, il est capable d'infecter et d'exprimer le transgène aussi bien dans les cellules en division que quiescentes (Russell, 2000).

- Son organisation génomique est suffisamment connue pour permettre l'insertion des transgènes dans des régions qui ne sont pas essentielles à la répliation du virus. Il est aussi possible d'insérer le transgène dans les régions E1 (indispensables à la répliation virale) ainsi que dans la région E3. Ceci permet de générer des virus recombinants non répliatifs, dits de première génération, qui peuvent accepter un transgène d'approximativement 8 kb (Russell, 2000). Dans les vecteurs AdV dits de deuxième génération, en plus de la délétion des régions E1 et E3, les régions E2 et E4 sont aussi supprimées, et il est possible d'insérer jusqu'à plus de 14 Kpb d'ADN étranger (Benihoud *et al.*, 1999). Toutefois, malgré ces délétions additionnelles, ces vecteurs restent très immunogènes causant *in vivo* une réponse inflammatoire et immunitaire de type CTL due à l'expression résiduelle des protéines virales et une expression transitoire du transgène (Yang *et al.*, 1994; Tripathy *et al.*, 1996; Molinier-Frenkel *et al.*, 2000).

Le caractère immunogénique des vecteurs AdV des deux premières générations constitue une des majeures limitations de leur utilisation en thérapie génique et en vaccination. Afin de remédier à ce problème, les recherches de ces dernières années portent sur le développement des vecteurs AdV dits de troisième génération. Ce sont des vecteurs appelés « gutless » (sans entrailles ou tripes), qui sont dépourvus de tous les gènes viraux, sauf les séquences ITR et le signal d'encapsulation. Ces vecteurs possèdent une capacité de clonage dépassant 30 kb (Benihoud *et al.*, 1999). Toutefois, pour les produire, la présence d'un vecteur AdV de première génération, qui contient des gènes structuraux et de régulation nécessaires à la production du virus, est indispensable (Kochanek, 1999, Alba *et al.*, 2005). Il a été démontré que l'absence de protéines virales limite la cytotoxicité et l'élimination des cellules transduites, permettant une expression à plus long terme du transgène (O'Neal *et al.*, 2000, Xiong *et al.*, 2006 ; Barcia *et al.*, 2007).

Les vecteurs AdV de troisième génération seront aussi de type hybride, qui associent le pouvoir infectieux des AdV à la capacité d'intégration de virus adéno-associés « ou AAV pour *adeno-associated virus* » (Bilbao *et al.*, 1997). Un AAV est un petit virus (de la famille des *Parvoviridae*) à ADN simple brin de polarité positive ou négative et qui est déficient car il ne peut se propager qu'en présence d'un virus auxiliaire : adénovirus, herpes virus de type 1 ou le virus de la vaccine. En effet, en l'absence de virus auxiliaire, l'ADN de l'AAV s'intègre dans le génome cellulaire sous forme de provirus. C'est seulement en cas d'infection des cellules par un virus auxiliaire que ce provirus est excisé et un cycle productif démarre (Berns, 1990). Pour générer un vecteur AAV, seules les séquences ITR du virus sont laissées en place; les gènes *rep* (nécessaires à la réplication du virus et à l'excision du provirus) et les gènes *cap* (codant pour les protéines de la capsid virale) sont supprimés et remplacés par le transgène. Les protéines de structures et de régulation sont fournies *in trans* par une construction plasmique tandis que la co-infection avec un AdV fournit les protéines indispensables à la réplication du vecteur AAV. Celui-ci est capable, au tant qu'un vecteur Ad, d'infecter les cellules quiescentes et conserve sa capacité de s'intégrer dans

le génome cellulaire (Wu *et al.*, 1998; Leber *et al.*, 1999). Les vecteurs AAV hybrides sont très peu immunogènes mais possèdent, malheureusement, une capacité d'insertion très limitée qui ne dépasse pas 5 kb (Bilbao *et al.*, 1997).

- Finalement, les vecteurs AdV sont faciles à produire *in vitro* à de hauts titres ($>10^{11}$ virus/ml). Ceux qui sont non répliatifs sont généralement propagés dans les cellules qui complètent la région E1. La plus connue étant la lignée cellulaire 293 (Graham *et al.*, 1997). Cependant, la production du stock viral peut être contaminée par les particules virales répliatives « replication competent adenovirus ou RCA » qui résultent de la réintroduction de la région E1 dans les vecteurs viraux par recombinaison homologe (Lochmüller *et al.*, 1994).

3.4.3. Application en thérapie génique et oncolytique

Les AdV sont, à ce jour, les vecteurs les plus évalués dans les essais cliniques de thérapie génique (Shirakawa *et al.*, 2009). Actuellement, les vecteurs AdV représentent le moyen le plus efficace pour transférer un gène dans l'appareil respiratoire. Ainsi, plusieurs équipes tentent d'en tirer avantage pour la thérapie génique, entre autres, de la mucoviscidose. Il s'agit d'une maladie génétique (autosomale) récessive qui est associée à des anomalies du transport des électrolytes dans les cellules épithéliales. Elle est due à une déficience du gène codant pour la protéine transmembranaire CFTR « *cystic fibrosis transmembrane regulator* », qui fonctionne, entre autres, comme un canal chlore régulé par l'AMP cyclique. Les vecteurs AdV non répliatifs (de la première génération) ont été testés avec succès pour exprimer CFTR *in vivo* (Rosenfeld *et al.*, 1992 ; Yoshimura *et al.*, 1992). Toutefois, les premiers essais cliniques ont montré des résultats peu encourageants quant à la correction du déficit de transport de chlore chez les animaux traités. Ces résultats ont été justifiés par la cytotoxicité des AdV et l'expression transitoire de CFTR (Crystal *et al.*, 1995). De ce fait, de nouvelles approches s'orientent vers l'utilisation d'autres types de vecteurs tels les AVV ou les rétrovirus (Mueller et Flotte, 2008).

Les AdV sont aussi évalués en thérapie génique comme vecteurs de gènes suicides. Ces derniers sont des gènes qui codent pour des enzymes convertissant une pro-drogue en composé toxique induisant ainsi la mort des cellules par un contact direct ou par un effet de voisinage « ou effet bystander » (Boyer et Klatzmann, 1999). Le meilleur exemple est sûrement le gène codant pour la thymidine kinase du virus Herpes simplex de type 1 (HSV-TK). Cette enzyme a la propriété de phosphoryler le ganciclovir (GCV) et de le transformer en composé cytotoxique GCV-3P (Fyfe *et al.*, 1978). Ce dernier, étant un analogue des nucléotides, compétitionne avec le déoxyguanosine-3P et s'intègre comme substrat de l'ADN polymérase dans l'ADN durant la division cellulaire générant ainsi des codons de terminaison. L'ADN est alors tronqué, ce qui conduit à la mort cellulaire (St Clair *et al.*, 1987). Des études ont montré que la stratégie de thérapie génique utilisant HSV-TK dans un vecteur AdV non répliquatif réduit le développement des gliomes (tumeurs gliales) chez les animaux traités (Chen *et al.*, 1994 ; Xie *et al.*, 1999).

Les vecteurs AdV sont aussi actuellement évalués comme virus oncolytiques, qui sont des virus capables de se répliquer dans les cellules cancéreuses et de les lyser. En effet, on peut profiter de leur pouvoir de répllication dans différents types de cellules pour détruire les cellules cancéreuses. Toutefois, on doit s'assurer que l'infection est restreinte aux cellules tumorales uniquement. À date, le meilleur exemple d'un AdV oncolytique est celui désigné ONYX-015. Ce virus dernier manque la région E1B reconnue pour inactiver la protéine p53 en se liant à cette dernière, et ne peut se multiplier que dans les cellules n'exprimant pas cette protéine (Barker et Berk, 1987), ce qui est une des caractéristiques de la majorité des cellules malignes (Whibley *et al.*, 2009). Les premiers essais cliniques avec ONYX-015 ont été réalisés chez des patients souffrant d'un cancer de la tête et du cou : même si les tumeurs régresaient de 30 à 40%, une amélioration de l'état des patients n'était observée. Il a été même diagnostiqué une recrudescence de la tumeur chez certains patients (Ganly *et al.*, 2000). En revanche, la nouvelle étude a montré qu'une injection d'ONYX-015, accompagnée de la chimiothérapie classique, aboutit à un recul de plus de 50 % de la masse tumorale chez

19 patients sur 30. De plus, chez 8 patients, une disparition des tumeurs de 10 cm (Khuri *et al.*, 2000). ONYX-015 a été également évalué contre d'autres types de tumeurs incluant les tumeurs pancréatiques et les métastases hépatiques des tumeurs carcinoïdes, qui sont des cancers également adaptés à l'injection directe. Les résultats ont aussi montré une efficacité au dessous des attentes. Les hypothèses émises pour expliquer cette efficacité relative seraient que les cellules tumorales n'expriment que très peu de récepteur CAR ; elles seraient alors peu infecter par le virus (Hecht *et al.*, 2003 ; Makower *et al.*, 2003).

3.4.4. Application en vaccination

Les AdV et le virus de la vaccine modifié Ankara sont actuellement les vecteurs viraux les plus évalués en vaccination. Cette dernière a été à la base du vaccin qui a permis d'éradiquer la variole humaine dans les années 1970. Elle a l'avantage par rapport aux AdV d'être peu immunogène, ce qui permet les doses de rappel et une expression persistante de l'antigène qu'elle porte. De plus, cette souche tolère l'insertion d'ADN étranger de plus de 30 Kb, ce qui est idéal pour le développement d'un vaccin multivalent (contenant plusieurs antigènes). Elle présente cependant le désavantage d'être répliquative et de n'infecter que les cellules en division (Vanderplasschen et Pastoret, 2000).

En stimulant la réponse immunitaire contre leurs propres protéines de structure, les vecteurs AdVs facilitent, en même temps, une réponse immunitaire humorale et cellulaire contre l'antigène inséré (Tatsis et Ertl, 2004). Une fois à l'intérieur de la cellule, les vecteurs AdV expriment l'antigène qui est alors présenté par les CPA aussi bien via les molécules du CMHI que via les molécules du CMHII. Tel que mentionné précédemment (voir section 2.5.3.1), la présentation de l'antigène via les molécules du CMHI résulte en l'activation d'une réponse immunitaire CTL, qui est celle préférentiellement induite suite à l'inoculation d'un vecteur AdV (Tatsis et Ertl, 2004). Ceci serait lié à sa capacité de transduire et d'induire la maturation des cellules

dendritiques (Zhang *et al.*, 2001; Philpott, *et al.*, 2004). Par ailleurs, la présentation de l'antigène via les molécules du CMHII active les lymphocytes T CD4⁺ de type Th2 qui vont favoriser une réponse immunitaire humorale contre l'antigène. Il est décrit que l'immunité humorale contre l'antigène provoquée par les vecteurs AdV est majoritairement de type Th1 c'est-à-dire caractérisée par une forte production des anticorps IgG2a bien que les IgG1 soient également produits (Tatsis et Ertl, 2004). Un autre argument en faveur de l'utilisation des AdV comme vecteurs vaccinaux est associé à leur tropisme naturel pour les cellules respiratoires. De ce fait, ils sont adaptés pour être administrés par voie orale ou intranasale et pour ainsi induire une immunité mucoale (Santosuosso *et al.*, 2005).

Dans la littérature, il existe de nombreuses études qui démontrent l'efficacité de vaccins à base de vecteurs AdV non répliatif tant en médecine humaine que vétérinaire (Tatsis et Ertl, 2004, Ferreira *et al.*, 2005). Quelques-unes de ces études contre les agents pathogènes importants en médecine vétérinaire sont présentées dans le tableau 4. De plus, au Canada, on utilise présentement un vaccin constitué d'un AdV5 recombinant contre la rage qui est mis dans des appâts pour vacciner des animaux sauvages (renard, raton, etc...). Comme on peut le constater dans ce tableau, la totalité de ces vaccins a été développée contre les agents pathogènes viraux. En effet, Il y en a très peu contre les agents pathogènes bactériens, bien qu'il soit aussi démontré qu'un AdV non répliatif exprimant l'antigène 85A de *M. tuberculosis* induit, chez les souris, une protection contre l'agent pathogène qui est comparable au vaccin conventionnel BCG « Bacille Calmette-Guérin » (Santosuosso *et al.*, 2006).

Tableau 4. Exemples d'utilisation des adénovirus comme vecteurs vaccinaux en médecine vétérinaire

Pathogène	Animal	Caractéristique du vaccin	Voie d'inoculation	Réponse immunitaire ^a	Protectio n	Références
RV	Chien	rAdV nr exprimant la glycoprotéine (RG) du virus	SC	Humorale et cellulaire	Partielle	Wang <i>et al.</i> , 1997
IBV	Poulet	rAdV nr exprimant la protéine S1 du virus	IM	Humorale et cellulaire	Oui	Johnson <i>et al.</i> , 2003
IBVD	Poulet	rAd nr exprimant le gène VP2 du virus	SC ; IM	Humorale	Oui	Sheppard <i>et al.</i> , 1998
CSFV	Porc	rAdV nr exprimant la glycoprotéine (gp55) du virus	SC	Humorale et cellulaire	Oui	Hammond, 2000
PRV	Porc	rAdV nr exprimant la glycoprotéine gD du virus	SC	Humorale	Oui	Monteil <i>et al.</i> , 2000
PRRSV	Porc	rAdV nr exprimant la glycoprotéine GP5 du virus	ID	Humorale	Partielle	Kheyar <i>et al.</i> , 2005
BHV-1	Bovin	rAdV nr exprimant la glycoprotéine gD du virus	IN	Humorale et cellulaire	Oui	Gogev <i>et al.</i> , 2002
RV	Porc	rAdV exprimant la glycoprotéine du virus	IM, IN, Or	Humorale	Oui	Ye <i>et al.</i> , 2008

rAdVnr : adénovirus recombinant adénovirus non répliatif ; SC, sous-cutanée ; IM, intramusculaire ; ID, intradermique ; IN, intranasale ; Or, orale.
 RV, virus de la rage ; IBV, virus de la bronchite infectieuse aviaire ; IBVD, virus de maladie virale des corps inclus ; CSFV, virus de la peste classique porcine ; PrV : virus de la pseudorage ; PRRSV, virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcine ; BHV-1, herpesvirus bovin de type 1.

Justification des travaux

Notre projet s'insère dans un cadre d'envergure qui, à moyen ou à long terme, vise à développer un vaccin sous-unitaire contre la PEP, une maladie porcine causée par *M. hyopneumoniae* dont les mesures de lutte qui sont présentement appliquées, incluant la vaccination, ne parviennent pas à réduire la prévalence.

M. hyopneumoniae initie son infection en s'adhérant intimement aux cellules épithéliales ciliées des voies respiratoires. Et, ce processus est médié par une protéine membranaire nommée P97, qui est, à ce jour, considérée comme l'adhésine principale de l'agent pathogène. Etant donné que cette infection est uniquement localisée au niveau des voies respiratoires, il est possible qu'un vaccin sous-unitaire stimulant une réponse immunitaire complète, à la fois de type Th1 (à médiation cellulaire) et de type Th2 (humorale), contre la P97 puisse aider à contrôler l'infection à *M. hyopneumoniae*. La réponse humorale permettrait de bloquer l'adhérence de l'agent pathogène aux cellules épithéliales respiratoires de l'hôte tandis que la réponse à médiation cellulaire aiderait à l'élimination de cellules infectées. D'où l'intérêt de notre étude pour un AdV comme vecteur de l'antigène P97. La capacité des vecteurs AdV à induire les deux types de réponse immunitaire contre le transgène est démontrée dans de nombreuses études. De plus, ces vecteurs sont aussi connus pour avoir un fort tropisme pour les cellules des muqueuses respiratoires. Ceci favorise leur administration par voie intranasale ou orale afin de susciter une réponse immunitaire locale.

Au cours de ces travaux, dans un premier temps, un vecteur AdV5 non répliquatif exprimant la portion de l'adhésine P97 contenant les régions RR1 et RR2 (P97c) a été construit puis examiné pour sa capacité à stimuler une réponse immunitaire spécifique contre la P97c chez des souris. Finalement, l'efficacité de ce vecteur a été évaluée chez des porcs contre l'infection épreuve avec une souche virulente de *M. hyopneumoniae*.

- PARTIE EXPÉRIMENTALE I -

« Construction de l'adénovirus recombinant non réplicatif exprimant la P97c de *M. hyopneumoniae* et évaluation de la réponse immunitaire spécifique anti-P97c chez la souris »

Travaux publiés dans la revue « *Clinical vaccine and Immunology* » (Annexe A)

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Gène de la P97 et anticorps monoclonaux

Préalablement à ces travaux, le gène codant pour la P97 avait été amplifié par PCR à partir de la souche 25934 de *M. hyopneumoniae*. Sa séquence complète est disponible dans la banque de données GenBank sous le numéro d'accès AY512905. Ce gène a une taille de 3279 pb et contient 4 codons TGA qui ont été mutés, par mutagenèse dirigée, en codons TGG afin de permettre son expression dans un système hétérologue (K. Cheik Saad Bouh, 2004). Le gène muté a été cloné en deux parties, N et C-terminale, dans le plasmide pGEX4T1 (Pharmacia Biotech) pour l'expression de la protéine en fusion avec la glutathione S-sépharose (GST). C'est le plasmide contenant la portion C-terminale (1676 pb), désigné pGEX4T1/p97c, qui a été utilisé au cours de ce projet. Cette portion contient la région RR1, qui est responsable de l'adhérence de l'agent pathogène aux cellules cibles, ainsi que la région RR2. D'après la séquence protéine qui est disponible dans la banque de données GenBank (numéro d'accès : AY512905), la région RR1 contient 8 unités de répétées AAKPE(V), alors que la région RR2 renferme 5 unités répétées GA(S)PN(S) QGKKAE.

L'anticorps monoclonal (AcMo) anti-P97c, désigné 8H4-G6, utilisé dans cette étude a été également préalablement produit dans notre laboratoire. Il est sécrété par des hybridomes obtenus après fusion de splénocytes de souris BALB/c immunisées avec la P97c couplée à la GST avec les cellules de myélome Sp2/0-Ag14 (K. Cheik Saad Bouh, 2004).

2. Adénovirus et vecteur de transfert

L'adénovirus utilisé dans cette étude est l'AdV5. Il est délété pour la région E1 et, par conséquent, non répliatif. Il ne possède pas non plus la région E3 et le gène codant pour la protéase (PS). Ce virus, désigné (Ad5 Δ E1 Δ E3 Δ PS), nous a été fourni par le Dr Bernard Massie (Institut de recherche en biotechnologie, Conseil national de recherches Canada, Montréal, Québec, Canada) et conservé à -70°C.

Le plasmide nommé pAdPS-CMV5-Cuo-IRES-GFP (pour simplifier pAd) nous été également fourni par le Dr Bernard Massie. Ce plasmide a été utilisé dans cette étude comme vecteur de transfert pour la construction d'AdV5 recombinants. La cartographie et les caractéristiques de ce vecteur sont présentées à la **figure 8**.

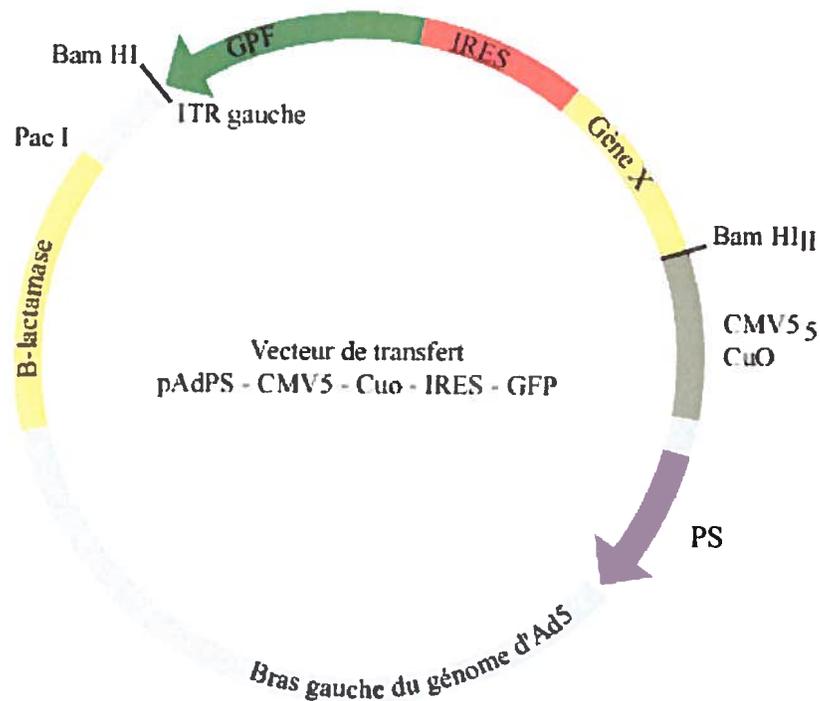


Figure 8. Cartographie du vecteur de transfert (pAdPS-CMV5-Cuo-IRES-GFP). Ce vecteur contient une partie du génome incluant l'ITR gauche et le bras gauche de l'AdV5 permettant sa recombinaison homologue avec le génome du virus. Le promoteur CMV5-CuO (*cytomegalovirus type 4-cumate operator*), inductible par le cumate, contrôle l'expression du gène d'intérêt (X) lequel peut être co-exprimé avec la GFP grâce à l'IRES (*internal ribosome entry site*). Ce vecteur de transfert contient un site de clonage *Bg/II* et un site *PacI* qui permet de linéariser le plasmide pour permettre la recombinaison homologue. Finalement, il renferme le gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection des bactéries transformées.

3. Cellules eucaryotes et bactériennes

- Les cellules 293A (ATCC CRC-1573) proviennent de l'ATCC (ATCC CRC-1573). Elles ont été développées par Graham *et al.*, (1977) et possèdent dans leurs chromosomes la région E1 du génome de l'AdV de type 5. Elles ont la forme des cellules épithéliales et une morphologie typique des cellules transformées c'est-à-dire qu'elles ont une tendance à continuer à se diviser même après avoir atteint la confluence et à croître en amas. L'une des caractéristiques qui les rend très utiles est qu'elles permettent la multiplication d'AdV non répliquatifs par complémentation de la région E1. Dans cette étude, ces cellules ont été maintenues dans le milieu DMEM contenant 5% FBS et 2 mM de L-glutamine, à 37 °C et dans une atmosphère de 5% CO₂.

- Les Cellules NPTr (*Newborn Pig Trachea*) constituent une lignée de cellules de la trachée porcine (Ferrari *et al.*, 2003). Ce sont des cellules adhérentes qui ressemblent aux cellules épithéliales avec un noyau ovale et une croissance uniforme. Ces cellules nous ont été fournies par le laboratoire du Dr Mario Jacques (Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire, St-Hyacinthe, Québec, Canada) et ont été cultivées dans le milieu MEM (Invitrogen) contenant 10% de FBS, 300U/ml de pénicilline-streptomycine et 1 mM de pyruvate, à 37 °C et dans une atmosphère contenant 5% CO₂. Les cellules NPTr ne permettent pas la réplication d'AdV non répliquatifs.

- La souche BL21(DE3)pLys d'*E. coli* (génotype [F⁻ dcm ompT hsdS_B(r_Bm_B) gal λ (DE3) pLysS cmr^R]) a été utilisée pour la production de la rP97c. La souche DH5α d'*E. coli* (génotype [F⁻ endA1 hsdR17(r_km_k) supE44 thi-1λ⁻ recA1]) a servi pour la production d'ADN plasmidique. Comme toutes les souches B d'*E. coli*, la souche BL21(DE3)pLys contient des mutations dans les gènes *lon* et *ompT* qui codent pour la protéase ATPase-dépendante et la protéase de la membrane externe, respectivement. Ces protéases sont souvent à l'origine de la dégradation de protéines recombinantes lors des étapes de production et de purification (Matsuo *et al.*, 1999). La souche BL21(DE3)pLys possède en revanche le gène λD3 qui code l'ARN polymérase ADN-dépendante du bactériophage

T7 (ARNP T7). Ce gène est sous le contrôle du promoteur *lacUV5* qui est inductible par l'IPTG. De plus, cette souche contient le plasmide pLysS qui code pour le lysozyme T7 qui en se fixant l'ARNP T7 inhibe son activité, évitant ainsi la transcription basale du gène à exprimer (Dubendorff et Studier, 1991; Stano et Patel, 2004). Afin de maintenir le plasmide pLysS, il est indispensable de sélectionner ces bactéries sur un milieu contenant le chloramphénicol. Ces caractéristiques font de la souche BL21(DE3)pLys d'*E. coli* l'une des plus utilisées pour la production de protéines hétérologues.

Ces souches bactériennes ont été cultivées à 37°C dans le milieu LB (Luria-Bertani) composé d'extrait de levure 5 g/L, tryptone 10 g/L et du NaCl 10 g/L. Le milieu LB supplémenté de 15 g/L d'agar (gélose de LB) a été utilisé pour leur croissance en gélose. Lorsque cela est précisé, le milieu a été supplémenté avec de l'ampicilline et/ou de chloramphénicol, aux concentrations finales de 100 µg/ml ou de 34 µg/ml, respectivement. La préparation de bactéries compétentes de chacune des souches a été faite par la méthode classique utilisant le chlorure de calcium à 100 mM. La transformation bactérienne avec l'ADN plasmique a été effectuée en utilisant la technique choc thermique (Sambrook *et al.*, 1989).

4. Production et purification de la P97c recombinante

Les bactéries *E. coli* BL21 (DE3)pLysS ont été transformées par le plasmide recombinant pGEX4T1/p97c puis mises en culture sur une gélose de milieu LB + Ampicilline + chloramphénicol. Pour produire la rP97c en grandes quantités, une colonie a été sélectionnée. La culture pour l'induction a été réalisée dans un volume total de 1 litre (2 X 500 ml). Après induction avec 1 mM d'IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside), le culot bactérien a été resuspendu dans une solution de lyse froide contenant les inhibiteurs de protéases (CompleteTM, Roche Diagnostics) puis incubé 30 min à 4°C. Par la suite, les bactéries ont été lysées par sonication pendant 2 min (20 secondes d'impulsion et 20 secondes de pause entre chaque impulsion) à l'aide d'un sonicateur (Vibra-Cell, Sonics & Materials Inc., USA) programmé à une amplitude de

0.2%. Pour aider à la solubilisation de protéines, le Triton X-100 a été ajouté à une concentration finale de 1%. Le lysat a été incubé sous rotation à température pièce (TP) pendant 30 min avant d'être clarifié par centrifugation (5000 x g, 4°C). Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube et laissé sur la glace jusqu'à la purification. Un aliquot a été récolté, représentant l'échantillon protéique non purifié.

La purification de la protéine a été effectuée en utilisant les billes de glutathion-Sépharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech) qui ont une forte affinité pour la GST, selon les recommandations du fournisseur. La protéine recombinante GST-P97c a été soit directement éluée ou clivée en phase solide pour séparer la rP97c de la GST. L'éluion a été réalisée en présence du glutathion réduit à 20 mM. Cette molécule provoque un déplacement de l'équilibre enzyme-substrat par compétition. La protéine de fusion peut alors se fixer soit sur le glutathion lié aux billes d'agarose soit au glutathion réduit libre. L'ajout du glutathion réduit favorise le décrochage de la protéine de fusion des billes. Une centrifugation à faible vitesse (500 x g) permet de séparer le culot de billes du surnageant contenant la protéine de fusion. Des aliquots ont été gardés à -70°C, représentant la protéine de fusion GST-P97c non clivée.

Le clivage a été effectué en présence de 20 U de thrombine pendant 16 heures à TP. La P97c recombinante a été dialysée contre le PBS puis conservée à -70°C. Afin de l'utiliser dans les tests de prolifération lymphoblastique et d'ELISA, la rP97c a été détoxifiée pour éliminer ou réduire les endotoxines bactériennes. Cette étape a été réalisée en utilisant le kit commercial « Detoxi-Gel™ Endotoxin Removing Gel » (Pierce, Rockford, IL, USA). Les échantillons ont été aliquotés puis gardés à -70°C. Finalement, la protéine ainsi purifiée a été dosée par la méthode du bleu de Coomassie (Bradford, 1976) en utilisant le réactif G250 (Quick™ start, Bradford Dye Reagent, Bio-Rad Laboratories Inc, CA, USA). La BSA (Bovine Serum Albumin) a été utilisée comme protéine standard et préparée aux concentrations de 0 à 2 mg/ml. Les essais ont été réalisés en triplicata dans une microplaque à 96 puits et la densité optique a été lue à 595 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (Bio-tek, Instruments Inc.). Au final, la

concentration de la protéine a été estimée à 1,2 mg/ml par rapport à la courbe standard de la BSA.

5. Construction d'adénovirus recombinants non répliatifs

5.1. Construction du vecteur de transfert recombinant

Le gène codant pour la P97c a été amplifié par PCR à partir du plasmide pGEX4T1/P97c en utilisant les amorces désignées :

pAdP97cBgIII(F) :5'-GGAAGATCTGCCACCATGAATTCGGGGCCTTTAAATCC-3'.

pAdP97cBgIII(R) :5'-GGAAGATCTTTATTTAGATTCTGGTTCCTC-3'.

Ces amorces s'hybrident aux extrémités 5' et 3' du gène, respectivement. Elles ont été synthétisées par la compagnie Alpha DNA (Alpha DNA, Montréal, Qc, Canada). Elles contiennent le site de restriction *BgIII* (en souligné) pour l'insertion du gène dans le vecteur pAd. Le motif consensus de Kozak (*GCCACC*) (Kozak, 1987) a été introduit en amont du codon d'initiation de la transcription (ATG) afin de permettre une meilleure expression de la P97c dans les cellules eucaryotes. Avant les sites *BgIII*, trois nucléotides (extra-bases) ont été rajoutés pour faciliter le clivage du produit de PCR par l'enzyme.

Le mélange réactionnel de PCR était composé de 100 ng d'ADN pGEX4T1/P97c, 200 µM de dNTP, 1X de tampon ThermoPol, 25 pmol de chaque amorce, 1 unité de VentR ® DNA Polymerase (New England BioLabs Ltd, Pickering, Ontario, Canada), dans un volume final de 100 µl. Les étapes d'amplification ont été effectuées dans le thermocycleur «PTC-100TM programmable Thermal Controller» (MJ Research Inc., Watertown) programmé comme suit : une étape de dénaturation initiale (94°C, 5 min), suivie d'une série de 30 cycles (dénaturation (94°C, 45 s), hybridation (60°C, 45 s), élongation (72°C, 2 min)), une étape d'élongation additionnelle de 10 min à 72°C et une étape de refroidissement à 4°C. Le produit d'amplification de PCR (1676 pb) a été purifié à partir d'un gel d'agarose de 1% en utilisant le kit commercial «QIAquick PCR Purification Kit» (Qiagen Inc., Mississauga, Ontario, Canada). Le produit PCR ainsi purifié a été digéré par *BgIII*. Le vecteur pAd a été linéarisé par la digestion avec *BgIII* et

BamHI puis déphosphorylé. Cette digestion supprime le gène codant pour le GFP afin de permettre la sélection rapide des vecteurs recombinants pAdP97c par immunofluorescence indirecte (IFI) sans interférence de l'auto-fluorescence de la GFP. À la fin des digestions, les deux produits ont été purifiés à partir d'un gel d'agarose (1%) à l'aide du kit commercial «QIAquick Gel extraction Kit». Leur concentration a été visuellement estimée sur un gel d'agarose (1%) en comparant leur intensité, sous un éclairage UV, avec celle des fragments d'ADN du marqueur de poids moléculaire «High DNA Mass™ Ladder» ou «Low DNA Mass™ Ladder» (Gibco-BRL).

L'insertion du gène p97c dans le vecteur pAd aux sites *BglIII/BamHI* (**figure 9A**) a été effectuée en tenant compte du ratio molaire insert/vecteur de 2 ou 3. Les mélanges de ligation étaient composés d'ADN, de tampon de la ligase (1X), d'ATP (0,5 mM), et d'une de T4 DNA ligase (New England Biolabs). Les réactions ont été effectuées dans un volume final 10 µl puis incubées à TP pendant au minimum 4 heures. Par la suite, 5 µl du produit de ligation ont été utilisés pour transformer les bactéries *E. coli* DH5α, lesquelles ont été par la suite étalées sur les pétris contenant du milieu LB agar + 100 µg/ml d'ampicilline.

Puisque le clonage du gène p97c dans le vecteur pAd a été effectué avec les enzymes compatibles, la première sélection a consisté à identifier les clones recombinants pAdP97c orientés dans le sens de la transcription. Pour ce faire, l'ADN plasmidique a été extrait à partir d'une mini-culture de colonies bactériennes par la méthode classique de lyse alcaline (Sambrook *et al.*, 1989). L'identification des clones bien orientés a été réalisée en utilisant la technique classique de digestion avec les enzymes de restriction.

Pour sélectionner les plasmides pAdP97c exprimant la P97c, les cellules 293A, mises en cultures dans une microplaque à 96 puits, ont été transfectées, tel décrit dans la section 5.2, avec l'ADN plasmique des clones choisis lors de la première étape de sélection. L'expression de la P97c a été analysée par IFI. Parmi les clones qui se sont avérés positifs, un seul a été choisi pour la vérification de l'expression de la protéine par

immunobuvardage de type Western. Cela a nécessité la préparation de grandes quantités d'ADN plasmidique (Maxi-préparation) et celle-ci a été effectuée à l'aide du kit commercial «Qiagen Maxiprep» (Qiagen Inc.). La concentration d'ADN plasmique a été estimée à l'aide du spectrophotomètre GenQuant RNA/DNA Calculator (Amersham Pharmacia). Expérimentalement, il est à assumer qu'une solution aqueuse d'ADN double brin de 50 ng/μl donne une valeur d'absorbance à 260 nm égale à 1 (Sambrook *et al.*, 1989). Ainsi, il est possible de déterminer la concentration «approximative» de la solution d'ADN double brin en multipliant la valeur d'absorbance à 260 nm par 50 ng/μl et facteur de dilution.

5.2. Recombinaison homologue et purification des plages de lyse

Les AdV recombinants ont été générés en utilisant la méthode de transfection/infection décrite par Elahi *et al.*, (2002) tel que schématisé à la **figure 9B**. Un jour avant la transfection, 1×10^6 cellules 293A ont étéensemencées dans 5 ml de milieu DMEM dans un pètri de 60 mm de diamètre, jusqu'à une confluence de 70 à 80%. Par la suite, elles ont été transfectées avec le pAdP97c qui a été tout abord linéarisé par la digestion avec l'enzyme *PacI*. Le mélange transfectant a été préparé en mélangeant 5 μg du plasmide linéarisé avec 15 μg de PEI (polyéthylénimine, Polysciences Inc., USA), rapport 1:3, dans 200 μl de milieu DMEM sans sérum. Le mélange a ensuite été incubé pendant 15 min à TP puis déposé goutte-à-goutte sur les cellules dans 2 ml de milieu DMEM complet. Le lendemain, les cellules ont été lavées avec du PBS stérile, infectées avec l'AdV5ΔE1ΔE3ΔPS à une MOI de 1. Elles ont été incubées pendant 4 jours afin de maximiser le taux de recombinaison homologue. Les cellules ont ensuite été lysées en effectuant 3 cycles de congélation/décongélation (à - 70 °C et à 37 °C) (**Figure 9C**). Le lysat cellulaire a été clarifié par centrifugation. Le surnageant a été récolté pour la purification d'AdV5 recombinants par la technique de plage de lyse. Pour l'obtention d'un AdV5 recombinant exprimant la GFP, le plasmide parental a été utilisé et les mêmes

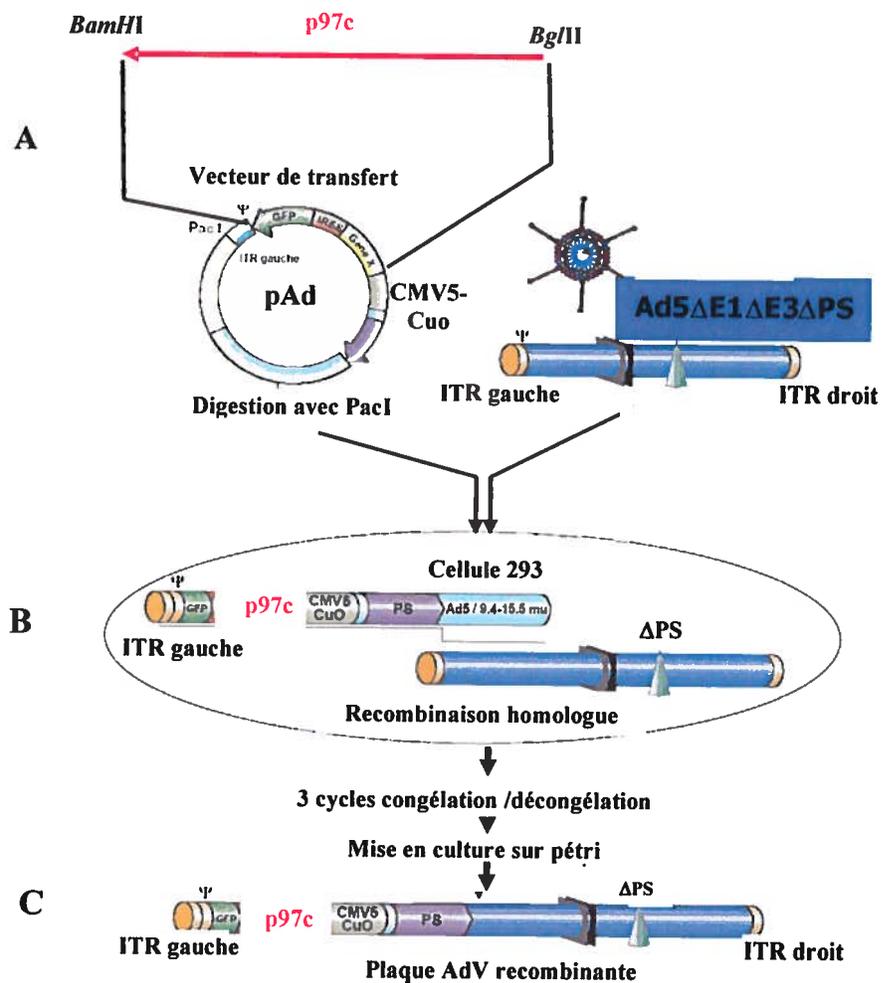


Figure 9. Étapes de la construction de l'adénovirus recombinant non répliatif rAdP97c. A, clonage du gène P97c, après amplification par PCR, aux sites *Bgl*III-*Bam*HI du vecteur pAd pour obtenir le vecteur de transfert recombinant pAdP97c; B, transfection et infection des cellules 293A pour la recombinaison homologue entre le vecteur pAdP97c et l'AdV5 non répliatif (AdV5ΔE1ΔE3ΔPS); C, obtention du virus vecteur rAdP97c à partir des plaques de lyse.

étapes ont été suivies. Le vecteur, désigné rAdGFP, a été utilisé comme un contrôle négatif lors d'immunisation de souris et lors des analyses de l'expression de la P97c.

Pour l'obtention des plages de lyse, les cellules 293A (2×10^5 cellules/puits) ont été cultivées dans les plateaux de 6 puits (BD Biosciences Inc., USA). Le lendemain, elles ont été infectées avec des dilutions en série (10^1 à 10^5 dans 1 ml de milieu DMEM) des surnageants obtenus ci-haut. Les puits non infectés ont été inclus comme contrôles négatifs. Après 6 heures d'adsorption à 37 °C et 5% de CO₂, le milieu a été enlevé, puis les cellules ont été recouvertes avec 3 ml de DMEM contenant 2% HEPES et 1,25% d'agarose «Seaplaque» (Mandel Scientific, Guelph. ON). Les plateaux ont été laissés sous une hotte biologique jusqu'à la solidification du milieu puis remis en incubation à 37 °C et 5% de CO₂ pour au moins une semaine, jusqu'à l'apparition de plages de lyse. Dès lors, les plages ont été aspirées à l'aide d'un embout (de 200 µl) puis resuspendues dans 500 µl de milieu DMEM complet. Chaque plage de lyse a été éluée pendant 24 heures à 37 °C dans un microtube contenant 500 µl de milieu DMEM complet. Après centrifugation, les surnageants ont été récupérés et conservés à -70 °C. Afin de vérifier l'expression de la P97c par les virus recombinants (rAdP97c) purifiés par plage de lyse, 50 µl de chaque plage de lyse ont été utilisés pour ré-infecter les cellules 293A dans une microplaque à 96 puits (BD Biosciences Inc.). Après 48 heures, les cellules ont été fixées pour effectuer l'IFI. Les plages de lyse contenant le GFP (rAdGFP) ont été directement sélectionnées après observation au microscope à épifluorescence. Pour chacune des constructions, rAdP97c et rAdGFP, une plage de lyse a été retenue et assujettie à deux étapes additionnelles de purification par plage de lyse. Avant de passer à l'étape de la production en grandes quantités du virus recombinant, l'expression de la P97c a été vérifiée par immunobuvardage de type Western.

5.3. Production et purification d'adénovirus recombinants

Les étapes d'amplification d'AdV5 recombinants non répliatifs ont été effectuées tel que résumé à la **figure 10**. À chaque étape d'amplification, les cellules infectées ont

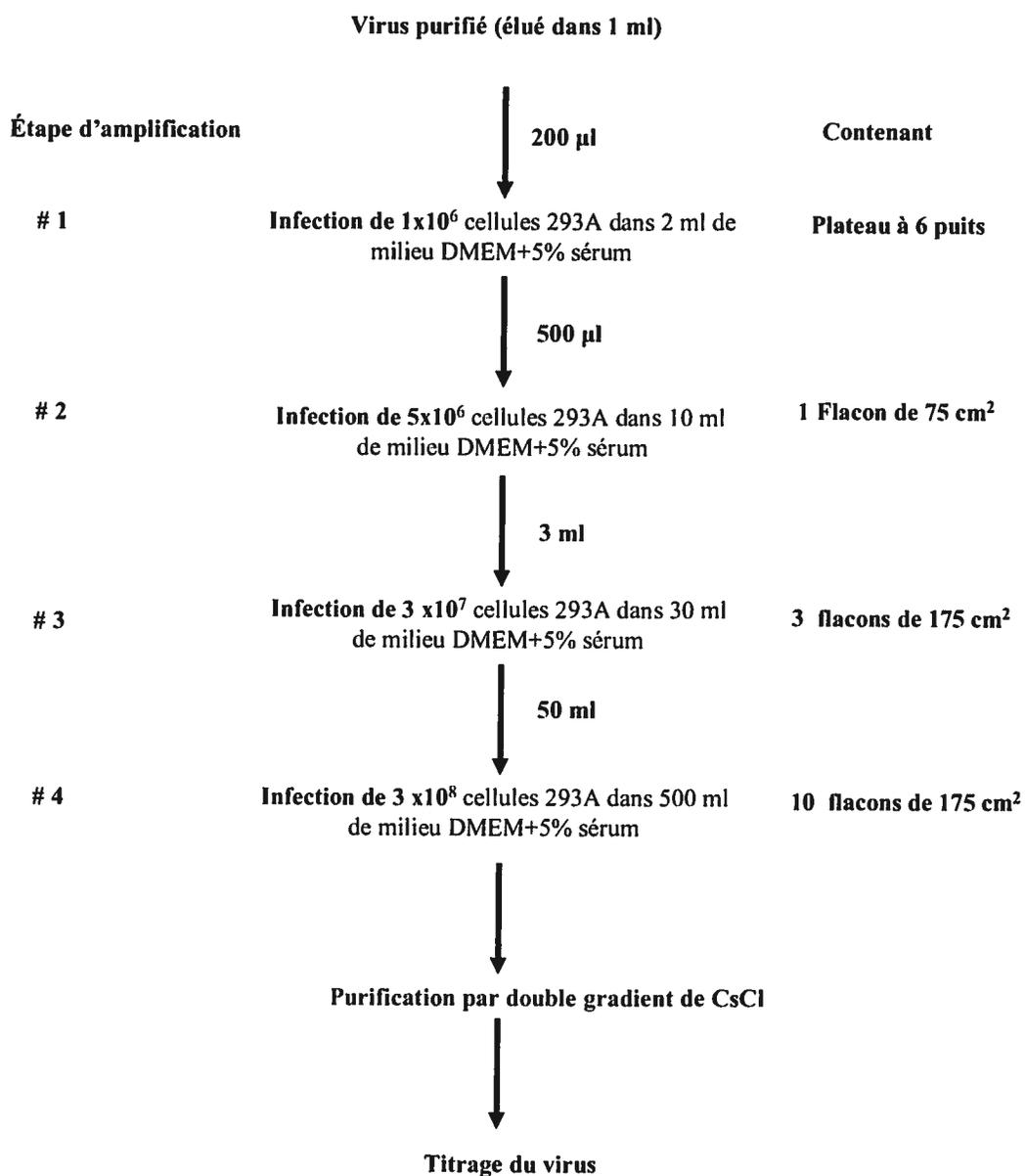


Figure 10. Étapes d'amplification l'adénovirus recombinant non répliatif rAdP97c

été incubées jusqu'à l'observation de l'effet cytopathique. Les particules virales ont été libérées des cellules par 3 cycles de congélation/décongélation. Le lysat contenant les particules virales a été recueilli après centrifugation à 8,000 x g pendant 10 min. À l'étape finale, 500 ml de culture dans les flacons de 150 cm² ont été produits. Après centrifugation, les culots cellulaires ont été resuspendus dans un volume total de 125 ml (répartis dans différents tubes) puis soumis à 3 cycles de congélation/décongélation. Finalement, les surnageants ont été récupérés et gardés à - 70 °C jusqu'à la purification des particules virales. La purification des virus recombinants a été effectuée sur gradients de chlorure de césium (CsCl).

Préparation des solutions de CsCl :

- CsCl de densité 1,4 : dissoudre 53g de CsCl dans 87 ml dans du Tris-HCl (10 mM, pH 7.9).
- CsCl de densité 1,2 : dissoudre 26,8g de CsCl dans 92 ml dans du Tris-HCl (10 mM, pH 7.9). Les deux solutions ont été autoclavées à 121 °C pendant 15 min.

Les étapes de purification ont été réalisées en utilisant les tubes d'ultracentrifugation en polyallomère et une centrifugeuse équipée d'un rotor SW28 (Beckman Instruments, Inc.). Toutes les manipulations ont été effectuées sous une hotte biologique à flux laminaire. Les virus ont tout d'abord été semi-purifiés sur un gradient discontinu de CsCl. Ce gradient a été préparé en coulant lentement 6 ml de CsCl de densité 1,2 sur 8 ml de CsCl densité 1,4. Approximativement 20 ml du stock viral ont été ajoutés très lentement au dessus du gradient (pour ne pas mélanger les interfaces). Les tubes ont été ensuite centrifugés à 23000 x g à 4 °C pendant 90 min. La bande virale, visible sous forme d'anneaux blancs, a été aspirée à l'aide d'une aiguille de 20 G. La deuxième étape de purification a été effectuée sur un gradient continu de CsCl de densité 1,4 à 1,2. Par la suite, 8 ml du virus semi-purifié, préalablement dilué dans du Tris-HCl (10 mM, pH 7.9), ont été ajoutés au gradient continu en prenant les mêmes précautions qu'auparavant. Après centrifugation à 23000 x g à 4 °C pendant 16 heures, les virus purifiés ont été récupérés tel que décrit ci-dessus. Afin d'éliminer le CsCl, les préparations virales ont été

dialysées contre le PBS (3 X 1 litre), en utilisant une membrane de dialyse ayant un « cut off » de 6 à 14 kDa (Spectra/Por® dialysis membrane, Fisher Scientific). Au final, un volume de 5 ml de virus purifié a été récolté et conservé à - 70 °C..

5.4 Titrage d'adénovirus recombinants

Le titrage des AdV recombinants purifiés a été effectué en utilisant la méthode de TCID₅₀ (50% tissue culture infectious dose ou une dose infectant 50% des puits). Un jour avant l'infection, les cellules 293A ont été cultivées dans les plateaux à 96 puits à raison de 10⁴ cellules/puits. Par la suite, elles ont été infectées avec 100 µl de dilutions en série (dilutions 10⁻² à 10⁻¹²) de virus. Les puits contenant les cellules non infectées ont servi de contrôles négatifs. Après 10 jours d'incubation à 37 °C et à 5% CO₂, les cellules ont été observées au microscope inversé, en contraste de phase, et les puits montrant un effet cytopathique ont été notés. Finalement, le titre viral a été estimé selon l'équation de Karber :

$$\text{Log}_{10} \text{ dose médiane} = (X_0) - (d/2) + d\Sigma(r_i/n_i) \text{ ou Titre (TCID}_{50}/\text{ml}) = 10^{1+d(\Sigma(r_i/n_i) - 0,5)}.$$

X_0 = log₁₀ de la valeur réciproque de la dilution la plus basse à laquelle tous les inoculums d'épreuve sont positifs (= 2 dans notre étude).

d = log₁₀ du facteur de dilution (c'est-à-dire la différence entre les intervalles des logarithmes de dilution).

n_i = nombre d'inoculums d'épreuve utilisés à chaque dilution (compte tenu des pertes accidentelles).

R_i = nombre d'inoculums positifs d'épreuve (sur n_i).

$\Sigma(r_i/n_i) = S(P)$ = Somme de la proportion d'épreuves positives commençant à la dilution la plus basse et donnant 100 pour cent de résultats positifs. La sommation commence à la dilution X_0 .

Il à est mentionner que lorsqu'on utilise la méthode de Karber, il ne faut pas oublier que la variation aléatoire du nombre d'inoculums positifs de culture entraînera des écarts faibles mais inconnus par rapport aux valeurs réelles des dilutions de points finals. Ces écarts ne seront importants que si l'on utilise un petit nombre d'inoculums par dilution. Il

peut également y avoir de légères inexactitudes découlant de la méthode d'estimation elle-même, mais il a été démontré que dans l'ensemble, ces inexactitudes sont plus faibles avec la méthode de Karber qu'avec d'autres méthodes comparables (par exemple la formule de Reed-Muench).

6. Vérification de l'expression de la P97c

6.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du SDS (SDS-PAGE)

Lors d'un SDS-PAGE, les protéines sont dénaturées en présence d'un agent réducteur, le β -mercaptoéthanol qui rompt les ponts disulfures et d'un détergent anionique fort, le SDS, qui noie complètement les charges négatives des protéines (Laemmli *et al.*, 1970). En conséquence, les protéines perdent leur structure tridimensionnelle et deviennent sous forme monomériques de charge globale négative. La séparation des protéines s'effectue dans un système discontinu constitué de deux parties : la première migration se fait dans le gel concentrateur «stacking gel» qui contient des puits dans lesquels sont chargés les échantillons et qui permet une migration en fonction de la charge. La seconde migration se fait dans le gel séparateur «running-gel» où les protéines seront séparées en fonction de leur masse moléculaire.

Dans cette étude, le gel concentrateur a été préparé à 4% et le gel séparateur à 12%. Les extraits protéiques ont été mélangés à un volume égal de tampon Laemmli (Laemmli *et al.*, 1970) de concentration 2X (4% de SDS, 20% de glycérol, 10% de β -mercaptoéthanol, 0,1% de bleu de bromophénol et 125 mM de Tris-HCl pH 6,8). Les échantillons ont été chauffés dans l'eau bouillante pendant 5 min puis immédiatement refroidis sur la glace. Après les avoir déposés dans les puits, la première migration électrophorétique a été effectuée à 100 V pendant 20 min. Par la suite le voltage a été augmenté à 120 volts pendant 1 heure. Les migrations ont été réalisées dans le «Mini-PROTEAN® II CELL» (Bio-Rad) et dans un tampon de séparation (25 mM Tris-base, 250 mM glycine, 0,1% SDS). Après migration, la révélation des protéines a été faite en colorant le gel, pendant 30 à 40 min sous agitation, dans une solution composée de 0,2%

de bleu de Coomassie G-250, de 50% de méthanol et de 10% d'acide acétique. Par la suite, le gel a été lavé plusieurs fois avec une solution décoloration composé de 20% de méthanol et de 10% d'acide acétique.

6.2. Immunobuvardage de type Western

Après leur séparation sur le gel de SDS-PAGE, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose de porosité 0,45 μm (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) dans le tampon de transfert (Tris-base 25 mM, glycine 250 mM, méthanol 20%). Le transfert a été réalisé à 100 V pendant 1 heure dans un bac contenant de la glace. Par la suite, la membrane a été immédiatement incubée dans une solution de blocage (PBS 1X, 0,05 % Tween 20, 5% de lait en poudre) toute la nuit à 4 °C. Après une série de 3 lavages de 5 min chacun dans du PBST (PBS 1X plus 0,05 % Tween 20), la membrane a été incubée en présence du surnageant d'hybridome de l'AcMo 8H4-G6, pendant 1 heure à température pièce (TP). Après 3 lavages comme indiqué ci-haut, elle a ensuite été incubée en présence d'un AcMo anti-IgG de souris couplé à la peroxydase de Raifort (HRP) (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) lequel a été dilué à 1:2000 dans du PBST. Après 1 heure d'incubation à TP, la membrane a été de nouveau lavée 3 fois dans du PBST puis une fois dans du PBS. Finalement, les bandes immunoréactives ont été détectées avec une solution de révélation contenant 0,005% de 4-chloronaphtol (4-CN) et 0,015% de peroxyde d'hydrogène dans du PBS. Exceptionnellement, la révélation a été effectuée à l'aide du kit ECL (Amersham Biosciences Inc) lequel a l'avantage d'être plus sensible que la coloration au 4-CN.

6.3. Immunofluorescence indirecte

Les cellules transfectées ou infectées ont tout d'abord été rapidement lavées dans du PBS. Par la suite, elles ont été recouvertes avec un excès de solution de fixation composée de méthanol et d'acétone (1:1 volume/volume) puis laissées à 4°C pendant au moins 30 min. Cette étape de fixation provoque la précipitation des protéines et la

désintégration des membranes cellulaires permettant ainsi aux anticorps de se fixer aux protéines intracellulaires de manière spécifique. La solution de fixation a été retirée et les plateaux ont été laissés à TP jusqu'à l'assèchement complet. Par la suite, les cellules ont été réhydratées avec du PBS puis incubées en présence du surnageant d'hybridome de l'AcMo 8H4-G6 pendant 1 heure à 37°C. Après 3 lavages dans du PBST, les cellules ont été recouvertes d'une solution d'anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé au FITC (Sigma-Aldrich) dilué à 1:500 dans le PBST. Après 1 heure d'incubation à 37°C, les cellules ont été lavées 3 fois dans du PBST puis recouvertes d'une mince couche de PBS. Finalement, la fluorescence a été visualisée et photographiée à l'aide du microscope à épifluorescence (Leica; Leitz, Wetzlar, Germany).

7. Vaccination de souris

7. 1. Protocole expérimental et échantillonnage

Les souris BALB/c femelles (âgées de 7 à 8 semaines), provenant des laboratoires Charles River Laboratories (Montréal, Québec, Canada), ont été utilisées lors de l'étude. Les manipulations sur les souris ont été réalisées au centre de Biologie Expérimentale de l'INRS-Institut Armand-Fappier (Laval, Québec, Canada) selon le protocole approuvé par le Comité institutionnel des soins aux animaux et de leur utilisation (CISAU). Dès leur réception, les animaux ont été répartis dans les cages et acclimatés à leur nouvel environnement pendant une semaine. Par la suite, les souris ont été traitées de la manière suivante :

- 5 souris ont été immunisées avec le vecteur rAdP97c par voie intranasale.
- 5 avec le vecteur rAdP97c par voie intramusculaire.
- 5 autres avec le vecteur rAdGFP par voie intranasale.
- et les 5 restantes avec le vecteur rAdGFP par voie intramusculaire.

Les souris ont été immunisées deux fois : la première dose a été injectée au jour 0 (J0) et la seconde au J30 avec la même dose et par la même voie. Pour les immunisations par la voie intranasale, les animaux ont été anesthésiés par inhalation brève d'isoflurane.

Approximativement 20 μl de PBS contenant 5×10^7 TCID₅₀ du virus ont été déposés goutte-à-goutte dans chaque narine. Les injections intramusculaires (50 μl de PBS contenant 5×10^7 TCID₅₀ du virus) ont été effectuées au niveau du quadriceps caudal des pattes postérieures à l'aide d'une aiguille 26G. Pour ce faire, la peau du muscle a été tout d'abord recouverte d'alcool à 70 °C, ce qui a pour avantage de le désinfecter et de bien dégager la zone d'injection. Tous les animaux ont été euthanasiés au J60 post-vaccination par inhalation de CO₂.

Des prélèvements sanguins ont été effectués sur des souris avant les immunisations (J0) et aux J14, 30 et 60 post-immunisation au niveau du sinus retro-orbital à l'aide d'une aiguille 21 G. Les sérums ont été récupérés des échantillons sanguins, après une centrifugation à 5000 x g pendant 15 min, puis conservés à - 20 °C jusqu'à analyse ultérieure.

Les lavages broncho-alvéolaires (LBA) ont été réalisés à la fin de l'expérience, soit à J60 post-immunisation. Pour ce faire, après ouverture de la cage thoracique, un cathéter de 0,58 mm de diamètre a été introduit dans la trachée. Par la suite, 500 μl de PBS contenant 5 mM EDTA ont été injectés dans les poumons. Les LBAs recueillis ont été centrifugés et les surnageants ont été conservés à - 20 °C.

7.2. Détection des anticorps anti-P97c.

La présence des anticorps anti-P97c dans les sérums et les LBAs a été examinée par immunobuvardage de type Western comme décrit dans la section 6.2, mais en utilisant les sérums (dilués 1 :200 dans du PBST contenant 2% de BSA (PBSTB)) des animaux immunisés comme anticorps primaires, et par ELISA indirect. Pour la détection des anticorps anti-P97c par ELISA, la rP97c, à une concentration finale de 5 $\mu\text{g/ml}$ (50 pg/puits), a été diluée dans du PBS puis fixée aux puits d'un plateau à 96 puits (ICN Biomedicals). Les plateaux ont été incubés toute une nuit à 4°C. Par la suite, ils ont été lavés 3 fois avec du PBST avant d'être saturés avec 200 μl de PBSTB (tampon de

blocage) afin de bloquer les sites libres présents dans les puits. Après 2 heures d'incubation à TP, les plateaux ont été à nouveau lavés 3 fois puis incubés en présence de 100 µl du pool de sérum (dilué 1 :200) ou de LBA (dilué 1 :50). Ces dilutions ont été effectuées dans du PBSTB. Après incubation pendant 2 heures à 37 °C, les plateaux ont été à nouveau lavés; 100 µl IgG ou d'IgA anti-souris conjuguée au HRP (Sigma-Aldrich) ont été ajoutés. Pour la quantification d'isotypes d'IgG, 100 µl d'anti-IgG1, IgG2a, IgG2b ou IgG3 de souris (Boehringer Mannheim) ont été additionnés. Les plateaux ont été incubés pendant 1 heure à 37°C. Après les lavages, les puits ont été rincés avec 300 µl de PBS puis 100 µl du substrat 3, 3', 5, 5' tétraméthylbenzidine (TMB) (Sigma-Aldrich) ont été introduits dans chaque puits. Les plateaux ont été laissés à l'abri de la lumière jusqu'à l'apparition de la couleur bleue. Pour arrêter le développement de la coloration, 50 µl de H₂SO₄ 1N ont été ajoutés. La DO a été lue à 405 nm (DO_{405 nm}) à l'aide d'un lecteur de microplaque (Biotek Synergy HT, Bio-tek, Instruments Inc). Tous les tests ELISA ont été effectués en duplicata et les résultats ont été exprimés en DO_{405 nm} ± l'écart type.

7.3. Test d'inhibition de croissance de *M. hyopneumoniae* in vitro

Contrairement à d'autres bactéries, la croissance des mycoplasmes peut être inhibée par des anticorps spécifiques. Alors nous avons utilisé cette propriété pour voir si les anticorps anti-P97c induits suite à la vaccination avec le vecteur rAdP97c inhibaient la croissance de *M. hyopneumoniae*. La croissance de ce microorganisme provoque une baisse du pH due à l'acidification du milieu, ce qui se traduit par le changement de la couleur rouge du milieu au jaune orangé et une baisse de la DO.

Pour ce faire, la souche 25934 a été mise en culture dans du milieu Friis (Friis, 1975) contenant 20% de sérum de porc exempt d'anticorps anti-mycoplasme, 5% d'extrait de levure (Gibco-BRL, Nouvelle-Zelande), 0,15 mg/ml de bacitracine, 0,08 mg/ml d'acétate de thallium (Sigma-Aldrich) et 40 µg/ml de rouge de phénol. Ce dernier permet de suivre la croissance de l'agent pathogène. Une série de dilutions décimales dans un volume final 2 ml de milieu a été réalisée pour déterminer le titre du micro-

organisme en culture. Ce titre a été estimé en notant la dernière dilution qui montrait un changement de la couleur du milieu de culture par rapport au milieu sans le microorganisme, et a été exprimé en CCU/ml (color changing units ou unité de changement de couleur). Cent μ l de culture contenant 10^4 CCU/puits du mycoplasme ont été introduits dans les plateaux à 96 puits. Par la suite, 100 μ l d'une série de dilution de sérum (1 :40 a 1 :1280) ou de LBA (1 :10 a 1 :320) provenant des souris immunisées avec le rAdP97c ou le rAdGFP ont été introduits. Les puits avec uniquement du milieu de culture et du mycoplasme ont été inclus comme contrôles négatifs et positifs, respectivement. Les plateaux ont été recouverts avec un film adhésif puis incubés pendant 3 jours à 37 °C. La DO a été lue à 560 nm telle que réalisée dans d'autres études (Chen *et al.*, 2003).

7.4. Analyses statistiques

Les comparaisons des moyennes ont été effectuées en appliquant le test *t* de Student. Le seuil de signification a été fixé à 5%. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées dans Microsoft Excel.

RÉSULTATS

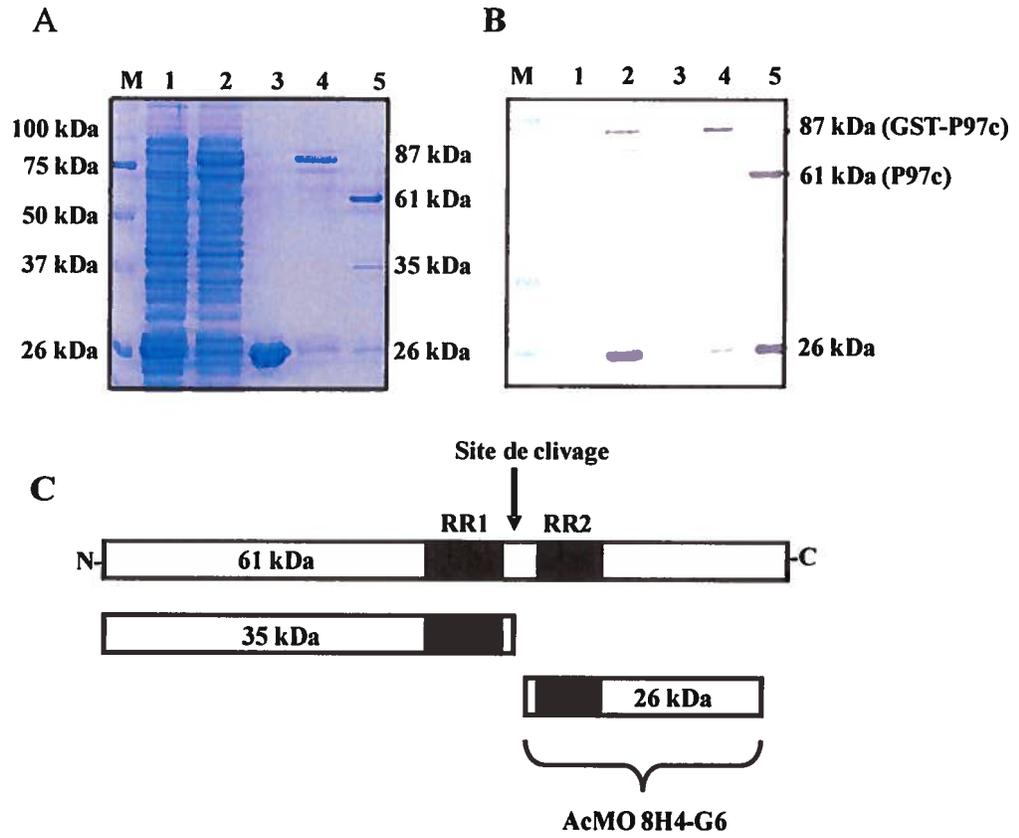
1. Production de la protéine recombinante P97c

Préalablement à la réalisation de ce projet, une portion de 1676 pb du gène de l'adhésine P97 avait été isolée par PCR de la souche ATCC 25934 de *M. hyopneumoniae*. Cette portion contient 4 codons TGA qui codent pour le tryptophane au lieu du codon d'arrêt de la transcription chez les mycoplasmes. Ces codons avaient été mutés en codons TGG afin de permettre l'expression de la protéine correspondante sur sa pleine longueur dans les cellules hétérologues. Cette portion (p97c) code pour une protéine de 61 kDa (P97c) qui renferme les régions RR1 et RR2 de l'adhésine P97 de *M. hyopneumoniae*. Elle avait été aussi clonée dans le vecteur d'expression pGEX4T1 pour permettre son expression sous forme de protéine de fusion à la GST (Cheikh Saad Bouh, 2004). Nous avons donc bénéficié de ce plasmide recombinant (pGEX4T1/p97c) pour produire la protéine recombinante P97c (rP97c).

L'ADN du plasmide recombinant pGEX4T1/p97c a été utilisé pour transformer la souche *E. coli* BL21 (DE3)pLys afin d'exprimer la protéine recombinante P97c (rP97c). Suite à l'analyse de l'expression de la rP97c par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie (**figure 11A**), une bande importante migrant à 87 kDa a été visualisée avec le lysat bactérien issu du clone transformé avec pGEX/p97c (**puits 2**) en non avec celui transformé avec pGEX4T1 (**puits 1**). Cette bande correspondait à la masse moléculaire attendue de la protéine de fusion GST-P97c; la GST fait 26 kDa. Elle a été également observée, ainsi qu'une bande discrète d'environ 61 kDa, après la purification de la protéine de fusion GST-P97c (**puits 4**) et non dans le lysat purifié du clone transformé avec pGEX4T1 (**puits 3**). Après digestion enzymatique par la thrombine pour séparer la rP97c de la GST, une bande attendue de 61 kDa correspondant à la P97c a été révélée (**puits 5**), mais également deux bandes additionnelles de 35 et 26 kDa. Ceci suggère que la rP97c a été clivée lors de son expression dans les BL21(DE3)pLys ou durant les étapes de purification. Néanmoins, ces résultats montrent que la production de la rP97c a été effective.

Figure 11. Expression de la P97c dans *E. coli* et illustration schématique du clivage de la P97c. Les bactéries *E. coli*. BL21(DE3)pLys ont été transformées avec le plasmide recombinant pGEX/p97c ou pGEX4T1. Les cultures ont été induites avec 1 mM d'IPTG pendant 3 heures à 37°C. **(A)**, visualisation des protéines sur un gel de SDS-PAGE (12%) après coloration au bleu de Coomassie. **(B)**, révélation des bandes immunoréactives par immunobuvardage de type Western avec un anticorps monoclonal spécifique à la P97c (AcMo 8H4-G6) et par la coloration au 4-chloronaphtol. **Puits 1**, lysat des bactéries transformées avec le plasmide parental pGEX4T1; **puits 2**, lysat des bactéries transformées avec le plasmide recombinant pGEX4T1/p97c; **puits 3**, la GST purifiée; **puits 4**, la protéine de fusion GST-P97c purifiée; **puits 5**, la rP97c séparée de la GST après digestion par la thrombine. M, marqueur de masse moléculaire en kDa. **(C)**, représentation schématique du clivage hypothétique de la P97c. Le clivage se produit entre les régions RR1 et RR2 contenues dans la P97c et génère deux fragments (26 et 35 kDa). L'épitope reconnu par l'AcMo 8H4-G6 serait localisé dans la région RR2.

Figure 11.



L'expression de la rP97c dans la souche *E. coli* BL21(DE3)pLys transformée avec le plasmide pGEX/p97c a été confirmée par immunobuvardage de type Western (**figure 11B**) en utilisant un AcMo spécifique à la P97c (AcMo 8H4-G6). Hormis la bande de 35 kDa, toutes les bandes observées en SDS-PAGE avec les lysats provenant du clone transformé avec ce plasmide ont été révélées (puits 2, 4 et 5). Ces bandes n'ont pas été détectées avec les lysats du clone transformé avec pGEX4T1. Ces résultats, d'une part, confirment que la protéine P97c est clivée et, d'autre part, indiquent que l'épitope de la P97c reconnu par l'AcMo utilisé dans cette étude serait localisé dans le fragment de 26 kDa, donc dans la région RR2 de la P97, tel que schématisé à la **figure 11C**. Le clivage de l'adhésine P97 de *M. hyopneumoniae* a été déjà décrit (Djordjevic *et al.*, 2004).

2. Construction du vecteur de transfert pAdP97c

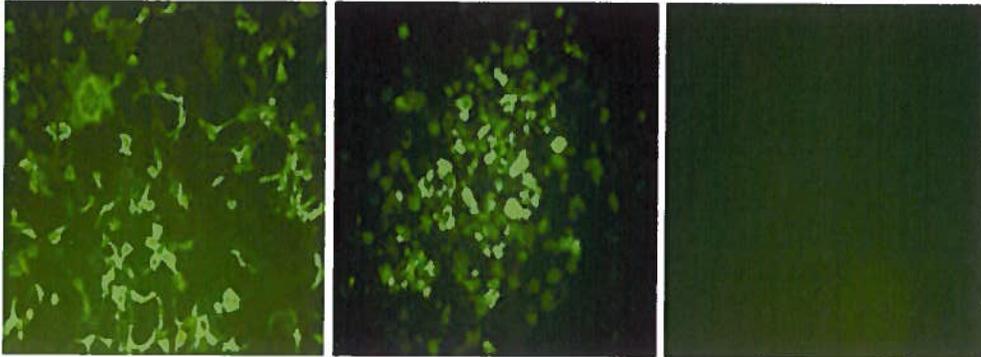
Le gène muté codant pour la P97c a été amplifié par PCR à partir du plasmide pGEX/p97c puis sous cloné dans le vecteur de transfert pAd sous le contrôle du promoteur CMV-CuO, un promoteur fort qui permet l'expression des protéines dans les cellules eucaryotes. L'expression de la P97c par le vecteur de transfert recombinant a été vérifiée en transfectant les cellules 293A. Ainsi, comme le montrent les résultats d'IFI (**figure 12A**), l'expression de la P97c codée par le plasmide pAdP97c a pu être obtenue (panel a). De façon qualitative, il a été possible d'observer en IFI jusqu'à 50-60% des cellules du tapis cellulaire exprimant la P97c. Le lysat cellulaire récolté à partir de ces cellules transfectées a été soumis à l'analyse par immunobuvardage de type Western en utilisant toujours l'AcMo 8H4-G6 (**figure 13A**). Les bandes immunoréactives sur la membrane de nitrocellulose ont été révélées par la technique classique de coloration au 4-chloronaphtol. Tel qu'attendu, la bande de 61 kDa qui correspond à la masse moléculaire de la P97c a été détectée dans le lysat provenant de cellules transfectées avec pAdP97c (**puits 3**) et non dans les cellules témoins (**puits 1**) ou transfectées avec le plasmide parental pAd (**puits 2**). Contrairement aux résultats obtenus chez *E. coli*, la bande de 26 kDa n'a pas été observée.

Figure 12. Détection de l'expression de la P97c dans les cellules eucaryotes par immunofluorescence indirecte. **A**, IFI effectuées sur les cellules 293A 48 heures post-transfection ou post-infection à l'aide d'un AcMo anti-P97c (AcMo 8H4-G6) et d'un AcMo anti-IgG de souris couplé au FITC. **Panel a**, cellules transfectées avec le vecteur de transfert recombinant pAdP97c. **Panel b**, cellules infectées avec rAdP97c; **panel c**, cellules témoins non infectées et non transfectées. **B**, IFI réalisées sur les cellules NPTr 72 heures post-infection à l'aide du mêmes AcMo. **Panel a**, cellules infectées avec rAdP97c ; **panel b**, cellules témoins non infectées.

Figure 12

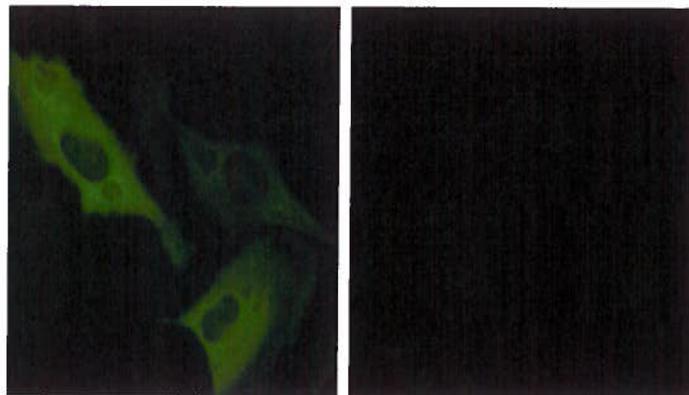
A

Expression de la P97c dans les cellules 293A



B

Expression de la P97c dans les cellules NPTr



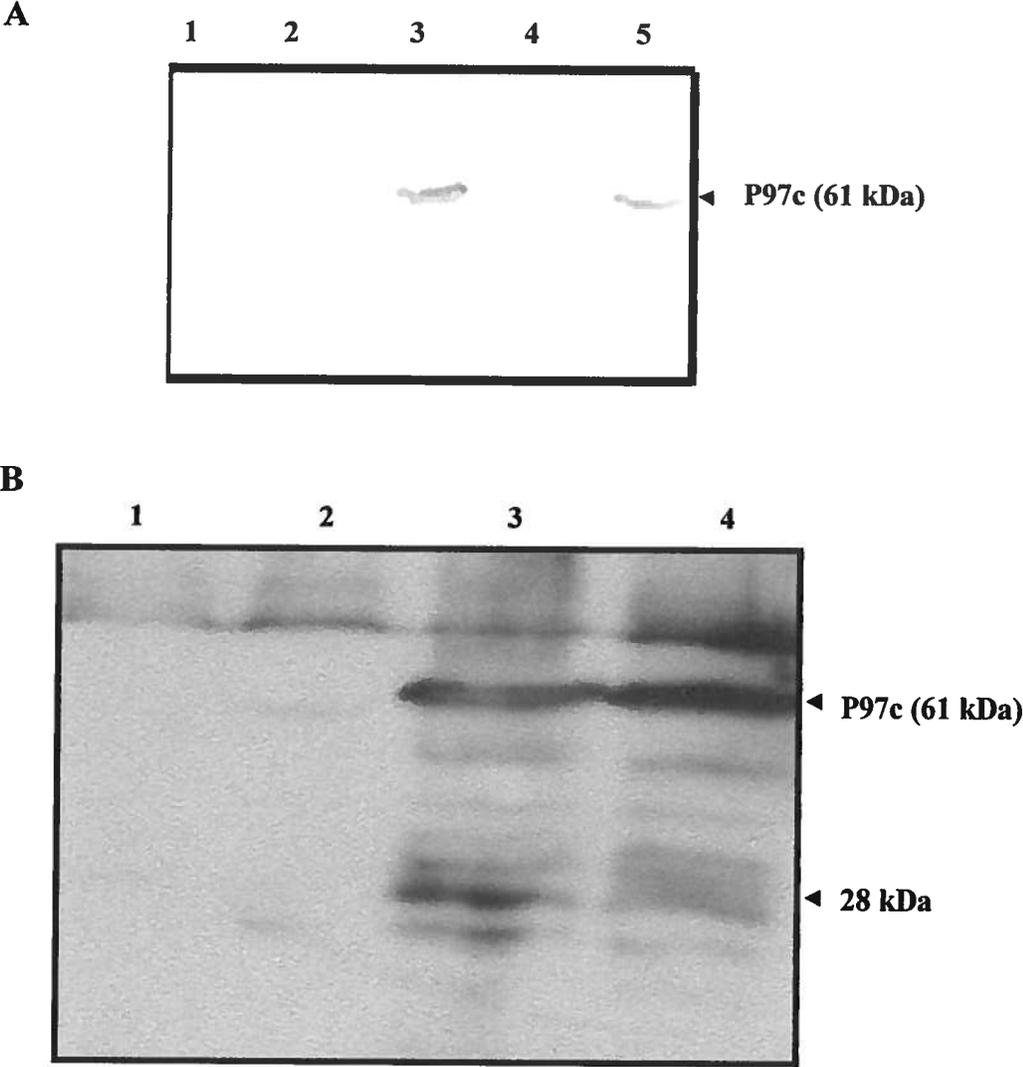
Toutefois, en appliquant une technique de révélation plus sensible, l'ECL, il a été possible de la révéler mais de façon discrète (**figure 13B, puits 3**). Ces résultats suggèrent que le clivage de la P97c peut également se produire dans les cellules eucaryotes.

3. Génération de l'adénovirus recombinant non répliquatif rAdP97c

L'obtention d'un vecteur adénovirus recombinant non répliquatif exprimant la P97c (rAdP97c) a été l'étape cruciale de ce projet car elle a constitué la partie centrale de notre approche vaccinale. Les étapes effectuées pour y parvenir sont décrites dans le Matériel et Méthodes. De manière brève, le vecteur rAdP97c a été obtenu par recombinaison homologue dans les cellules 293A entre le plasmide pAdP97c et le génome viral de HAdV5 non répliquatif (manquant les régions E1 et E3) et le gène PS. A l'intérieur des deux semaines d'incubation, il a été possible de détecter plusieurs plages de lyse. Ces plages résultent de la multiplication des virus qui en se répliquant vont former une série de cercles concentriques, effet cytopathique, grossissant au fur et à mesure de la propagation virale. Elles peuvent être observées à l'oeil nu. Une dizaine des plages de lyses individuelles ont été utilisées pour ré-infecter les cellules 293A. Après l'analyse par IFI, il a été possible d'en identifier plusieurs qui exprimaient la P97c tel que montré à la **figure 12A, panel b**. Ces observations ont été confirmées par immunobuvardage de type Western (**figure 13A**) où la P97c a été révélée dans le lysat des cellules infectées avec le rAdP97c obtenue (**puits 5**) et non dans le lysat de cellules non infectées (**puits 1**) ou infectées avec le virus rAdGFP (**puits 4**). Par ailleurs, en utilisant la technique de révélation ECL, il a été aussi possible de détecter le fragment de 26 kDa comme dans les cellules 293A transfectées avec le pAdP97c (**Figure 13B, puits 4**). Ceci confirme que le P97c est clivée lors de son expression dans les cellules 293A. À défaut de temps et parce que cela ne faisait pas partie des objectifs visés dans ce projet, il ne nous a pas été possible d'approfondir l'étude sur le clivage de la P97c.

Figure 13. Détection de l'expression de la P97c dans les cellules eucaryotes par immunobuvardage de type Western. Les protéines ont été séparées sur un gel de SDS-PAGE (12%) puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les bandes immunoréactives ont été détectées à l'aide de l'AcMo 8H4-G6 et d'un AcMo anti-IgG de souris conjugué au HRP. **(A)**, La révélation des bandes a été réalisée par coloration de la membrane avec le 4-chloronaphtol. **Puits 1**, cellules témoins; **puits 2**, cellules transfectées avec le plasmide parental pAd; **puits 3**, cellules transfectées avec le vecteur de transfert recombinant pAdP97c ; **puits 4**, cellules infectées avec rAdGFP; **puits 5**, cellules infectées avec rAdP97c. **(B)**, Les bandes immunoréactives ont été révélées par chimioluminescence (ECL) et le film autoradiographique a été lavé manuellement. **Puits 1**, cellules témoins ; **puits 2**, cellules transfectées avec le plasmide parental pAd; **puits 3**, cellules transfectées avec le pAdP97c; **puits 4**, cellules infectées avec rAdP97c. Les bandes détectées correspondant à la P97c (61 kDa) et au produit de clivage de 26 kDa sont indiquées à la droite des figures.

Figure 13.



Après avoir construit le vecteur rAdP97c, ce dernier a été amplifié dans les cellules 293A jusqu'à l'obtention du titre visé pour les expériences de vaccination. Après purification sur gradient de CsCl, le virus a été quantifié par la méthode de TCID₅₀. Le titre obtenu pour le vecteur rAdP97c a été de 2×10^{11} TCID₅₀/ml et était sensiblement similaire à celui du virus rAdGFP (3×10^{11} TCID₅₀/ml). Ces titres sont dans la fourchette décrite dans la littérature (Elahi *et al.*, 2002). Pour les essais de vaccination, il était important que le vecteur rAdP97c soit dépourvu d'adénovirus compétent pour la réplication. D'où la nécessité d'effectuer plusieurs cycles de purification du virus recombinant par plage de lyse.

La capacité de rAdP97c d'exprimer la P97c dans cellules porcines a été examinée *in vitro* avec la lignée cellulaire NPTr. Ainsi, comme le montrent les résultats d'IFI (**figure 12B**), l'expression de la P97c a été visualisée dans les cellules NPTr infectées avec le rAdP97c (**panel a**), tandis qu'aucun signal fluorescent n'a été observé dans les cellules non infectées (**panel b**). Par ailleurs, aucun effet cytopathique n'a été observé dans les cellules NPTr infectées avec rAdP97c (données non montrées), indiquant qu'*a priori* le virus rAdP97c produit a été bien purifié et ne contenait pas de virus révertants ou compétents pour la réplication.

4. Induction de la réponse immunitaire humorale par rAdP97c.

4.1. Réponse immunitaire systémique

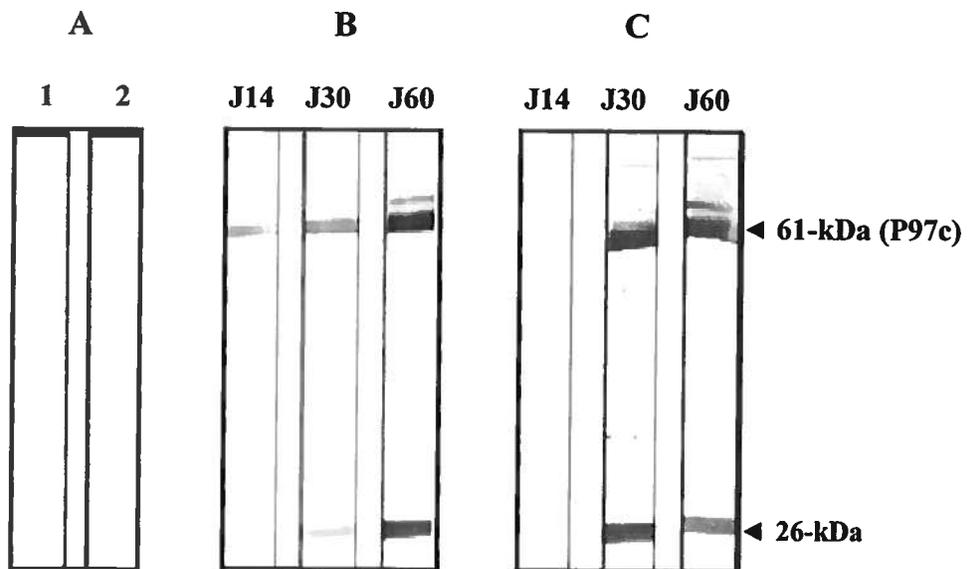
Dans le but d'évaluer le potentiel de notre système vaccinal, les souris BALB/c ont été inoculées avec le vecteur rAdP97c par voie intramusculaire (i.m) ou intranasale (i.n). Les inoculations ont été effectuées aux J0 et J30. Les souris immunisées avec l'adénovirus recombinant rAdGFP ont été utilisées comme contrôles négatifs. Le niveau de la production des anticorps anti-P97c au niveau systémique ainsi qu'au niveau des muqueuses a été quantifié par ELISA.

Les analyses ont été tout d'abord effectuées par immunobuvardage de type Western en utilisant la rP97c comme antigène. Tel qu'attendu, les anticorps IgG anti-P97c n'ont pas été détectés avec les sérums pré-immuns (résultats non présentés) et avec les sérums provenant des animaux immunisés avec le rAdGFP (**figure 14, panel A**). En revanche, ces anticorps ont été détectés dans les sérums des souris immunisées avec rAdP97c aussi bien par la voie intranasale que par la voie intramusculaire (**figure 14, panel A et B**, respectivement) aussitôt que J14 post-immunisation. Ces sérums reconnaissent la P97c complète (61 kDa) mais aussi le fragment polypeptidique de 26 kDa. Il a été surprenant de constater que le fragment de 35 kDa n'ait pas été reconnu. Celui-ci a été pourtant observé en SDS-PAGE (**figure 11A**, puits 5). Ces résultats suggèrent que les épitopes importants de la P97c qui induisent la réponse humorale sont localisés dans la région RR2 tel que schématisé à la figure 12C. Ils suggèrent aussi que le fragment de 35 kDa contenant la région RR1 serait peu immunogène ou ne contiendrait pas les épitopes stimulant fortement les lymphocytes B.

Le niveau des anticorps anti-P97c induits suite à l'immunisation des souris avec le vecteur rAdP97c a été déterminé par ELISA indirect. Comme le montrent les résultats (**tableau 5**), les souris immunisées avec rAdP97c (par voies intranasale et intramusculaire) ont développé une réponse significative ($P < 0.05$) d'IgG anti-P97c aussitôt que J14 post-immunisation comparé aux groupes contrôles. Une différence significative n'a pas été notée entre les deux voies avant le rappel (J14 et J30). Par contre, après le rappel, la voie intramusculaire s'est avérée plus inductive que la voie intranasale. En effet, il a été noté approximativement deux fois plus d'IgG anti-P97c à J60 chez les souris immunisées par voie intramusculaire que chez celles immunisées par voie intranasale. Ces résultats ne sont pas surprenants car il est bien connu que l'immunisation par voie parentérale suscite fortement une immunité systémique, alors que l'immunisation par voie mucoale génère préférentiellement une immunité locale. Par ailleurs, les deux voies d'inoculation du vecteur rAdP97c n'ont pas induit une réponse d'IgA anti-P97c détectable dans les sérums (**tableau 5**, J60). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que ces anticorps sont généralement produits au niveau des muqueuses et sont faiblement détectés au niveau systémique.

Figure 14. Détection des anticorps IgG anti-P97c par immunobuvardage de type Western suite à l'immunisation des souris avec rAdP97c. La rP97c a été séparée sur un gel de SDS-PAGE (12%) puis transférée sur une membrane de nitrocellulose. La membrane a été découpée en lanières lesquelles ont été incubées en présence de sérums (dilués 1:200) provenant de souris BALB/c immunisées avec rAdP97c ou rAdGFP (contrôle négatif). **(A)**, lanière 1, sérum pré-immun (J0) ; lanière 2, sérum de souris immunisées avec rAdGFP. **(B)**, souris immunisées avec rAdP97c par voie intranasale (i.n.); **(C)**, souris immunisées avec rAdP97c par voie intramusculaire (i.m). Les sérums ont été récoltés aux jours 14, 30 et 60 post-immunisation et, tel qu'illustré, ils réagissaient avec la P97c complète (61 kDa) ainsi qu'avec produit de 26 kDa qui résulterait du clivage de la P97c.

Figure 14.



4.2. Réponse immunitaire mucoale

Pour déterminer les niveaux de la réponse des IgG et des IgA anti-P97c provoqués par le rAdP97c au niveau des muqueuses respiratoires, les LBAs ont été réalisés à la fin des expériences d'immunisation de souris, soit à J60 post-immunisation. Comme le montrent les résultats des ELISA (**tableau 5**), des niveaux significatifs ($P < 0.05$) des IgG anti-P97c ont été détectés dans les LBAs de souris inoculées avec rAdP97c que ce soit par voie intranasale ou par voie intramusculaire. Il n'y avait pas de différence considérable entre les deux voies d'immunisation pour les niveaux des IgG. Toutefois, cette réponse a été en faveur de la voie intranasale. Par contre, l'immunisation de souris par voie intramusculaire n'a pas suscité une réponse d'IgA anti-P97c dans les LBAs. En revanche, les souris immunisées par voie intranasale ont développé une réponse significative ($P < 0.05$) des IgA anti-P97c dans les LBAs. Ceci s'expliquerait par le fait que les anticorps IgA sont généralement produits au niveau des muqueuses.

4.3. Profil d'isotypes d'IgG anti-P97c au niveau systémique et mucoale

Il existe différents sous-classes ou isotypes d'IgG : IgG1, IgG2 (a et b) et IgG3, pour lesquelles le profil peut varier suite à la vaccination selon la nature du vaccin. Chez les souris, les IgG1 sont associés à la réponse de type Th2, tandis que la réponse de type Th1 est associée à la production IgG2a, IgG2b et IgG3 (Stevens *et al.*, 1988). Alors, afin de déterminer le type de réponse anti-P97c induit par le rAdP97c, les niveaux de ces isotypes ont été évalués par ELISA dans les sérums et les LBAs collectés à J60 post-immunisation.

Dans les sérums de souris immunisées avec le vecteur rAdP97c, comparativement aux groupes contrôles (souris immunisées avec rAdGFP), les IgG1 et les IgG2a anti-P97c ont été détectés de façon significative ($P < 0.05$), alors que les niveaux d'IgG2b et d'IgG3 n'étaient pas significativement différents de ceux des animaux contrôles (**figure 15 A**). Les souris immunisées avec le vecteur rAdP97c par voie intramusculaire ont produit 4 fois plus d'IgG2a que d'IgG1 tel qu'illustré par le calcul du ratio IgG2a/IgG1 (ratio IgG2a/IgG1 de 4).

Tableau 5. Détection par ELISA des IgG and IgA anti-P97c dans les sérums et les lavages bronchoalvéolaires suite à l'immunisation des souris avec rAdP97c.

Groupes	Sérums				Lavages broncho-alvéolaires			
	J14	J30	J60	J60	IgG	IgA	IgG	IgA
rAdGFP i.n.	0.068 ± 0.003	0.071 ± 0.0049	0.066 ± 0.0063	0.075 ± 0.009	0.071 ± 0.0049	0.075 ± 0.009	0.087 ± 0.009	0.071 ± 0.002
rAdGFP i.m.	0.065 ± 0.002	0.071 ± 0.0063	0.058 ± 0.0014	0.058 ± 0.0014	0.058 ± 0.0014	0.058 ± 0.0014	0.081 ± 0.015	0.067 ± 0.001
rAdP97c i.n.	0.249 ± 0.003 (<i>P</i> = 0.03)*	0.36 ± 0.029 (<i>P</i> = 0.026)*	0.668 ± 0.046 (<i>P</i> = 0.0019)*	0.126 ± 0.028 (<i>P</i> = 0.051)	0.36 ± 0.029 (<i>P</i> = 0.026)*	0.126 ± 0.028 (<i>P</i> = 0.051)	0.781 ± 0.028 (<i>P</i> = 0.0012)*	0.378 ± 0.037 (<i>P</i> = 0.029)*
rAdP97c i.m.	0.261 ± 0.005 (<i>P</i> = 0.04)*	0.487 ± 0.022 (<i>P</i> = 0.0084)*	1.138 ± 0.108 (<i>P</i> = 0.002)*	0.106 ± 0.018 (<i>P</i> = 0.054)	0.487 ± 0.022 (<i>P</i> = 0.0084)*	0.106 ± 0.018 (<i>P</i> = 0.054)	0.587 ± 0.012 (<i>P</i> = 0.01)*	0.096 ± 0.022 (<i>P</i> = 0.154)

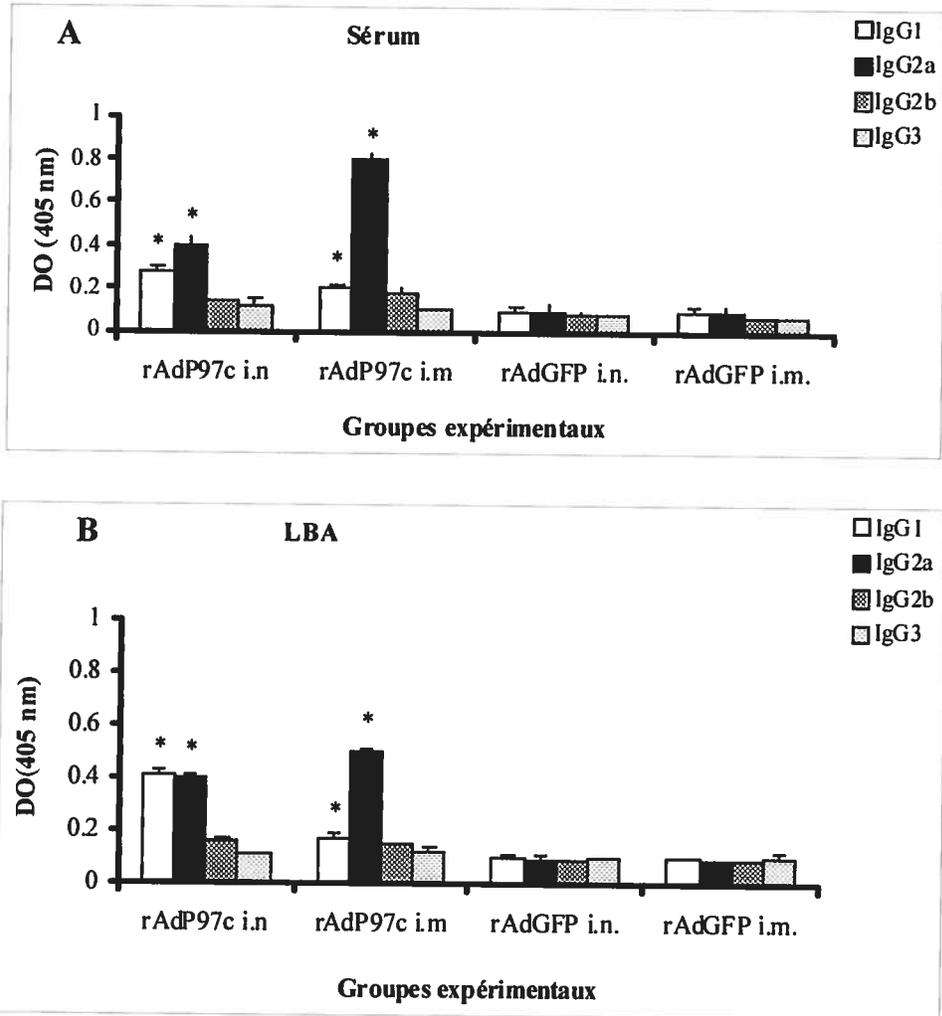
^a, les valeurs représentent la moyenne de la densité optique à 405 nm ± écart type. *P*, valeur de probabilité obtenue après le test *t* de Student.

rAdGFP i.n. et i.m, groupes de souris immunisées avec rAdGFP par voie intranasale ou intramusculaire, respectivement, (contrôles négatifs). rAdP97c i.n. et i.m, groupes de souris immunisées par le vecteur rAdP97c par voie intranasale ou intramusculaire, respectivement. Les sérums et les lavages broncho-alvéolaires (LBA) ont été collectés aux jours (J) indiqués puis combinés. Les sérums ont été dilués à 1:200 et les LBAs à 1:50. Les tests ELISA ont été effectués en duplicata en utilisant la rP97c comme antigène de fixation.

^{*}, différence significative comparée aux contrôles négatifs.

Figure 15. Profil d'isotypes d'IgG anti-P97c dans les sérums et les lavages broncho-alvéolaires suite à l'immunisation des souris avec rAdP97c. rAdGFP i.n. et i.m, groupes de souris immunisées par l'adénovirus recombinant rAdGFP par voie intranasale ou intramusculaire (contrôles négatifs). rAdGFP i.n et i.m, groupes de souris immunisées par le rAdP97c par voie intranasale ou intramusculaire. **(A)**, les sérums dilués 1 :200 et évalués par ELISA pour la présence d'IgG1, IgG2a, IgG2b et IgG3 anti-P97c. **(B)**, les lavages broncho-alvéolaires dilués 1 :50 et évalués par ELISA pour la présence de ces isotypes anti-P97c. Ces deux types d'échantillons ont été collectés au jour 60 post-immunisation et combinés par groupe d'immunisation. Les tests ELISA ont été effectués en duplicata en utilisant la rP97c comme antigène de fixation. Les histogrammes représentent la moyenne de la densité optique (DO) mesuré à 405 nm \pm l'écart type. *, différence significative ($P < 0,05$) comparée aux contrôles négatifs.

Figure 15.



Les animaux immunisés par voie intranasale avec le rAdP97c avaient approximativement des niveaux égaux d'IgG2a et d'IgG1, avec un ratio IgG2a/IgG1 de 1,4. Dans les LBAs de souris immunisées avec le vecteur rAdP97c, l'analyse de ces isotypes anti-P97c a aussi révélé que les IgG1 et les IgG2a étaient dominants (**figure 15B**). Les profils de ces deux isotypes ont été similaires à ceux obtenus avec les sérums. En effet, il y avait approximativement 2 fois plus d'IgG2a que d'IgG1 suite à l'inoculation du du vecteur par voie i.m, tandis que les deux isotypes ont été détectés à des niveaux égaux suite à l'inoculation du vecteur par voie intranasale Ces résultats suggèrent que les réponses anti-p97c induites par vecteur rAdP97c sont modulées par la voie d'immunisation. La voie intramusculaire favorise une réponse de type Th1, alors que la voie intranasale semble susciter une réponse mixte Th1/Th2.

5. Inhibition de croissance de *M. hyopneumoniae* par les anticorps anti-P97c

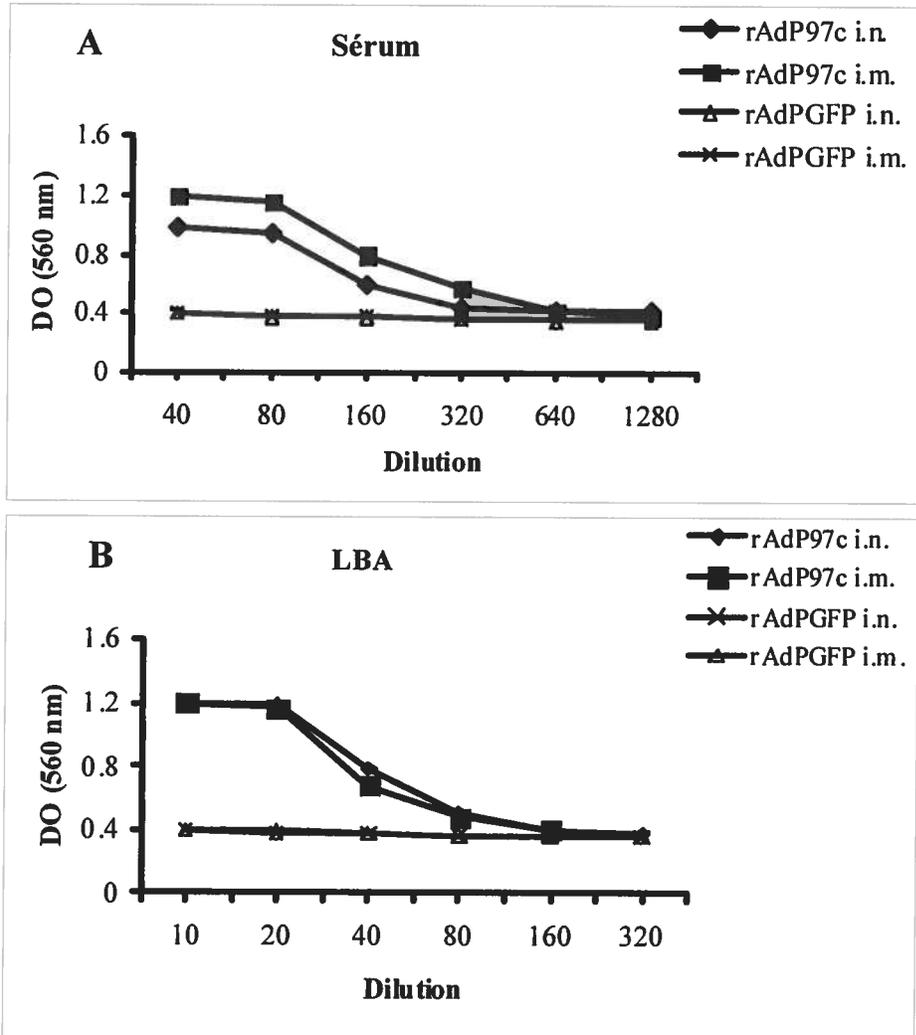
En raison de l'absence de la paroi, les mycoplasmes sont sensibles à la lyse par le complément et, par conséquent, leur croissance *in vitro* peut être inhibée par des anticorps spécifiques (Bredt *et al.*, 1977). La croissance de *M. hyopneumoniae* provoque l'acidification du milieu de culture qui se traduit par le changement de la couleur de l'indicateur de croissance, le rouge de phénol, introduit dans le milieu et par la baisse de la densité optique (Chen *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2005). Alors, nous avons examiné si les anticorps anti-P97c induits par le vecteur rAdP97c chez la souris étaient capables d'interférer avec la croissance de *M. hyopneumoniae*.

Les tests d'inhibition de croissance ont été réalisés en incubant des cellules de la souche ATCC 25934 de *M. hyopneumoniae* en présence de dilutions de sérums et de LBAs provenant de souris immunisées avec le vecteur rAdP97c et de celles immunisées avec rAdGFP. Les cultures sans sérum et sans LBA ont été introduites comme contrôles positifs de la croissance du mycoplasme. Il a été noté que la DO à 560 nm dans les cultures positives baissait considérablement de 1,22 (au jour de l'incubation) à 0,4 après 3 jours d'incubation, indiquant la viabilité des cellules du mycoplasme et leur croissance

durant la période d'incubation (résultats non montrés). Tel que montré à la **figure 16**, l'inhibition de croissance du mycoplasme n'a pas eu lieu en présence des sérums et des LBAs de souris immunisées avec rAdGFP. En revanche, en présence de sérums de souris immunisées avec rAdP97c que ce soit par voie intranasale ou intramusculaire, une inhibition substantielle de la croissance a été observée avec des dilutions sérums allant de 1:40 à 1:160 (**figure 16A**). Ceci suggère que l'effet d'inhibition observé est spécifique à la présence d'anticorps anti-P97c dans ces sérums. Des résultats similaires ont été obtenus en présence des LBAs où les dilutions s'échelonnant de 1:10 à 1:40 ont démontré une activité inhibitrice (**figure 16B**). Ces résultats suggèrent que les anticorps anti-P97c induits par le vecteur rAdP97c sont capables de reconnaître l'adhésine P97 à la surface de *M. hyopneumoniae* et, par conséquent, d'inhiber la croissance du microorganisme de manière dose-dépendante.

Figure 16. Inhibition de la croissance de *M. hyopneumoniae* par les anticorps anti-P97c. Les cellules de la souche ATCC 25934 de *M. hyopneumoniae* (1×10^4 CCU) ont été mises en culture dans un plateau à 96 puits en présence de dilutions en série de sérums (A) ou de lavages broncho-alvéolaires (B) provenant de souris immunisées avec le rAdP97c ou avec le rAdGFP par voie intranasale (i.n.) ou intramusculaire (i.m.). Les cultures ont été incubées pendant 3 jours à 37°C. La croissance ou non du mycoplasme a été déterminée en mesurant la densité optique (DO) à 560 nm, et elle se traduit par la baisse de la DO. Les valeurs correspondent à la moyenne des DO enregistrées \pm écart type. Les résultats montrent que les sérums et les LBAs des animaux immunisés avec le rAdP97c inhibent la croissance du mycoplasme de manière dose dépendante.

Figure 16.



CONCLUSION

Les objectifs de cette première partie expérimentale ont été atteints. Nous avons construit et produit notre vecteur vaccinal, le rAdP97c, et démontré qu'il exprime l'antigène vaccinal (P97c) aussi bien dans les cellules de complémentarité 293A que dans les cellules NPTr indiquant que ce vecteur est capable d'infecter les cellules respiratoires du porc. Nos résultats ont également démontré que suite à son inoculation chez la souris, le vecteur rAdP97c induit une réponse humorale complète contre la P97c qui est à la fois de type Th1 et Th2 tel que mise en évidence par la présence d'IgG1 et d'IgG2a tant au niveau systémique que des muqueuses respiratoires. Ceci est intéressant, car les deux types d'anticorps sont importants pour la protection contre les agents pathogènes bactériens étant donné qu'ils peuvent interagir avec les molécules du complément, provoquer la lyse des bactéries et aussi empêcher leur adhérence aux cellules cibles (Lee *et al.*, 2003). En effet, nos résultats ont démontré, à travers le test d'inhibition de croissance, que les anticorps anti-P97c induits par le rAdP97c sont capables de reconnaître l'adhésine P97 à la surface de *M. hyopneumoniae* pour ainsi inhiber sa croissance *in vitro*.

De manière encore plus intéressante, nos résultats montrent que l'administration du vecteur rAdP97c au niveau des muqueuses respiratoires (par voie intranasale) génère une réponse locale d'IgA sécrétoires anti-P97c. De façon générale, il est admis que les IgA sécrétoires constituent les principaux anticorps impliqués dans la protection contre les agents pathogènes qui pénètrent dans l'organisme hôte via les muqueuses, en bloquant leur attachement aux cellules cibles (Holmgren et Czerkinsky, 2005). De plus, de récentes études indiquent que les IgA sécrétoires, autant que les IgG2a, peuvent aider à l'internalisation des antigènes microbiens, à leur préparation et présentation par les APC, ce qui résulte en l'activation rapide de la réponse à médiation cellulaire (Igietsme *et al.*, 2004). Pour les infections à mycoplasmes, il a été démontré qu'il existe une corrélation positive entre le niveau d'IgA dans les muqueuses respiratoires et la protection contre *M. pulmonis* chez l'Humain (Simecka, 2005) et contre *M. gallisepticum* chez les volailles

(Avikan et Ley, 1993). De ce fait, la voie intranasale a été considérée pour la vaccination des porcs avec le vecteur rAdP97c.

- PARTIE EXPÉRIMENTALE II -

« Vaccination des porcs avec le vaccin rAdP97c et évaluation de la protection conférée contre *M. hyopneumoniae* : comparaison avec le vaccin commercial Suvaxyn® MH-one »

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Souches de *M. hyopneumoniae*

1.1. Vérification de l'identité des souches

Lors de cette étude, deux souches de *M. hyopneumoniae* ont été considérées pour les infections épreuves. La souche 25095 provenant de l'ATCC (Rockville, MD, USA) et la souche 232 qui nous a été gracieusement fournie par le Dr E. L. Thacker (College of Veterinary Medicine, Iowa State University, USA). Les deux souches ont été reçues sous formes lyophilisées et resuspendues dans du milieu PPLO contenant 20% de glycérol. Les aliquots ont été conservés à -70 °C. Afin de vérifier l'identité des deux souches, les amplifications par PCR et les séquençages des régions RR1 et RR2 du gène p97 ont été réalisés. Les extractions de l'ADN génomique des deux souches ont été réalisées en utilisant le kit commercial " QIAamp DNA Mini Kit "(Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada). Les amorces utilisées, sens (5'-GAAGCTATCAAAAAAGGGGAAACTA-3') et anti-sens (5'-TCAGGAACCAGAATCTAAATAA-3') ont été formulées en se basant sur la séquence connue du gène de la P97 de la souche 232 (Genbank U50901). Les PCR ont été effectuées tel que décrit dans la première partie expérimentale.

1.2. Culture *in vitro* et titrage

Afin de produire les deux souches du mycoplasme en grandes quantités, les cultures ont été réalisées en effectuant successivement des dilutions décimales. Pour commencer, ces dilutions ont été effectuées dans un volume final de 2 ml de milieu PPLO de base (milieu de Friss) supplémenté de 20% de sérum inactivé de porc, 0,8% d'extrait de levure et 0,03% de rouge de phénol. Ce milieu a été additionné de 2,5 µg/ml d'amphotéricine, de 100 µg/ml d'ampicilline, de 7,5 µg/ml de colistine et de 15 mg/ml de bacitracine pour prévenir les contaminations bactériennes et fongiques. Les cultures ont été introduites dans des tubes en verre fermés hermétiquement puis incubées à 37 °C. Après 4 à 5 jours d'incubation, la dilution la plus faible montrant une couleur jaune-orangé a été remise en culture dans 20 ml de milieu de culture dans un flacon 75 cm². Dès

l'apparition de la couleur jaune-orangé, celle-ci a été transvasée dans 200 ml de milieu dans les flacons 175 cm², soit 50 ml de culture/flacon, et incubée pendant 5 jours. Finalement, les cellules du mycoplasme ont été récoltées après centrifugation à 12000 x g pendant 40 min à 4 °C. Le culot a été lavé avec du PBS stérile froid puis resuspendu dans 4 ml de milieu PPLO de base contenant 20% de glycérol. Les aliquots ont été conservés à - 70 °C ou immédiatement remis en culture pour déterminer le titre de la culture du mycoplasme.

Le titrage de deux souches a été effectué en milieu PPLO liquide complet comme suit : la suspension bactérienne a été bien homogénéisée. Par la suite des dilutions décimales (10^{-1} à 10^{-12}) ont été effectuées dans 1 ml de milieu dans les tubes en verre. Les tubes contenant uniquement du milieu ont servi comme contrôles négatifs. Les cultures ont été incubées à 37 °C sans CO₂ pendant 7 jours. Les tubes dans lesquels il y avait un changement de couleur rouge du milieu en jaune-orangé ont été notés. Le titre a été déterminé en tenant compte de la dernière dilution pour laquelle le changement de la couleur du milieu par rapport au contrôle négatif a été observé. Pour la souche 232, le titre a été estimé à 10^9 CCU/ml. Tandis que la souche ATCC 25095 a été titrée à 10^8 CCU/ml.

1.3. Extraction des protéines totales

Les souches 232 et ATCC 25095 ont été cultivées, tel que décrit précédemment, dans 200 ml de milieu. Les culots ont été obtenus après centrifugation à 13000 x g et à 4 °C pendant 40 min. Ils ont été lavés deux fois dans 10 ml de PBS (pour complètement se débarrasser des composants du milieu) puis resuspendus dans 2 ml de PBS contenant 1mM de PMSF et d'inhibiteurs complets de protéase (Roche Applied Science, IN, USA). Les extractions de protéines ont été réalisées en suivant le protocole décrit par Gerlic *et al.*, (2007). Les suspensions bactériennes ont été lysées par sonication (4 X fois 10 secondes à une amplitude de 10%). Après re-centrifugation, les surnageants ont été récupérés, dialysés contre le PBS puis filtrés au travers d'un filtre de porosité 0,2 µm. La

concentration de protéines a été estimée en utilisant la méthode de Bradford. Les protéines ont été conservées à - 70 °C.

2. Expérimentation chez les porcs

Les porcelets, âgés de 18 à 21 jours, ont été reçus de la ferme F. Ménard Inc (Ange-Gardien, Québec, Canada). Les animaux ont été hébergés pendant toute la durée des manipulations à l'animalerie de l'Agence Canadienne d'Inspection des Aliments (ACIA, St-Hyacinthe, Québec, Canada). Les manipulations sur les animaux ont été effectuées selon les protocoles expérimentaux approuvés par le « Comité d'éthique de l'utilisation des animaux de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal » et suivant le Guide pour Soins et Utilisation des Animaux de Laboratoire. Avant toute manipulation, une période d'adaptation d'une semaine a été observée pour les porcelets. Par la suite, ils ont été identifiés individuellement par des boucles auriculaires puis répartis au hasard en différents groupes. Les porcelets ont été nourris avec une moulée sans antibiotique et observés à plusieurs reprises.

2.1. Infections préliminaires

Cette partie expérimentale a été réalisée dans le but d'évaluer la virulence des deux souches de *M. hyopneumoniae* décrites précédemment. Pour ce faire, 8 porcelets ont été répartis en trois groupes. Trois porcelets ont été inoculés avec la souche 232, 3 avec la souche ATCC 25095 et les 2 restants ont été inoculés avec le virus rAdP97c par voie intra-nasale. Ces derniers ont servi comme contrôles négatifs de l'infection à *M. hyopneumoniae* mais aussi pour la mise au point des tests d'analyse des réponses immunitaires dirigées contre la P97c. Les infections par *M. hyopneumoniae* ont été réalisées par voie intra-trachéale avec 5 ml de PBS stérile contenant 10^6 CCU de mycoplasme. Pour ce faire, les animaux ont été anesthésiés à l'aide d'un mélange composé de kétamine et de xylazine par voie intra-musculaire. L'euthanasie a été réalisée sous anesthésie par l'injection intra-veineuse du sodium pentobarbital. Les doses ont été

ajustées en fonction du poids de chaque animal tel que recommandé par la posologie de chaque produit. Toutes les expériences sur les animaux ont été réalisées sous la supervision d'un vétérinaire agréé, Dr. Carl A. Gagnon (Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada). Les porcelets ont fait l'objet d'un examen clinique quotidien à partir du jour de l'infection (J0) jusqu'au J30 post-infection.

2.2. Vaccination et infection épreuve

Le vaccin qui fait l'objet principal de notre étude est le vecteur rAdP97c. Celui-ci a été produit tel que décrit dans la première partie expérimentale de cette étude. À titre de comparaison, un vaccin commercial, Suvaxyn® MH-one (Numéro de série : 1619112A) a été également utilisé dans cette étude. Ce dernier est une bactérine, c'est-à-dire qu'il est fabriqué à partir d'une souche inactivée de *M. hyopneumoniae*. Il nous a été gracieusement fourni par la compagnie Wyeth (Wyeth Santé Animal, Guelph, Ontario, Canada). Le vaccin a été conservé et administré aux porcs en suivant les recommandations du fabricant.

Les porcelets ont été répartis en quatre groupes (**tableau 6**). Les animaux du groupe témoin (n = 5) n'ont pas été vaccinés ni infectés. Les animaux du groupe non vacciné/infecté (n = 5) ont été éprouvés avec la souche 232 de *M. hyopneumoniae* par voie intra-trachéale. Ceux du groupe Suvaxyn MH-one /infecté (n = 8) ont été vaccinés avec 2 ml du vaccin commercial Suvaxyn® MH-one par voie intramusculaire tel que recommandé par le fournisseur. Ils ont été éprouvés avec la souche 232 de *M. hyopneumoniae* à J28 post-vaccination. Les animaux du groupe rAdP97c/infecté (n = 10) ont été vaccinés deux fois à 2 semaines d'intervalle (J0 et J14), par voie intranasale, avec 5 ml de PBS stérile contenant 2×10^{10} TCID₅₀ de rAdP97c. Ces animaux ont été également éprouvés avec la souche 232 de *M. hyopneumoniae* à J28 post-vaccination. Il est à noter que l'inoculum utilisé lors des infections épreuves a été préparé à partir de broyats des poumons des porcs infectés avec la souche 232 (Section 2.1). Pour l'obtenir

de grandes quantités d'inoculum, les broyats de poumons été mis en culture et titrés tel que décrit dans la section 1.2.

Tableau 6. Description des groupes expérimentaux

Groupes expérimentaux	Jours de vaccination		Jour d'infection épreuve
	J0	J14	J28
Témoin (n= 5)	Non	Non	Non
Non vacciné/infecté (n = 5)	Non	Non	<i>M. hyopneumoniae</i> 232 à 10 ⁶ CCU par voie intratrachéale
Suvaxyn MH- one/infecté (n = 8)	2 ml de vaccin par voie intramusculaire	Non	<i>M. hyopneumoniae</i> 232 à 10 ⁶ CCU par voie intratrachéale
rAdP97c /infecté (n = 10)	2 x 10 ¹⁰ TCID ₅₀ par voie intranasale	2 x 10 ¹⁰ TCID ₅₀ par voie intranasale	<i>M. hyopneumoniae</i> 232 à 10 ⁶ CCU par voie intratrachéale

J, jour

CCU, color changing units ou unité de changement de couleur

TCID₅₀, dose infectieuse induisant un effet cytopathique dans 50% de cellules infectées.

Tous les animaux ont fait l'objet d'un examen clinique deux fois par semaine après la vaccination puis régulièrement à partir du jour de l'infection épreuve (à J28 post-vaccination) et jusqu'à la fin de l'expérience (J56 post-vaccination). Pour chacun des groupes expérimentaux, les animaux qui présentaient de la toux ou de la difficulté respiratoire étaient notés. Afin d'évaluer le gain de poids moyen quotidien (GMQ), les

animaux ont été pesés individuellement aux J0, 28, 42 et 56 début de l'expérience. Le GMQ a été déterminé comme suit : $[(\text{poids final} - \text{poids initial}) / \text{nombre de jours de l'expérience}]$.

2.3. Échantillonnage

- **Prélèvements sanguins:** les prises de sang ont été réalisées toutes les deux semaines (de J0 à J56 post-vaccination), à partir de la veine jugulaire. Pour l'obtention de sérums, du sang a été recueilli dans un tube non hépariné (Monoject, Mansfield, MA, USA). Les sérums ont été obtenus après centrifugation des tubes à 5000 x g pendant 15 min puis conservés à - 20 °C. Pour l'isolement de PBMCs, les prises de sang ont été effectuées dans les tubes contenant du sodium-héparine (Monoject).

- **Prélèvements de salive et des lavages broncho-alvéolaires:** les salives ont été récoltées à J28 post-vaccination sous anesthésie et au moment de la nécropsie (J52 post-vaccination). Pour ce faire, un morceau de coton absorbant, a été introduit sous la langue de l'animal et laissé imbiber pendant 5 à 10 min. Par la suite, le coton a été enlevé et mis dans un tube conique contenant 1 ml de PBS supplémenté de 1mM de PMSF et 5 mM d'EDTA. Les échantillons ont été gardés sur la glace à 4°C. Ensuite, le coton a été introduit dans une seringue puis pressé. Les salives ont été conservées à -70 °C jusqu'à utilisation. Les LBAs ont été réalisés à la nécropsie. Après le prélèvement des poumons, un tube de 3,5 mm de diamètre a été introduit dans la bronche principale du lobe diaphragmatique droit. Le poumon a été lavé avec 30 ml de PBS contenant 1mM de PMSF et 5 mM d'EDTA. Le liquide a été transvasé dans des tubes de polycarbonate de 30 ml et conservé sur glace à 4°C. Par la suite, il a été filtré au travers d'une monocouche de compresse afin de se débarrasser des gros débris. Pour chaque animal, 2 ml de LBAs ont été prélevés pour les analyses cytologiques. Le restant a été centrifugé à 5000 x g pendant 15 min à 4°C. Une partie du surnéant a été aliquotée et conservée à -20 °C pour

les analyses sérologiques et l'autre a été immédiatement utilisée pour les analyses bactériologiques.

- **Prélèvements de tissus pulmonaires:** les morceaux de poumons ont été coupés de préférence aux endroits où les lésions pulmonaires étaient visibles. Pour une étude histologique, les morceaux de poumons ont été conservés dans du formol. Pour la quantification bactérienne, les morceaux de poumons ont été scellés et conservés à - 70 °C. Le lendemain, approximativement 1g a été broyé dans 3 ml de milieu Friis de base contenant 2,5 µg/ml d'amphotéricine, 100 µg/ml d'ampicilline, 7,5 µg/ml de colistine et 15 mg/ml de bacitracine. L'homogénat a été clarifié par centrifugation à 5000 x g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant a été immédiatement utilisé pour l'analyse bactériologique.

3. Analyse de la réponse humorale

La liste des anticorps secondaires utilisés pour les analyses sérologiques par la technique ELISA est présentée dans le **tableau 7**. Sauf si précisé, les plateaux à 96 puits ont été lavés trois fois avec 300 µl de PBS contenant 0,05% Tween 20 (PBST) lorsque cela était nécessaire. Les densités optiques ont été lues à l'aide d'un lecteur de microplaque (Power Wave 340; Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT).

- **Détection d'anticorps anti-*M. hyopneumoniae*:** pour ce faire, les ELISA ont été effectués à l'aide du kit *HerdChek Mycoplasma hyopneumoniae Antibody Test*. Ce test détecte les IgG et fait intervenir les antigènes totaux du mycoplasme : les sérums ont été dilués au 1:40 et la DO a été lue 650 nm tel que recommandé par le manufacturier. Le niveau d'anticorps est déterminé par le rapport échantillon/positif (rapport E/P = (DO de l'échantillon - DO du contrôle négatif)/(DO du contrôle positif - DO du contrôle négatif). L'échantillon est considéré comme séropositif si le rapport E/P est supérieur à 0,3.

- **Détection d'anticorps anti-P97c:** dans les plateaux à 96 puits (NuncImmuno™, Nalge Nunc International, Rochester, NY), une quantité de 50 pg/puits de rP97c a été fixée dans

du PBS pendant toute une nuit à 4°C. Les plateaux ont été rincés avec du PBST puis saturés à l'aide de 200 µl de PBST contenant 5% de lait écrémé en poudre (PBSTL) afin de bloquer les sites libres présents dans les puits. Après 2 heures d'incubation à 37°C, les plateaux ont été lavés 3 fois avec du PBST puis traités différemment selon le type d'anticorps à analyser. Pour la quantification des IgG et des IgA totaux, 100 µl d'échantillon (sérum, salive ou LBA), dilué au 1:100 dans le PBSTL, ont été ajoutés, en duplicata, dans les puits. Les plateaux ont été incubés pendant 1 heure à 37°C. Après lavages avec du PBST, 100 µl d'anti-IgG porcine-HRP (dilution 1:5000) ou d'anti-IgA porcine-HRP (dilution 1:500) ont été ajoutés puis incubés pendant 1 heure à 37°C. Les plateaux ont été lavés puis rincés avec 300 µl de PBS. Par la suite, 100 µl du substrat

Tableau 7. Anticorps secondaires utilisés pour les analyses sérologiques

Anticorps secondaires	Source
HerdChek <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> Antibody Test Kit	IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, Maine, USA
Anti-IgG porcine (H+L) conjugué au HRP	Bethyl Laboratories, Inc, Montgomery, Texas, USA
Anti-IgA porcine conjugué au HRP	Bethyl Laboratories, Inc, Montgomery, Texas, USA
Anti-IgG1 porcine	AbD Serotec, Serotec, Kidlington, Oxford, UK
Anti-IgG2a porcine	AbD Serotec; Serotec, Kidlington, Oxford, UK
Anti-IgG de souris conjugué au HRP	AbD Serotec; Serotec, Kidlington, Oxford, UK

3,3',5,5' tétraméthylbenzidine (TMB)(Zymed , San Francisco, CA) ont été introduits dans chaque puits. Les plateaux ont été laissés à TP à l'abri de la lumière pendant une dizaine

de minutes, et le développement de la coloration a été arrêté par l'ajout de 50 μ l de H_2SO_4 1N. La DO de chacun des puits a été lue à 450 nm avec un filtre de référence à 570 nm. Pour la quantification des isotypes d'IgG (IgG1 et IgG2a), après l'ajout des échantillons à tester, les plateaux ont été incubés pendant 1 h à 37°C en présence de 100 μ l d'anti- IgG1 porcin ou d'anti-IgG2a1 porcin dilué 1 :500. Après lavages avec du PBST, 100 μ l d'anti-IgG de souris-HRP (dilution au 1:5000) ont été ajoutés. Les étapes ultérieures ont été réalisées comme décrit ci-haut. Les titres d'anticorps ont été déterminés par extrapolation en fonction d'une courbe standard correspondant à chaque type d'anticorps étudié.

4. Analyse de la réponse à médiation cellulaire

4.1. Isolement des PBMCs

Après les prélèvements sanguins, les PBMCs ont été extraits par la méthode classique de centrifugation sur gradient de Ficoll-Histopaque-1077 tel que suggéré par le manufacturier (Sigma-Aldrich). Cette méthode est basée sur le principe que les hématies (globules rouges) et les cellules polynucléaires, étant plus denses, se sédimentent sous le Ficoll, tandis que les lymphocytes et les monocytes, qui constituent les principales sous-populations des PBMCs, restent au-dessus du gradient et peuvent ainsi être récoltés à l'interface. Pour ce faire, 4 ml de sang ont été dilués dans un même volume de PBS stérile. Le mélange a été déposé lentement sur 3 ml de Ficoll-Histopaque dans un tube de polycarbonate de 15 ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Les tubes ont été centrifugés à 500 x g pendant 30 min à 20 °C. Le manteau cellulaire blanc, à l'interface, contenant les PBMCs, a été aspiré à l'aide d'une pipette pasteur stérile puis transvasé dans un nouveau tube. Un premier lavage a été effectué avec 10 ml de PBS. Après re-centrifugation pendant 5 min, le surnageant a été complètement vidé et les cellules resuspendues dans 5 ml de chlorure d'ammonium (155 mM NH_4Cl pH 7,2; 170 mM Tris-base pH 7,2, ratio 9:1). Cette étape additionnelle a été réalisée dans le but de lyser et de se débarrasser des globules rouges restants. Après incubation pendant 5 à 10 min dans un bain-marie à 37 °C, 10 ml de PBS ont été ajoutés afin de neutraliser la lyse. Par la suite, les PBMCs ont

été culottées par centrifugation tel qu'indiqué ci-haut puis lavées successivement (3 fois) avec 10 ml de PBS. Au dernier lavage, le surnageant a été complètement vidé à l'aide d'une pipette pasteur. Les PBMCs ont été remises en suspension dans 2 ml de milieu RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) complet supplémenté de 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml pénicilline, 100 µg/ml streptomycine, 50 µM 2-mercapto-éthanol. La densité cellulaire a été déterminée par comptage manuel à l'aide d'un hémacymètre. La population de PBMCs a été ramenée à une densité de 4×10^6 cellules/ml

4.2. Tests de transformation lymphoblastique

Les tests de transformation lymphoblastique (TTLs) ont été effectués en utilisant le kit BrDU Cell Proliferation (Exalpa Biologicals Inc., MA, USA). Le BrDU (5-bromo-2'-deoxyuridine) est un analogue de la thymidine qui s'incorpore dans l'ADN des cellules en phase S. Cette incorporation est proportionnelle à la division cellulaire et peut être révélée avec un anticorps spécifique anti-BrDU par ELISA. Bien que cette méthode soit moins sensible que la méthode classique de marquage des cellules par la thymidine tritiée (^3H), elle présente l'avantage d'être non radioactive (Maghni *et al.*, 1999).

Les TTLs ont été réalisés dans les plateaux à 96 puits à fond en U. Tous les réactifs ont été fournis avec le kit. Un volume de 50 µl de suspension de PBMCs, soit 2.10^5 cellules par puits, ont été mises en culture dans le milieu RPMI-1640 complet en présence de 50 µl de rP97c détoxifiée à une concentration finale de 10 µg/ml. Pour chaque animal, des puits témoins positifs et négatifs ont été inclus dans l'essai. Dans les puits témoins positifs, les cellules ont été incubées en présence de 50 µl de la ConA à une concentration finale de 5 µg/ml, tandis que dans les puits témoins négatifs n'étaient pas stimulés. Afin de réduire la variabilité des mesures, des analyses en triplicata ont été réalisées. Les plateaux ont été incubés pendant 3 jours à 37 °C et à 5% de CO_2 .

Pour mesurer la prolifération des cellules, 20 µl de la solution de BrdU fournit, diluée au 1:500 dans le milieu RPMI complet, ont été ajoutés. Les plateaux ont été

incubés pendant une période additionnelle de 16 heures. Par la suite, les cellules ont été culottées par centrifugation à 1000 x g pendant 5 min. Après 30 min d'incubation à TP, la solution a été aspirée et les plateaux ont été incubés pendant 2 heures à 65 °C afin de dénaturer l'ADN chromosomique et ainsi permettre la reconnaissance des épitopes intranucléaires par l'anticorps anti-BrdU. Puis, les cellules ont été lavées 3 fois avec 300 µl de la solution de lavage préparée selon les instructions du fournisseur. Un volume de 100 µl d'anticorps anti-BrdU (dilué au 1:200) a été ajouté puis incubé pendant 1 heure à TP. Après lavages, 100 µl de l'anticorps anti-IgG de souris conjugué à la peroxidase ont été additionnés. Les plateaux ont été laissés à température ambiante pendant 30 min. Dès lors, les cellules ont été à nouveau lavées puis recouvertes avec 100 µl de TMB. Après 30 min d'incubation à l'abri de la lumière, le développement de la coloration a été arrêté par l'addition de 100 µl de solution stop. Finalement, la DO a été lue à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Power Wave 340; Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT). Les indices de prolifération ont été calculés en divisant la moyenne de la DO des cellules stimulées par la moyenne de la DO des cellules non stimulées.

5. Dosage de cytokines dans les lavages bronchoalvéolaires

Les différentes cytokines qui ont été quantifiées dans cette étude et leurs solutions sont présentées dans le **tableau 8**. Nous avons bénéficié des protocoles d'ELISA mis au point par l'équipe du Dr M. Gottschalk (Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada). Pour ce faire, l'AcMo anti-porcine TNF- α (2 µg/ml), l'AcMo anti-porcine IL-1 β (1 µg/ml), l'anticorps polyclonal anti-porcine IL-6 (0,8 µg/ml) ou l'AcMo anti-humain IL-8 (2 µg/ml) ont été séparément fixés aux puits toute la nuit à 4 °C. Après rinçage avec du PBS-0.1% Tween 20 (PBST), les puits ont été bloqués pendant 2 heures à TP suivi des lavages (3 fois) avec du PBST. Par la suite, 100 µl du liquide des LBAs ou de la protéine standard correspondant à chacun des cytokines ont été séparément ajoutés en duplicata. Après 2 heures d'incubation, les puits ont été relavés puis l'anticorps couplé à la biotine correspondant à chacun des cytokines a été introduit

Tableau 8. Réactifs utilisés pour le dosage de cytokines.

Cytokines	Source et numéro de catalogue	Solution de fixation	Solution de blocage	Diluant
Pour le dosage de TNF-α	R & D Systems , MN, USA	PBS	PBS + 10% BSA	PBS + 1% BSA + 2% de
AcMo anti-TNF- α porcin	MAB690		+ 5% sucrose	sérum de chèvre inactivé
TNF- α porcin	690-PT			
Ac anti-TNF- α porcin biotinylé	BAF690			
Pour le dosage d'IL-1β	R & D Systems , MN, USA	PBS	PBS + 10% BSA	PBS + 1% Tween + 1% BSA
AcMo anti-IL-1 β porcin	MAB6811		+5% sucrose	
IL-1 β porcin	681-P			
Ac anti-porcine IL-1 β biotinylé	BAF681			
Pour le dosage de d'IL-6	R & D Systems , MN, USA	PBS	PBS + 1% BSA	TBS (pH 7,3) + 1% BSA
Ac polyclonal anti- IL-6 porcin	AF686		+ 5% sucrose	+ 0,05% Tween 20
IL-6 porcin	686-PI			
Ac anti- IL-6 porcin biotinylé	BAF686			
Pour le dosage de d'IL-8	R & D Systems , MN, USA	PBS	PBS + 1% BSA	TBS (pH 7,3) + 1% BSA
AcMo anti- IL-8 human	MAB208		+ 5% sucrose	+ 0,05% Tween 20
IL-8 porcin	535-IN			
Ac anti- IL-8 porcin biotinylé	BAF535			

Ac, anticorps; AcMo, anticorps monoclonal.

(TNF- α (0.2 $\mu\text{g/ml}$), IL-1 β (75 ng/ml), IL-6 (50 ng/ml), IL-8 (0,5 $\mu\text{g/ml}$) puis incubé pendant 2 heures. Après lavages et ajout de la streptavidine-HRP (2 $\mu\text{g/ml}$), les plateaux ont été laissés durant 1 heure à TP. Les plateaux ont été à nouveau lavés et la streptavidine couplé au HRP a été additionnée et les plateaux ont été incubés pendant 45 min. Après lavages, les puits ont été séchés et 100 μl de TMB ont été introduits. Le développement de la coloration a été arrêté par l'ajout de 50 μl de H₂SO₄ 1N. La DO a été lue à 450 nm. La concentration de chaque cytokine a été estimée, grâce à sa propre DO, en se basant sur la courbe standard réalisée à partir de la protéine standard. Pour établir les courbes étalons, les protéines standard ont été préparées à des concentrations comprises entre 78 et 5000 pg/ml pour le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-6 et entre 18 et 1200 pg/ml pour l'IL-8.

6. Examen des lésions pulmonaires

À la nécropsie, les poumons ont été examinés par un vétérinaire expérimenté agréé (Dr Carl A. Gagnon, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada) pour la recherche des lésions causées par l'infection à *M. hyopneumoniae*. Le pourcentage de poumons porteurs de lésions de pneumonie a été estimé pour chacun des sept lobes selon la grille décrite par Sorensen *et al.*, (2006) dans laquelle le pourcentage maximum de lésions est 100 %. En bref, cette grille définit

- 5% et 11% si la totalité des lobes apicaux gauche et droit sont atteints, respectivement.
- 6% et 10% pour les lobes caudaux de gauche et de droite, respectivement.
- 5% pour le lobe intermédiaire.
- 29% et 34% si la totalité des lobes diaphragmatiques gauche et droit sont atteints, respectivement.
- Le pourcentage total de lésions correspond à la somme des étendues de chaque lobe.

Les examens de lésions microscopiques ont été réalisés par le Service d'histologie de la Faculté de médecine vétérinaire de St-Hyacinthe. Les tissus pulmonaires, conservés dans le formol, ont été coupés en couches minces de 3 à 4 μm d'épaisseur au microtome. Ces coupes de tissus ont été colorées par la méthode classique d'hématoxyline et éosine (HE). L'utilisation des deux colorants sur une même préparation augmente la sensibilité de détection des lésions. L'hématoxyline colore le noyau des cellules en violet/noir/bleu (selon l'épaisseur de la coupe et la formule de l'hématoxyline utilisée). C'est un colorant cationique ou basique qui crée des liens chimiques avec les acides nucléiques présents dans le noyau des cellules. Puis, la couleur se diffuse dans toutes les structures nucléaires par un phénomène d'absorption. Elle doit être oxydée pour donner le principe colorant actif. L'oxydation de l'hématoxyline peut chimiquement à l'aide d'iodate de potassium, permanganate de potassium, alun de potasse ou autre : ce sont des mordants. On obtient alors une solution colorante que l'on appelle « hemalun ». L'éosine quant à elle est un colorant acide qui forme des liens avec les structures basiques du cytoplasme et les colore en rose/rouge. La double coloration HE est fréquemment utilisée pour les colorations histologiques en raison de sa simplicité et de sa fiabilité. De plus, elle est moins onéreuse.

7. Analyse cytologique des lavages bronchoalvéolaires

Les analyses cytologiques ont été réalisées avec les LBAs. Le nombre total des cellules présentes dans les LBAs a été déterminé à l'aide d'un hémacymètre et leur viabilité a été vérifiée par l'exclusion du Bleu Trypan. Pour ce faire, 100 μl de LBA ont été homogénéisés dans 400 μl de PBS et 500 μl de Bleu Trypan à 0,4% (p/v) (facteur de dilution 5). Après 5 min d'incubation à température ambiante, pour permettre la pénétration du Bleu Trypan, une petite quantité (environ 10 μl) a été transférée dans les chambres de l'hémacytomètre en utilisant une pipette Pasteur. Les cellules ont été comptées sous un microscope optique. Les comptages ont été effectués deux fois pour s'assurer de la fiabilité du résultat. La moyenne des deux comptages a été calculée et le nombre total de cellules par ml a été estimé en appliquant l'équation : nombre total de cellules = nombre moyen de cellules $\times 10^4 \times$ facteur de dilution.

Les différents types de leucocytes présents dans les LBAs ont été caractérisés avec l'aide du Service de Cytologie de la Faculté de médecine vétérinaire de St-Hyacinthe. Les cytocentrifugations ont été effectuées à 500 x g pendant 5 min, avec 200 µl de LBA, dans un cytopsin (Cytospon 2, Shandon Southern Instruments, Sewickley, PA). Les cellules ainsi fixées sur les lames ont été colorées en utilisant la technique de coloration rapide "Diff-Quick". Après 30 secondes d'incubation, les lames ont été séchées puis les cellules ont été comptabilisées sous un microscope. La différenciation des leucocytes était basée sur leur morphologie. Finalement, le pourcentage de chaque type de leucocytes a été déterminé en tenant compte du nombre des cellules totales.

8. Analyse bactériologique.

Ces analyses ont été effectuées dans le but de quantifier *M. hyopneumoniae* dans les poumons et les LBAs des animaux infectés. Pour ce faire, les homogénats de poumons et les liquides des LBAs ont été dilués dans le milieu culture de mycoplasme. Les dilutions décimales ont été effectuées en mélangeant 100 µl d'échantillon dans 900 µl de milieu. Pour chaque dilution, 200 µl ont été mis en culture, en triplicata, dans un plateau à 96 puits. Les puits avec uniquement le milieu de culture ont été également inclus. Les plateaux ont été recouverts d'un film adhésif stérile (pour éviter l'évaporation du milieu) puis mis dans un sac hermétique. Les cultures ont été incubées pendant 5 jours à 37 °C sans CO₂. Les titres ont été déterminés par observation des puits : on a noté la dernière dilution pour laquelle un changement de couleur de rouge à l'orange jaune a été observé. Les résultats des titrages ont été exprimés en CCU/ml : si par exemple les puits ont viré jusqu'à - 7, alors le titre sera de 10⁷ CCU dans 200 µl, donc 2 x 10⁸ CCU/ml.

9. Test d'inhibition de croissance *in vitro* de *M. hyopneumoniae*

Le but de ces tests est d'évaluer la capacité des antisérums d'inhiber la croissance du mycoplasme. Pour ce faire, la souche 232 de *M. hyopneumoniae* a été mise en

croissance, tel que décrit précédemment, jusqu'à l'obtention d'un titre de 10^8 CCU/ml. La culture a été alors diluée à 10^6 CCU/ml dans le milieu de culture de mycoplasme. Par la suite, 100 μ l, soit 10^5 CCU du mycoplasme, ont été transférés dans les puits d'un plateau à 96 puits. Les sérums (J28) provenant des animaux de chaque groupe expérimental ont été séparément dilués dans le milieu PPLO ci-haut. Les dilutions de raison 2 (de 1 : 40 à 1 : 1280) ont été réalisées. Cent μ l de chaque dilution ont été incubés (en triplicata) en présence du mycoplasme. Après 4 jours de culture, les DO à 560 nm ont été mesurées.

Lors des tests, les puits contenant uniquement le milieu de culture et les puits contenant du mycoplasme sans antisérums ont été inclus comme contrôles négatifs et positifs, respectivement. Le pourcentage d'inhibition a été estimé comme suit : $[(\text{DO moyen de la croissance du mycoplasme en présence de l'antisérum} - \text{DO moyen de la croissance du mycoplasme en absence de l'antisérum}) / ((\text{DO moyen du milieu de culture} - \text{DO moyen de la croissance du mycoplasme}))] \times 100$.

10. Analyses statistiques

Les données des groupes expérimentaux ont été inscrites dans Microsoft Excel. Les comparaisons entre les groupes ont été réalisées par le test Tukey pour une analyse de variance (ANOVA) à un facteur. Ce test permet de comparer les groupes deux par deux et ne nécessite pas que les groupes aient la même taille. Le seuil de signification a été choisi à 5%.

RÉSULTATS

1. Sélection de la souche pathogénique de *M. hyopneumoniae*

Il existe chez *M. hyopneumoniae* plusieurs souches dont certaines sont non virulentes ou peu virulentes et d'autres très virulentes (Meyns *et al.*, 2007). Nous disposons de deux souches, la souche ATCC 25095 et la souche 232, potentiellement utilisables pour les infections épreuves. En effet, après amplification par PCR de la portion du gène de la P97 renfermant les régions RR1 et RR2, celle-ci a été séquencée. L'analyse de la séquence peptidique a montré que les deux souches contiennent plus de 7 unités répétées AAKPV/E dans la région RR1, un nombre minimum pour qu'une souche de *M. hyopneumoniae* soit considérée comme virulente (Minion *et al.*, 2000). Il y en a 10 pour la souche ATCC 25095 et 15 pour la souche 232 (**figure 17**).

Un nombre restreint de porcs (3 par groupes) a été infecté avec 10^6 CCU des deux souches. À la nécropsie, 30 jours post-infection, l'examen des poumons a révélé des lésions pulmonaires macroscopiques uniquement chez les animaux infectés avec la souche 232. Cette dernière a donc été considérée pour les infections épreuve au moment de la vaccination des porcs avec le vecteur rAdP97c et le vaccin Suvaxyn® MH-one. Toutefois, la quantité de lésions observées a été beaucoup plus faible qu'attendu (< 5%) bien que la dose d'inoculum de la souche 232 ait été supérieure à celle de 10^5 CCU/ml décrite dans la littérature (Okada *et al.*, 1999, Fano *et al.*, 2007). Puisque le passage d'un agent pathogène *in vivo* peut avoir pour effet de réactiver sa virulence, il a été décidé de réisoler et d'amplifier la souche 232 à partir de broyats de poumons infectés afin de l'utiliser lors des infections épreuves. Les résultats qui seront présentés ultérieurement ont bien montré l'effet attendu du passage *in vivo*.

Figure 17. Comparaison de la portion de portion C-terminale de la P97 contenant les régions RR1 et RR2 des souches de *M. hyopneumoniae* utilisées dans cette étude.

Les séquences des souches 25095 et 232 ont été obtenues dans cette étude. La séquence de la souche 25934 provient de GenBank (numéro d'accès AY512905). L'alignement des séquences a été effectué à l'aide du programme BioEdit La région RR1 (en rouge) renferme des motifs répétés AAKPE(V) qui sont au nombre de 15 chez la souche 232, 10 chez les souches ATCC25095 et 25934. La région RR2 (en bleu) contient des motifs répétés GT(A,S)PN(S)QGKKAЕ, au nombre de 5 chez la souche 25934 et de 4 chez les souches ATCC 25095 et 232.

-, acide aminé identique

*, acide aminés manquants.

2. Évaluation de la protection conférée par les vaccins suite à une infection épreuve

Lors de cette deuxième étape d'expérimentation chez le porc, 28 porcelets ont été utilisés et traités tel que décrit au **tableau 6**. Après l'infection épreuve avec la souche 232 de *M. hyopneumoniae*, les animaux ont été suivis pendant 28 jours, soit jusqu' à J56 post-vaccination. Le niveau de protection conféré par notre vaccin rAdP97c ainsi que par le vaccin Suvaxyn ® MH-one contre l'agent pathogène a été évalué au niveau des signes cliniques (la toux et le GMQ), des lésions pulmonaires et la réponse inflammatoire causés par l'agent pathogène.

2.1. Signes cliniques

Durant les 4 semaines qui ont précédé l'infection épreuve (J0-J28), aucun symptôme particulier n'a été noté chez les animaux. De J28 (jour de l'infection épreuve) au J56, de la toux et de la difficulté respiratoire n'ont pas été constatées chez les animaux témoins. En revanche, ces symptômes ont été mis en évidence chez tous les animaux infectés y compris chez ceux qui ont été vaccinés à partir de la première semaine post-infection et ont perduré en s'intensifiant jusqu'à la fin de l'expérience. Toutefois, visuellement, il a été constaté que les animaux du groupe non vacciné mais infecté toussaient plus souvent et avaient plus de difficulté à respirer que ceux des groupes vaccinés. Comme c'est le cas lors de l'infection à *M. hyopneumoniae*, la toux observée n'était pas productive, c'est-à-dire sèche ou irritative qui survient souvent de manière brusque, intense et à de courts intervalles.

Afin d'évaluer l'effet des vaccins utilisés sur la perte de croissance qui est souvent associée à l'infection à *M. hyopneumoniae*, les animaux ont été pesés aux J0, 28, 42 et 56 post-vaccination. Comme le montrent les résultats du **tableau 9**, aucune différence de poids n'a été observée entre les groupes expérimentaux avant l'infection épreuve (du J0 au J28). Par contre, à partir de la deuxième semaine post-infection (J42), une perte de croissance significative ($P < 0,05$) a été notée dans le groupe non vacciné/infecté comparativement au groupe témoin. Au J56 post-vaccination, soit quatre semaines après

Tableau 9. Évaluation de la prévention de la perte de poids suite à la vaccination et l'infection par *M. hyopneumoniae*.

Jour de pesée	Poids moyen en kg			
	Témoin	Non vacciné/ infecté	Suvaxyn® MH- one/infecté	rAdP97c/ infecté
J0	8,1 ± 1,135	7,1 ± 0,418	8,1 ± 1,536	7,82 ± 1,53
J28	22,5 ± 2,5	20,28 ± 2,299	19,75 ± 5,775	20,75 ± 2,768
J42	36 ± 2,236	26,6 ± 6,07 (A)	28,125 ± 9,448	27,55 ± 3,997
J56	54,36 ± 1,309	39,81 ± 5,84 (A,C)	49,87 ± 3,81	44,63 ± 3,61 (A,C)
GMQ	0,830 ± 0,037	0,586 ± 0,104 (A,C)	0,743 ± 0,088	0,672 ± 0,068 (A,C)

GMQ (gain de poids moyen quotidien) au jour 56 post-vaccination

A, différence significative ($P < 0,05$) comparée au groupe témoin.

C, différence significative ($P < 0,05$) comparée au Suvaxyn MH-one/infecté.

l'infection épreuve, tous les groupes infectés ont montré un retard de croissance par rapport au groupe témoin mais ce retard n'était significatif que pour les animaux non vaccinés/infectés ($P = 0,0006$) et vaccinés avec rAdP97c ($P = 0,001$). Les porcs des groupes non vacciné/infecté et rAdP97c/infecté ont également accusé un retard de croissance significatif par rapport au groupe Suvaxyn MH-one/infecté ($P = 0,0056$ et $0,016$, respectivement).

Le calcul du GMQ n'a pas non plus permis de constater une différence significative entre le groupe non vacciné/infecté ($0,586 \pm 10,4$ kg/jour) et le groupe vacciné avec rAdP97c ($0,672 \pm 68$ kg/jour). Toutefois, une légère amélioration de gain de poids a été constatée dans le groupe rAdP97c/infecté. Le GMQ du groupe vacciné avec Suvaxyn® MH-one ($0,743 \pm 0,088$ kg/jour) a été nettement supérieur comparé à celui des deux autres groupes éprouvés. De ce fait, il est possible de conclure que ce vaccin commercial est plus efficace que rAdP97c dans la prévention de la perte de croissance causée par *M. hyopneumoniae*.

2.2. Réduction des lésions pulmonaires macroscopiques

La présence des lésions pulmonaires a été examinée au niveau de tous les lobes pulmonaires de tous les animaux de chacun des groupes expérimentaux. Le pourcentage de lésions observées a été déterminé visuellement à l'aide de la grille de quantification qui a été décrite précédemment. À la nécropsie, aucune lésion typique de l'infection à *M. hyopneumoniae* ou d'une autre nature n'a été observée chez les animaux témoins. En revanche, tous les animaux (100%) du groupe non vacciné/infecté ont montré des lésions macroscopiques sévères comprises entre 33 à 67%. Ces lésions ont été observées au niveau de tous les lobes pulmonaires tel qu'illustré à la **figure 18 gauche** (vue ventrale) pour l'animal qui a présenté le plus fort taux de pneumonie. De même, tous les animaux (100%) vaccinés avec rAdP97c ont développé des lésions allant de 2,5 à 31% lesquelles étaient essentiellement localisées au niveau des lobes antérieurs chez la plupart des animaux de ce groupe (**figure 18 centre**, vue ventrale).

Figure 18. Photographies des lésions pulmonaires macroscopiques observées chez les porcs vaccinés et infectés par *M. hyopneumoniae*. Le taux estimé des lésions couvrant la surface pulmonaire de chaque animal est indiqué entre parenthèses. Ces lésions sont de couleur rougeâtre (indiquée par une flèche).

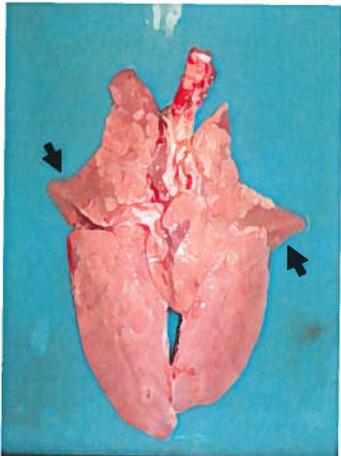
Figure 18.

Cas avec les lésions sévères

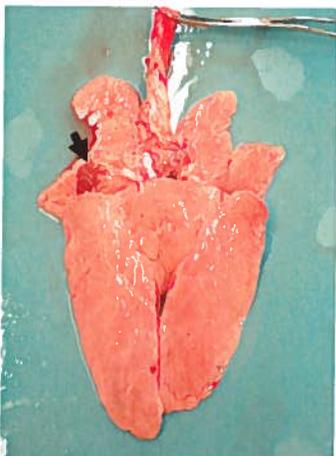
Non vacciné/infecté (67%)



rAdP97c/infecté (31%)



Suvaxyn MH-one/infecté (5%)



Dans le groupe d'animaux vaccinés avec Suvaxyn® MH-one, seulement 4 sur les 8 à l'étude ont montré des lésions, allant de 1 à 5%. Chez l'animal ayant un fort taux de pneumonie, les lésions étaient restreintes au niveau des lobes apicaux (**figure 18 droite**, vue ventrale). Il a été observé en moyenne $47 \pm 13,86$ % de lésions pulmonaires dans le groupe non vacciné/infecté contre $16 \pm 8,31$ % dans le groupe rAdP97c/infecté et seulement $1,44 \pm 1,72$ % dans le groupe Suvaxyn® MH-one /infecté. Tel que schématisé à la **figure 19**, il est possible de constater que le vaccin rAdP97c a réduit de façon très significative ($P < 0,001$) les lésions pulmonaires macroscopiques causées par *M. hyopneumoniae*. Par ailleurs, il est aussi possible de s'apercevoir que cette efficacité est nettement inférieure à celle du vaccin commercial Suvaxyn® MH-one

2.3. Réduction des lésions pulmonaires microscopiques

Les lésions pulmonaires microscopiques de l'infection à *M. hyopneumoniae* se caractérisent par l'accumulation péri-bronchique et péri-vasculaire de cellules inflammatoires (Kwon *et al.*, 2002). Dans cette étude, ces lésions ont été examinées à partir de coupes de tissus qui ont été colorées à l'hématoxyline-éosine

Les examens microscopiques n'ont pas révélé de lésions classiques de l'infection à *M. hyopneumoniae* chez les animaux témoins (non vaccinés et non infectés). En effet, tel qu'illustré à la **figure 20A**, on n'aperçoit pas une pneumonie interstitielle c'est-à-dire une accumulation des cellules inflammatoires autours des bronches, des bronchioles et des vaisseaux. De plus, on distingue bien les alvéoles et l'épithélium respiratoire pseudostratifié mucociliaire et la couche musculaire lisse qui entourent les bronches, ce qui indique un état normal des poumons. En revanche chez l'animal non vacciné mais infecté qui a montré le taux le plus élevé de lésions macroscopiques (67%) du groupe, présente pneumonie interstitielle sévère. On peut aussi observer une accumulation des pneumocytes dans les bronches (**figure 20B**). De même, chez l'animal vacciné avec rAdP97c (avec 31% de lésions macroscopiques, **figure 20D**), il est aussi possible

Figure 19. Pourcentage des lésions macroscopiques pulmonaires observées chez les porcs vaccinés et infectés par *M. hyopneumoniae*. Pour chaque animal, le pourcentage (%) de lésions visibles caractéristiques de l'infection à *M. hyopneumoniae* a été estimé tel que décrit dans la section Matériel et Méthodes. Les histogrammes correspondent au % moyen \pm l'écart type.

c et **d**, différence significative comparée au groupe Suvaxyn MH-one/infecté et au groupe rAdP97c/infecté, respectivement.

Figure 19.

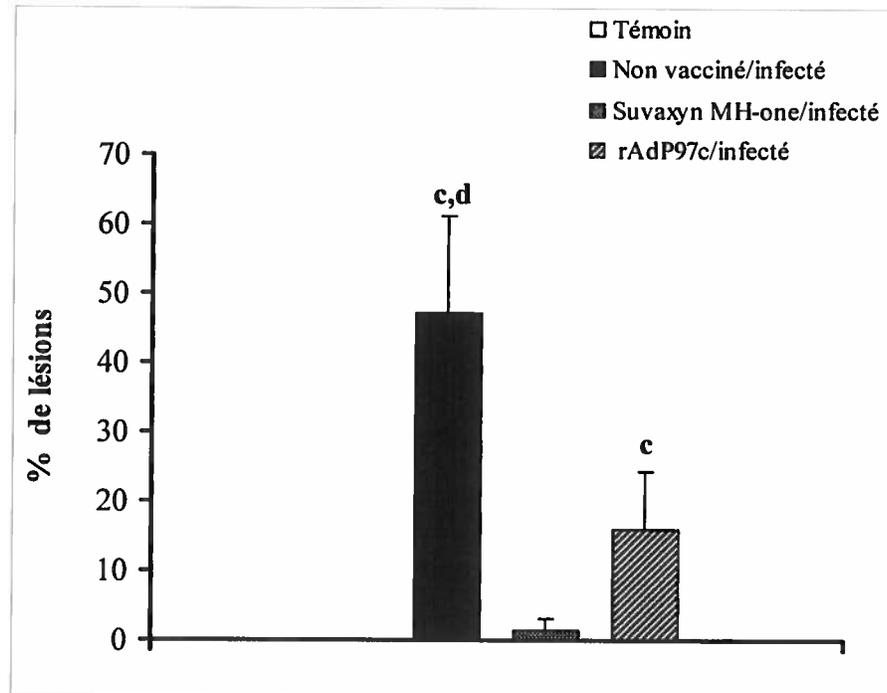
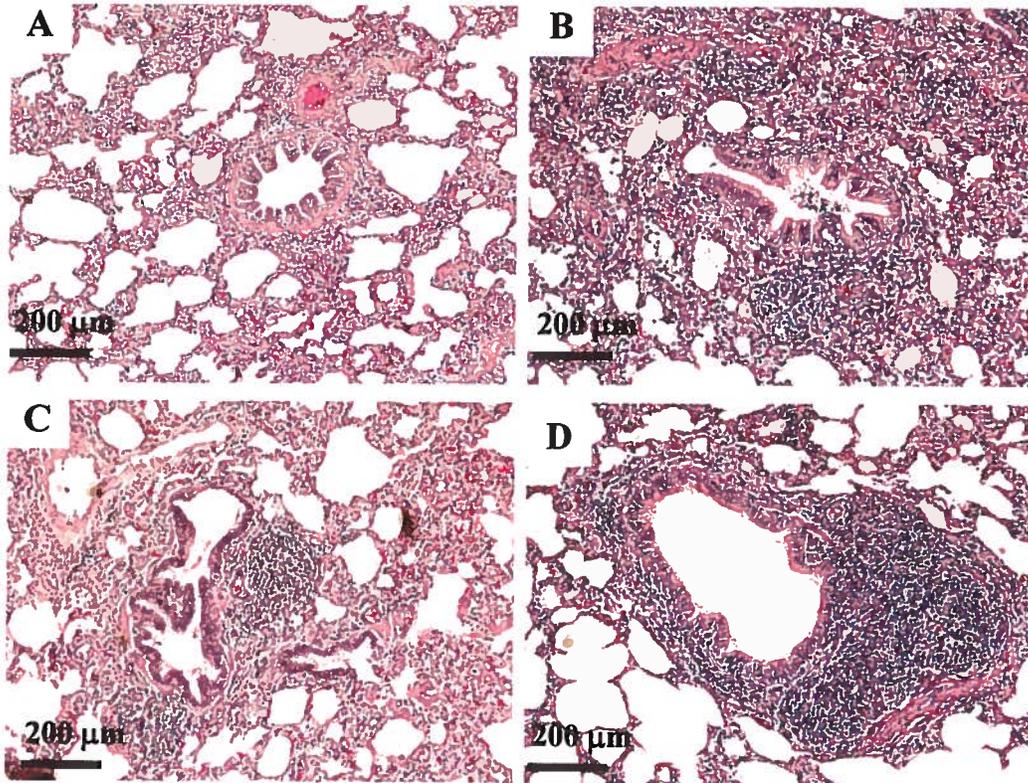


Figure 20. Effet des vaccins sur la réduction des lésions microscopiques suite à l'infection par *M. hyopneumoniae*. Les coupes de tissus pulmonaires ont été colorées à l'hématoxyline-éosine. Le cliché (A) montre les bronchioles (br) et les alvéoles (alv) d'un animal du groupe témoin ; (B) d'un animal du groupe non vacciné/infecté avec 67% de lésions pulmonaires macroscopiques où on peut observer une pneumonie interstitielle; (C), d'un animal du groupe Suvaxyn MH-one/infecté avec 5% de lésions macroscopiques ; et (D) d'un animal du groupe rAdP97c/infecté avec 31% de lésions macroscopiques. Grossissement X 200.

Figure 20.



de constater une pneumonie interstitielle et une obstruction des bronches. Toutefois, ces effets sont visiblement moins prononcés que chez l'animal précédent.

Tel qu'attendu, au regard du taux de lésions macroscopiques, il n'y a pratiquement pas de pneumonie interstitielle et de cellules inflammatoires dans les bronches de l'animal vacciné avec Suvaxyn® MH-one qui a présenté le plus fort taux de lésions macroscopiques (5%) du groupe (**figure 20C**).

2.4. Prévention de la réponse inflammatoire

2.4.1. Réduction de l'accumulation des leucocytes

Afin d'évaluer l'effet des vaccins à l'étude sur la réduction de l'inflammation due à *M. hyopneumoniae*, nous avons examiné la proportion de leucocytes présents dans les LBAs provenant de chacun des groupes expérimentaux. Ces analyses ont été effectuées en comptabilisant le nombre de cellules totales à l'aide d'un hémacymètre et les différentes sous-populations de leucocytes (macrophages, neutrophiles et lymphocytes) à l'aide de la technique de coloration « Diff-Quick ».

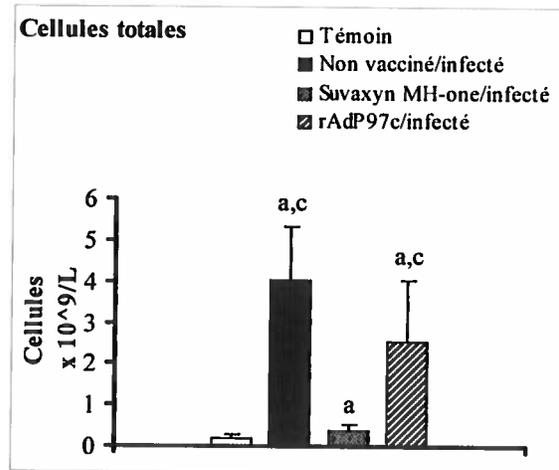
Comme le montrent les résultats à la **figure 21A**, très peu de cellules ont été comptabilisées dans les LBAs du groupe témoin ($0,19 \pm 0,11 \times 10^9$ cellules/L). En revanche, il a été noté un nombre significativement élevé de cellules dans les LBAs de tous les groupes infectés par rapport au groupe témoin. Toutefois, comme on peut le constater à la même figure, cette augmentation n'a pas été très marquante dans le groupe Suvaxyn® MH-one/infecté ($0,36 \pm 0,16 \times 10^9$ cellules/L) comparativement au groupe non vacciné/infecté ($4,01 \pm 1,32 \times 10^9$ cellules/L) ainsi qu'au groupe rAdP97c/infecté ($2,52 \pm 1,52 \times 10^9$ cellules/L). Mentionnons que des bactéries de type coque ont été observées dans les LBAs du groupe non vacciné/infecté ainsi que dans ceux du rAdP97c/infecté. Ceci pourrait avoir contribué à leur forte proportion de cellules inflammatoires. Par ailleurs, il a été intéressant de noter qu'il y avait moins de cellules dans les LBAs des animaux du

Figure 21. Effet des vaccins sur la proportion de leucocytes dans les lavages broncho-alvéolaires (LBAs) suite à l'infection par *M. hyopneumoniae*. Les LBAs ont été récoltés au jour 56 post-vaccination, soit 4 semaines après l'infection épreuve avec la souche 232 de *M. hyopneumoniae*. **(A)** ; nombre de leucocytes totaux dans les LBAs des groupes expérimentaux. **(B)**, pourcentage relatif des sous-populations leucocytaires dans les LBAs des groupes expérimentaux. Les histogrammes représentent la moyenne \pm l'écart-type.

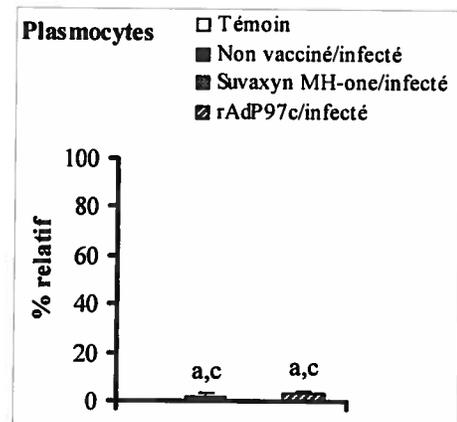
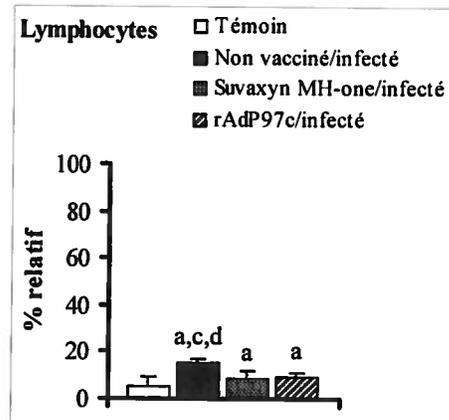
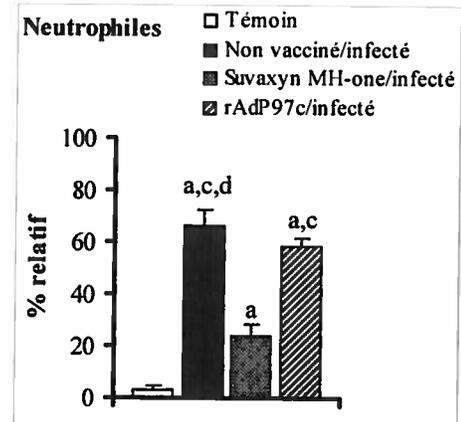
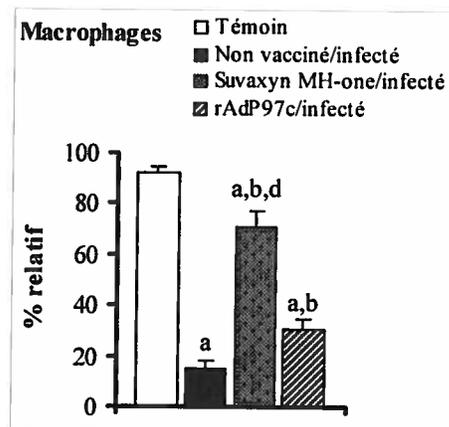
a, c, b et d, différence significative comparée au groupe témoin, non vacciné/infecté, Suvaxyn MH-one/infecté et au groupe rAdP97c/infecté, respectivement.

Figure 21.

A Leucocytes totaux



B Sous-populations leucocytaires



groupe rAdP97c/infecté que dans ceux du groupe non vacciné/infecté, mais l'écart-type observé rend cette différence non significative.

Après le comptage différentiel des leucocytes (**figure 21B**), tel qu'attendu, les macrophages étaient majoritaires (92% de cellules totales) dans les LBAs du groupe témoin suivi de lymphocytes (5%) puis de neutrophiles (3%). Suite à l'infection épreuve, comparativement au groupe témoin, il a été noté une baisse de macrophages et une hausse de neutrophiles ainsi que de lymphocytes dans les LBAs des 3 groupes éprouvés avec *M. hyopneumoniae*. Cette baisse du nombre de macrophages était toutefois moins frappante dans le groupe Suvaxyn® MH-one/infecté. En revanche, elle l'a été de façon très significative ($P < 0,001$) dans les groupes non vacciné/infecté et rAdP97c/infecté. Une différence significative ($P < 0,01$) du nombre de macrophages a aussi été constatée entre ces deux groupes.

En ce qui concerne les neutrophiles, une augmentation très significative ($P < 0,01$) de ces cellules a été notée dans les LBAs de tous les groupes infectés comparé au groupe témoin. Cette hausse a été moins importante dans le groupe Suvaxyn® MH-one/infecté que dans les groupes non vacciné/infecté et rAdP97c/infecté. Aucune différence statistique ($P > 0,05$) n'a été observée entre ces deux derniers groupes. En ce qui concerne les lymphocytes, une hausse significative ($P < 0,05$, comparée au groupe témoin) a été notée que dans les trois groupes éprouvés. Cette hausse était cependant plus marquée dans le groupe non vacciné/infecté comparée aux groupes vaccinés. Mentionnons que des plasmocytes ont été retrouvés dans les LBAs de ce groupe et dans ceux du groupe rAdP97c/infecté, ce qui évoque une infection subaiguë ou chronique.

En résumé, ces résultats montrent, d'une part, que l'infection à *M. hyopneumoniae* réduit le nombre de macrophages et stimule l'infiltration des neutrophiles et des lymphocytes dans les bronchioles et les alvéoles. D'autre part, ils montrent que la protection contre cet agent pathogène, suite à la vaccination, serait associée à la capacité du vaccin à prévenir l'infiltration de neutrophiles et l'activation des macrophages. De ce

fait, le vecteur rAdP97c semble donc avoir un effet positif modéré contre l'infection à *M. hyopneumoniae*.

2.4.2. Réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires

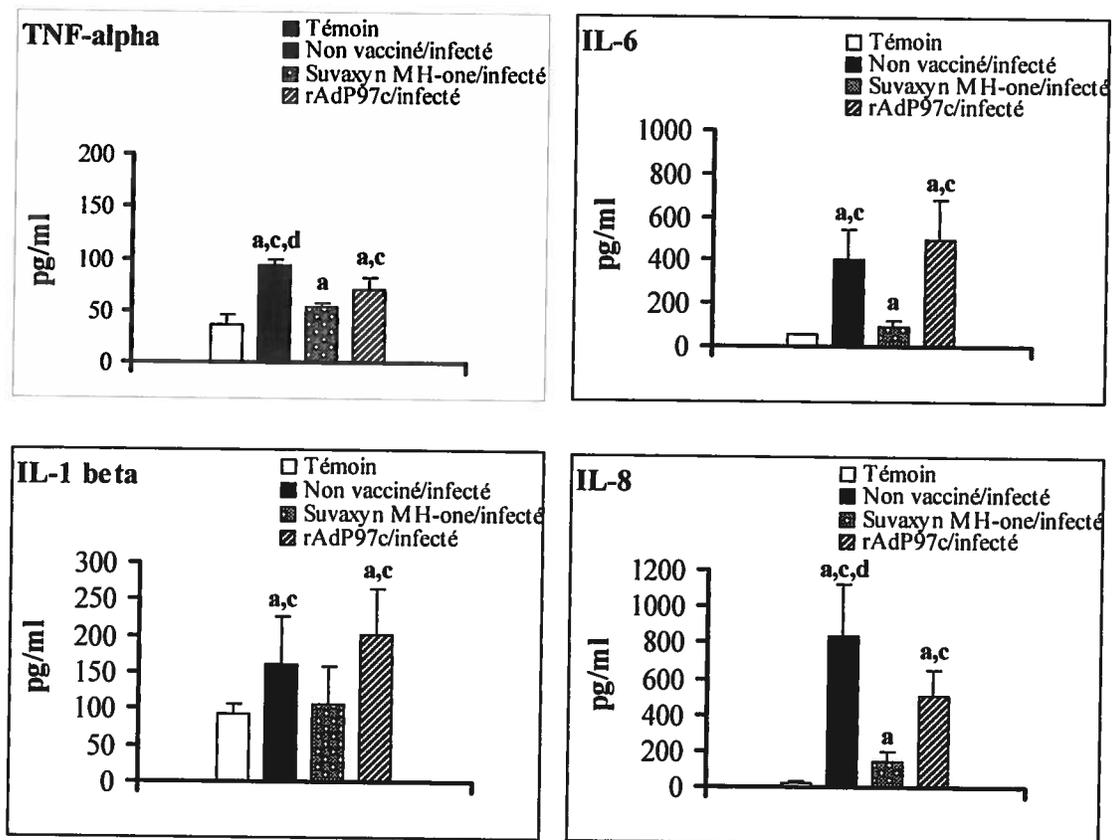
Afin de compléter l'étude sur la réponse inflammatoire, nous avons quantifié les niveaux des cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF- α .) dans LBAs de chacun des groupes expérimentaux. D'après les informations qui ont été rapportées dans la littérature, les niveaux élevés de ces cytokines dans les LBAs corrélerent avec la sévérité des lésions pulmonaires causées par *M. hyopneumoniae* (Okada *et al.*, 2000, Sarradell *et al.*, 2003, Lorenzo *et al.*, 2006)

Comme le montrent les résultats à la **figure 22**, comparativement au groupe témoin, la concentration d'IL-1 β a été significativement plus élevée dans les LBAs des groupes non vacciné/infecté ($P < 0,05$) et rAdP97c/infecté ($P < 0,01$) et non dans ceux du groupe Suvaxyn® MH-one/infecté ($P > 0,05$). Une tendance similaire a été observée concernant l'IL-6 pour laquelle des niveaux très significatifs ($P < 0,001$) ont été quantifiés dans les groupes non vacciné/infecté et rAdP97c/infecté. Bien qu'aucune différence statistique n'ait été constatée entre ces deux groupes, leurs concentrations en IL-6 étaient significativement plus élevées ($P < 0,01$) par rapport au groupe Suvaxyn® MH-one/infecté. Concernant l'IL-8, des concentrations très significatives ($P < 0,001$, comparé au groupe témoin) ont été mesurées dans tous les groupes éprouvés. Une différence significative a été notée, d'une part, entre le groupe non vacciné/infecté et les groupes Suvaxyn® MH-one/infecté ($P < 0,001$) et rAdP97c/infecté ($P < 0,01$) et, d'autre part, entre ces deux derniers groupes. Finalement, les concentrations de TNF- α ont été significativement augmentées dans les LBAs des groupes infectés mais de manière plus significative ($P < 0,001$) dans les groupes non vacciné/infecté et rAdP97c/infecté.

Figure 22. Effet des vaccins sur la réponse pro-inflammatoire suite à l'infection par *M. hyopneumoniae*. Les lavages broncho-alvéolaires (LBAs) ont été récoltés au jour 56 post-vaccination, soit 4 semaines après l'infection épreuve avec la souche 232 de *M. hyopneumoniae*. Les niveaux des cytokines dans les LBAs des groupes expérimentaux ont été déterminés par ELISA. Les histogrammes correspondent à la concentration moyenne \pm l'écart type, laquelle a été déterminée en fonction de la courbe standard de chaque cytokine étudiée.

a, c et d, différence significative comparée au groupe témoin, Suvaxyn MH-one/infecté et au groupe rAdP97c/infecté, respectivement.

Figure 22.



Ces résultats indiquent qu'il y a une corrélation positive entre le niveau des cytokines pro-inflammatoires dans les LBAs et la protection contre *M. hyopneumoniae*. De ce fait, il a été intéressant de noter des niveaux significativement plus faibles ($P < 0,05$) d'IL-8 et de TNF- α dans les LBAs des animaux vaccinés avec rAdP97c que dans ceux du groupe vacciné/infecté.

Un résultat surprenant est qu'il a été noté une hausse d'IL-1 β et d'IL-6 dans le groupe rAdP97c/infecté par rapport au groupe non vacciné/infecté. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que ces deux cytokines sont impliquées dans l'activation de lymphocytes B. En effet, il a été observé plus de plasmocytes dans les LBAs des animaux vaccinés avec le rAdP97c que dans ceux des autres groupes expérimentaux (**figure 21B**).

2.5. Réduction du titre de l'agent pathogène

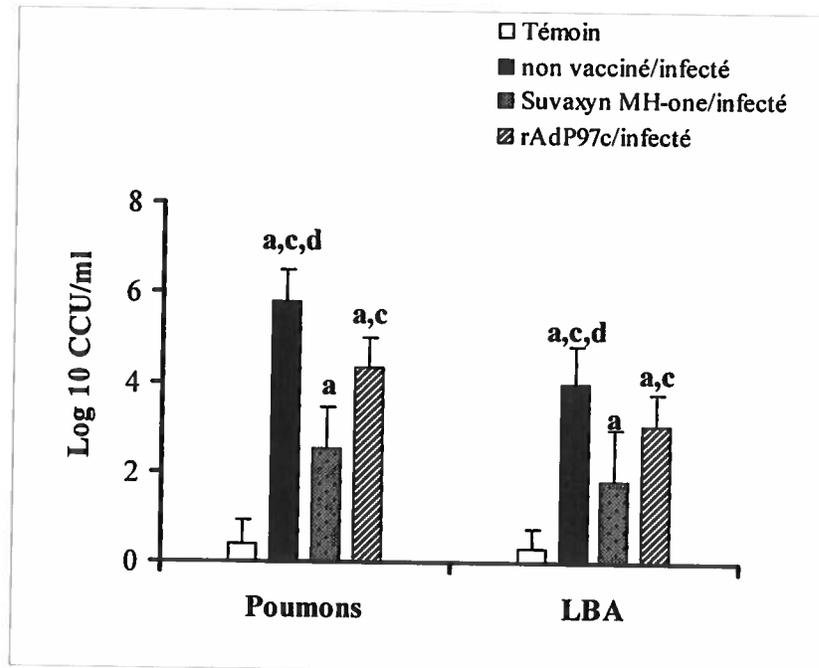
Afin de compléter l'étude sur la protection conférée par les vaccins suite à l'infection épreuve avec la souche virulente 232 de *M. hyopneumoniae*, nous avons quantifié l'agent pathogène dans les LBAs et les broyats de poumons provenant des différents groupes expérimentaux. Pour ce faire, ces échantillons ont été mis en culture et les titres du mycoplasme ont été déterminés en fonction du changement de la couleur du milieu (du rouge au jaune orangé) tel que décrit dans la section 8 (voir Matériel et Méthodes).

Le mycoplasme n'a été détecté ni dans les LBAs ni dans les broyats de poumons des animaux témoins (**figure 23**). En revanche, il a été décelé chez les animaux non vaccinés mais infectés à des titres moyens de $10^{5,8} \pm 0,836$ CCU/ml dans les poumons et de $10^4 \pm 0.707$ CCU/ml dans les LBAs. De manière intéressante, la quantité de l'agent pathogène a été significativement plus faible dans les échantillons provenant des animaux vaccinés avec le rAdP97c ($10^{4,3}$ CCU/ml dans les broyats de poumons et $10^{3,1}$ CCU/ml dans les LBAs). Tel qu'attendu, en tenant compte des résultats des lésions pulmonaires, des titres beaucoup plus faibles de l'agent pathogène ont été obtenus chez les animaux

Figure 23. Effet des vaccins sur la réduction du titre de *M. hyopneumoniae* dans les poumons et les lavages broncho-alvéolaires. Des dilutions décimales de LBAs et de broyats de poumons issus des différents groupes expérimentaux ont été mises en cultures pendant 5 jours tel que décrit dans Matériel et Méthodes. Les titres ont été déterminés en considérant la dernière dilution pour laquelle le changement de couleur du milieu du rouge au jaune-orangé a été observé. Les histogrammes représentent les titres moyens exprimés en \log_{10} CCU (color changing unit)/ml \pm l'écart type.

a, c et d, différence significative comparée au groupe témoin, Suvaxyn MH-one/infecté et au groupe rAdP97c/infecté, respectivement.

Figure 23.



vaccinés avec Suvaxyn® MH-one ($10^{2.5}$ CCU/ml dans les broyats de poumons et $10^{1.8}$ CCU/ml dans les LBAs). Ces résultats confirment que le rAdP97c agit contre l'infection à *M. hyopneumoniae* mais de manière moins efficace que la bactérine Suvaxyn® MH-one.

3. Évaluation de la réponse immunitaire post-vaccination et post-infection épreuve

Lors de cette étude, les porcs ont été vaccinés deux fois, aux J0 et J14, avec le rAdP97c par voie intranasale D'autres ont été immunisés une fois (au J0) avec le vaccin commercial anti-*M. hyopneumoniae* Suvaxyn® MH-one par voie intramusculaire Les infections épreuves ont été réalisées au J28 après la première vaccination. À différents moments, nous avons récolté les sérums, les salives, les LBAs ainsi que les PMBCs afin d'évaluer la réponse humorale systémique et mucoale ainsi que celle à médiation cellulaire provoquées par les vaccins et l'infection par l'agent pathogène.

3.1. Évaluation de la réponse humorale systémique

3.1.1. Induction des anticorps IgG et IgA totaux

Avant d'immuniser les porcs avec les deux vaccins étudiés, il était important de déterminer leur statut sérologique vis-à-vis de *M. hyopneumoniae*. Pour ce faire, nous avons utilisé le test ELISA commercial «HerdChek *Mycoplasma hyopneumoniae* Antibody» lequel quantifie les IgG dirigés contre les antigènes totaux du mycoplasme.

Comme le montrent les résultats du **tableau 10**, tous les animaux étaient séronégatifs pour l'agent pathogène avant les expérimentations. En effet, tous les groupes expérimentaux ont présenté un rapport E/P largement en dessous du seuil de séropositivité de 0,3 qui est fixé par le kit. De plus, cette séronégativité a été le résultat observé pour le groupe témoin tout au long de l'étude.

En utilisant le même kit, il n'a pas été possible de détecter la réponse positive chez les animaux vaccinés avec le rAdP97c. En effet de J14 à J56, aucun animal de ce groupe

n'a montré une séroconversion. Ce qui suggère que ce test n'est pas fiable pour révéler la présence d'anticorps dirigés contre un seul antigène tel que la P97, à moins que celui-ci soit présent en quantité détectable dans la composition antigénique de ce kit. En revanche, les IgG anti-*M. hyopneumoniae* ont été mis en évidence dans le groupe Suvaxyn® MH-one/infecté à partir de la deuxième semaine post-vaccination et il a été possible de constater que le niveau de cette réponse augmentait à J28 et était considérablement amplifiée après l'infection épreuve (J42). Par ailleurs, de façon surprenante, une baisse significative du niveau de la réponse a été notée à J56 post-vaccination, soit 4 semaines après l'infection épreuve. Avec le test «HerdChek *Mycoplasma hyopneumoniae*», il a été également possible de détecter les IgG dirigés contre *M. hyopneumoniae* chez les animaux du groupe non vacciné/infecté. Toutefois, le niveau de la réponse n'a été significatif qu'après 28 jours d'infection. Ce résultat est en accord avec ceux d'une étude ayant démontré que la séroconversion suscitée par *M. hyopneumoniae* est faible et progressive (Murphy *et al.*, 1993).

Afin de mettre en évidence la réponse en anticorps induite par le rAdP97c, nous avons effectué des ELISA en utilisant uniquement la P97c comme antigène de fixation. Ainsi, comme le montrent les résultats à la **figure 24A**, les IgG anti-P97c ont été détectés dans les sérums des animaux vaccinés avec rAdP97c. Tous les animaux de ce groupe ont développé une réponse en IgG anti-P97c aussitôt que J14 post-vaccination à titre moyen de plus de 3 log₁₀, très significatif ($P < 0,001$) comparé au groupe témoin, et qui était augmenté après la dose de rappel jusqu'à un titre moyen de 4 log₁₀ (J28 post-vaccination). À J28 post-vaccination, les IgG anti-P97c ont également été détectés dans les sérums des animaux du groupe Suvaxyn® MH-one/infecté (à un titre moyen de 1,6 log₁₀) qui n'était toutefois pas significativement différent comparé au groupe témoin. Néanmoins, ceci indique que le vaccin Suvaxyn® MH-one contient l'antigène P97 mais, possiblement, en très faible quantité pour stimuler une forte réponse immunitaire dans un contexte de compétition antigénique.

Après l'infection épreuve avec la souche 232 de *M. hyopneumoniae*, à J42 post-vaccination, il a été noté une élévation importante du niveau des IgG anti-P97c dans les deux groupes de porcs vaccinés. Cette observation a été intéressante car elle indique que la P97 a été exprimée *in vivo* par le mycoplasme. En effet, nous avons également mis en évidence les IgG anti-P97c dans les sérums du groupe non vacciné/infecté à des titres au dessus de 2 et 3 log₁₀ à la deuxième semaine (J42 post-vaccination) et à la quatrième semaine (J56 post-vaccination) post-infection, respectivement.

Tableau 10. Détection des IgG sériques anti-*M. hyopneumoniae* à l'aide du kit «HerdChek *Mycoplasma hyopneumoniae* Antibody».

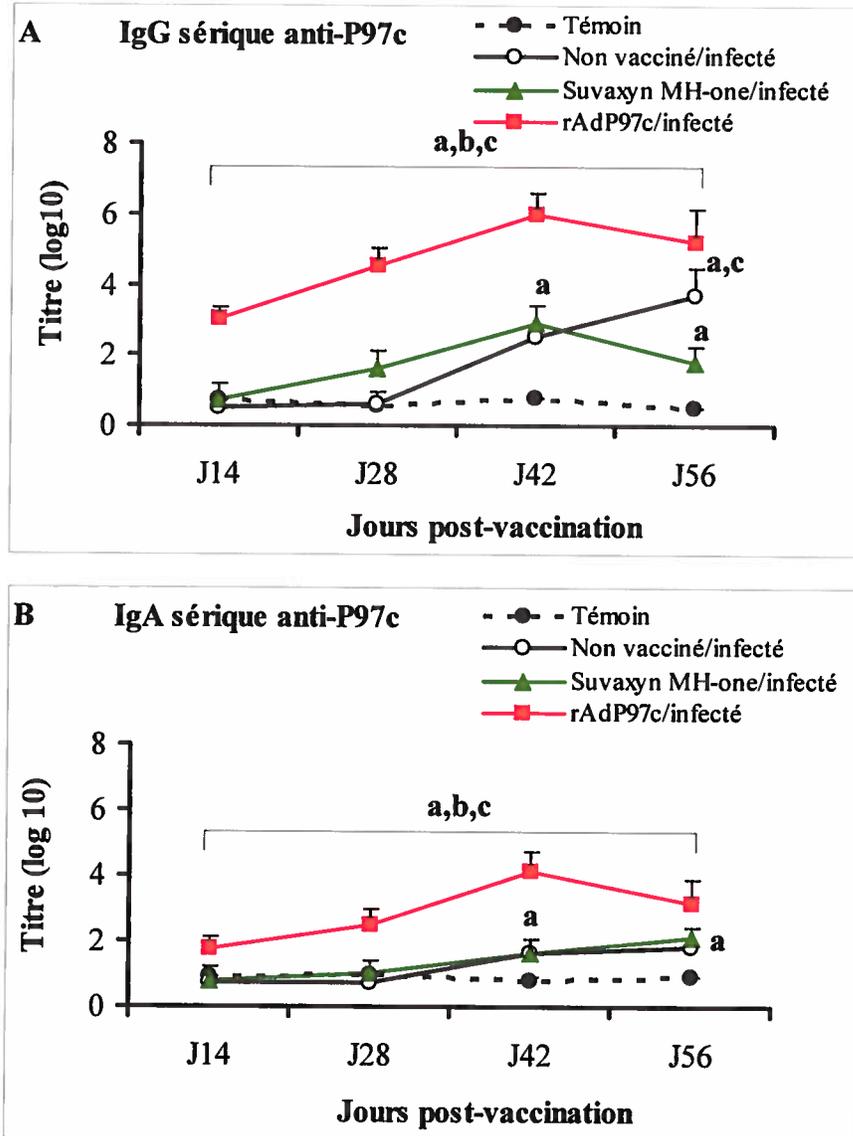
Groupes expérimentaux	Rapport E/P moyen ± écart-type (nombre de porcs séropositifs par groupe)				
	J0	J14	J28	J42	J56
Témoin (n = 5)	0,013 ± 0,015(0/5)	0,026±0,057 (0/5)	0,042 ± 0,027 (0/5)	0,044 ± 0,021 (0/5)	0,062 ± 0,014 (0/5)
Non vacciné/infecté (n = 5)	0,028 ± 0,025 (0/5)	0,028 ± 0,024(0/5)	0,022 ± 0,019 (0/5)	0,194 ± 0,083 (1/5)	0,36 ± 0,182 (3/5)
Suvaxyn ® MH-one/infecté (n = 8)	0,029 ± 0,024 (0/8)	0,24 ± 0,019(2/8)	0,455 ± 0,164 (5/8)	1,3 ± 0,426 (8/8)	0,75 ± 0,501 (8/8)
rAdP97c/infecté (n = 10)	0,026 ± 0,013 (0/10)	0,044 ± 0,104(0/10)	0,055 ± 0,085 (0/10)	0,154 ± 0,094 (0/10)	0,096 ± 0,084 (0/10)

Les sérums ont été obtenus à partir de tous les animaux de chaque groupe expérimental au jour 0 (avant vaccination) puis toutes les deux semaines jusqu'à J56 post-vaccination. Ils ont été évalués pour la présence d'IgG dirigés contre les antigènes totaux de *M. hyopneumoniae* par ELISA à l'aide du kit commercial «HerdChek *Mycoplasma hyopneumoniae* Antibody». Un rapport E/P > 0,3 indique que l'échantillon est séropositif. N, nombre d'animaux.

Figure 24. Cinétique de la réponse humorale systémique anti-P97c suite à la vaccination et à l'infection par *M. hyopneumoniae*. Les sérums ont été récoltés aux jours 14 et 28 post-vaccination et après l'infection épreuve avec la souche 232 de *M. hyopneumoniae* (J42 et J56 post-vaccination). Ils ont été examinés pour la présence des IgG anti-P97c (A) ou des IgA anti-P97c (B) par ELISA. Les titres moyens des groupes expérimentaux, exprimés en $\log_{10} \pm$ l'écart type, ont été estimés par extrapolation à partir d'une courbe standard correspondant à chaque type d'immunoglobuline.

a, b et c, différence significative comparée au groupe témoin, non vacciné/infecté et au groupe Suvaxyn MH-one/infecté, respectivement.

Figure 24.



La capacité de la souche 232 de *M. hyopneumoniae* de produire la P97 *in vivo* a déjà été rapportée (Adams *et al.*, 2005). Cette observation démontre que le vecteur rAdP97c ainsi que le vaccin Suvaxyn® MH-one sont capables d'induire une réponse mémoire contre la P97 qui est restimulée lors d'une rencontre ultérieure avec ce même antigène. Tel que constaté lors des tests ELISA réalisés avec le kit «HerdChek *Mycoplasma hyopneumoniae* Antibody», une baisse de la réponse anti-P97c a été enregistrée dans les deux groupes vaccinés à partir de la quatrième semaine après l'infection épreuve (J56 post-vaccination).

Parallèlement à l'analyse des IgG, nous avons examiné la réponse en IgA anti-P97c dans les sérums des différents groupes expérimentaux. Comme le démontrent les résultats à la figure 24B, les anticorps ont été révélés dans les sérums des animaux vaccinés avec rAdP97c à un titre significatif ($P < 0,05$) comparé au groupe témoin à partir de J14 post-vaccination, et le niveau de la réponse a été sensiblement accru après la dose rappel à un titre de 2,5 log₁₀ (J28 post-vaccination). En revanche, il n'a été possible de détecter les IgA anti-P97c dans les sérums des animaux immunisés avec Suvaxyn® MH-one. Ce résultat n'est pas surprenant car les anticorps IgA sont généralement produits au niveau des muqueuses suite à une activation locale des lymphocytes B. Alors, le fait que les IgA anti-P97c aient été détectés dans les sérums de porcs vaccinés avec rAdP97c suggère que l'inoculation par voie intranasale de celui-ci provoque une forte production des IgA anti-P97c au niveau des muqueuses respiratoires qui se traduit par la migration d'une partie de ces anticorps au niveau systémique.

3.1.2. Type de la réponse humorale anti-P97c au niveau systémique

Afin de déterminer le type de réponse humorale systémique (de type Th1 ou Th2) provoqué par les deux vaccins et suite à l'infection épreuve, nous avons quantifié les IgG1 et d'IgG2a dans les sérums issus de différents groupes expérimentaux. Il a été décrit dans la littérature que, chez le porc, la prédominance des IgG2a sur les IgG1

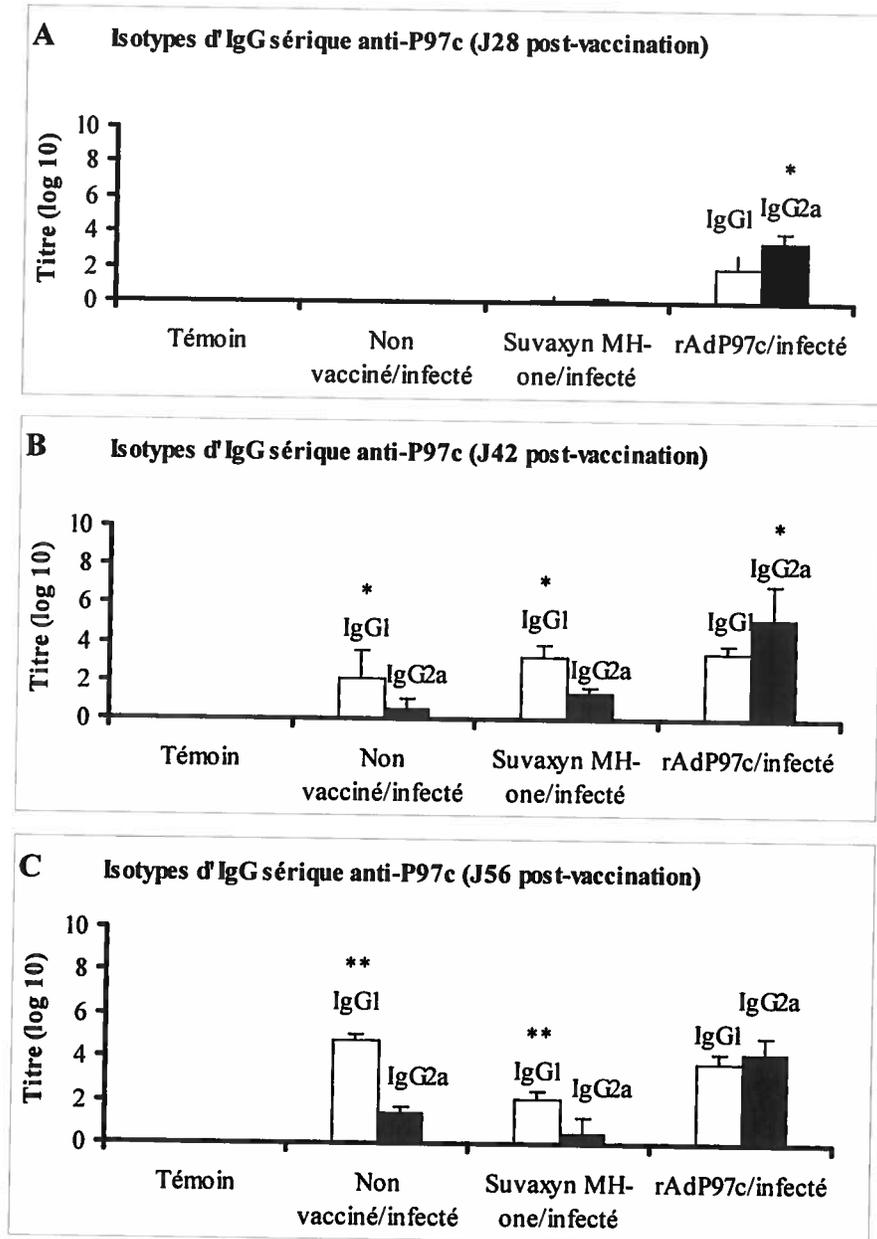
indique l'induction d'une réponse de type Th1, alors que l'inverse suggère la stimulation d'une réponse de type Th2 (Crawley et Wilkie, 2003).

Les résultats présentés à la **figure 25A** montrent qu'avant l'infection épreuve, J28 post-vaccination, les animaux vaccinés avec rAdP97c ont développé des titres élevés d'IgG1 et d'IgG2a anti-P97c. Les niveaux d'IgG2a étaient significativement plus élevés ($P < 0,05$) que ceux d'IgG1, indiquant que le vecteur rAdP97c favorise une réponse en anticorps anti-P97c de type Th1 au niveau systémique. Tel qu'attendu, compte tenu du faible taux d'IgG anti-P97c totaux, il n'a pas été possible ces isotypes anti-P97c dans les sérums des animaux vaccinés avec Suxvaxyn® MH-one. À J42 post-vaccination, soit deux semaines après l'infection épreuve, la réponse en anticorps IgG2a anti-p97c a été toujours prédominante dans le groupe rAdP97c/infecté, alors que celle d'IgG1 a surpassé celle des IgG2a dans le groupe Suxvaxyn® MH-one/infecté ainsi que dans le groupe non vacciné mais/infecté (**figure 25B**). À J56 post-vaccination, il a été clairement noté une forte réponse des IgG1 anti-P97c par rapport à celle des IgG2a dans les groupes non vacciné/infecté et Suxvaxyn® MH-one/infecté, ce qui est en faveur d'une réponse de type Th2. En revanche, il n'a pas été constaté une différence significative ($P > 0,05$) entre les titres moyens d'IgG1 et d'IgG2a dans le groupe rAdP97c/infecté (**figure 25C**).

En résumé, ces résultats montrent que le vecteur rAdP97c favorise une réponse de type Th1 anti-P97c au niveau systémique, alors que l'infection à *M. hyopneumoniae* polarise cette réponse vers le type Th2. Par ailleurs, ces résultats ne permettent pas de tirer une conclusion quant au type de réponse anti-P97c induite par le vaccin Suxvaxyn® MH-one étant donné qu'une partie des anticorps IgG1 mesurés dans ce groupe pourrait résulter de la réponse suscitée suite à l'infection épreuve et non par le vaccin lui-même.

Figure 25. Cinétique de la réponse des isotypes IgG1 et IgG2a sériques anti-P97c suite à la vaccination et à l'infection par *M. hyopneumoniae*. Ces isotypes ont été quantifiés par ELISA et les titres moyens, exprimés en $\log_{10} \pm$ l'écart type, ont été estimés par extrapolation à partir d'une courbe standard correspondant à chaque isotype. **A**, avec les sérums récoltés à J28; **B**, à J42 ; et **C**, à J56 post-vaccination. *, différence significative entre les IgG1 et IgG2a à l'intérieur du même groupe (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

Figure 25.



3.2. Évaluation de la réponse humorale mucoale

La réponse en anticorps anti-P97c au niveau des muqueuses respiratoires a été examinée au niveau des salives et des LBAs. Il est à noter que ces échantillons ont été collectés uniquement aux J28 et J56 post-vaccination car ce furent les seuls moments durant lesquels les animaux ont été anesthésiés ou euthanasiés.

3.2.1. Induction des anticorps IgG et IgA anti-P97c dans les salives et les LBAs

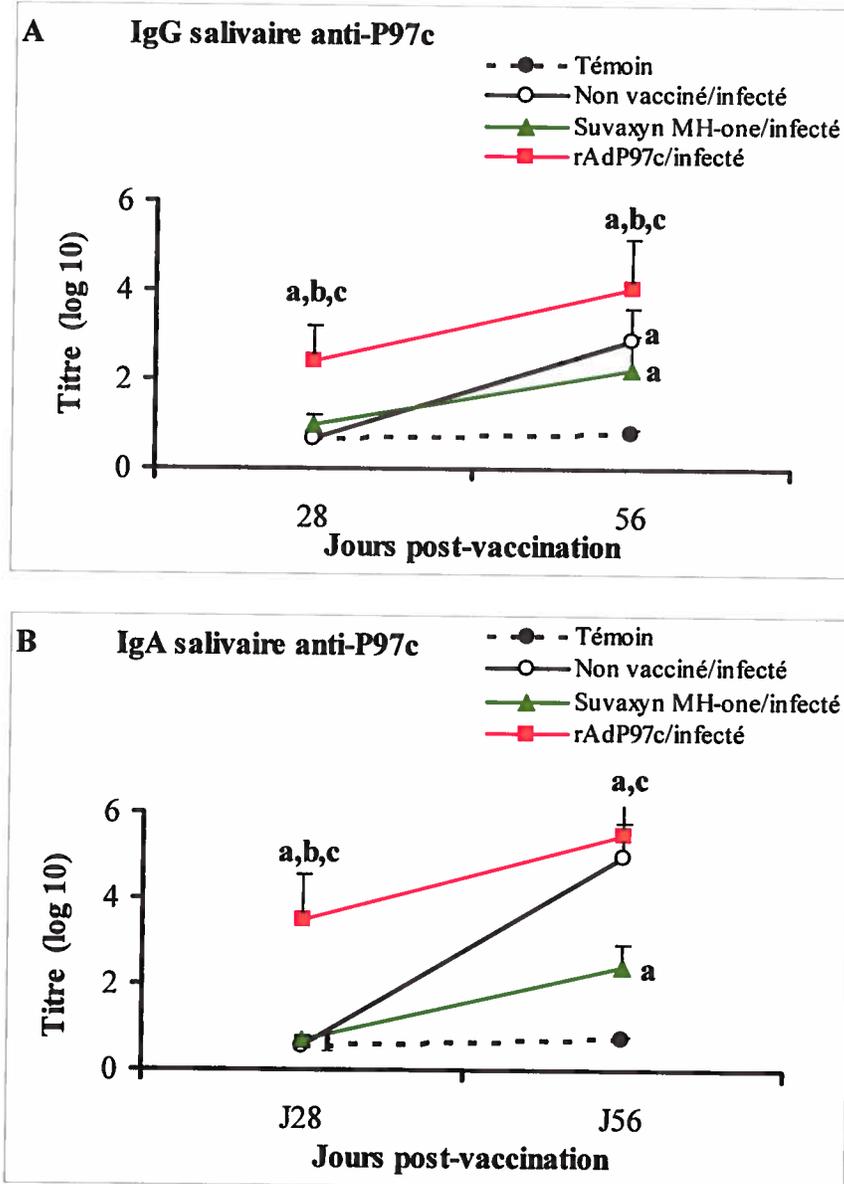
Tel qu'illustré à la **figure 26A**, les titres élevés d'IgG anti-P97c n'ont pas été observés dans les salives des porcs vaccinés avec Suvaxyn® MH-one à J28 post-vaccination; tous les animaux de ce groupe ont montré des niveaux d'anticorps comparables à ceux des animaux du groupe témoin et du groupe non vacciné/infecté. En revanche, les IgG anti-P97c ont été quantifiés à des titres très significatifs ($P < 0,01$, comparé au groupe témoin) dans les salives des animaux vaccinés avec rAdP97c. Ces anticorps ont été également détectés de manière significative dans les salives de tous les groupes éprouvés après l'infection épreuve avec la souche 232 de *M. hyopneumoniae* à J56 post-vaccination. Il est à souligner que pour les deux groupes vaccinés, les anticorps anti-p97c générés en réponse à l'infection épreuve ont pu aussi être comptabilisés.

En ce qui concerne la réponse des IgA anti-P97c dans les salives (**figure 26B**), un profil similaire à celui des IgG a été observé. À J28 post-vaccination, des taux élevés d'IgA anti-P97c (titre moyen $> 3 \log_{10}$), très significative ($P < 0,01$) comparativement au groupe témoin, ont été quantifiés dans le groupe rAdP97c/infecté. Ce résultat démontre que l'inoculation du rAdP97c par voie intranasale induit une forte réponse mucoale contre la P97c. Celle-ci a été confortée après l'infection épreuve (J56 post-vaccination) où un titre moyen supérieur à $5 \log_{10}$ a été obtenu. Par contre, les IgA anti-P97c ont été trouvés dans les salives des animaux vaccinés avec Suvaxyn® MH-one à des titres significatifs comparé au groupe témoin ont été trouvés qu'après l'infection épreuve (titre moyen $> 2 \log_{10}$). Par ailleurs, les IgA anti-P97c ont été également trouvés de façon très

Figure 26. Réponse humorale mucoale anti-P97c suite à la vaccination et à l'infection par *M. hyopneumoniae*. Les salives ont été collectées avant (à J28) et après l'infection épreuve (à J56 post-vaccination) puis évaluées pour la présence des IgG (A) et des IgA anti-P97c (B) par ELISA. Les titres moyens de ces anticorps, exprimés en $\log_{10} \pm$ l'écart type, ont été déterminés par extrapolation à partir d'une courbe standard correspondant à chaque immunoglobuline.

a, b et c, différence significative comparée au groupe témoin, non vacciné/infecté et au groupe Suvaxyn MH-one/infecté, respectivement.

Figure 26.



significative (titre moyen $> 5 \log_{10}$) dans les salives du groupe non vacciné/infecté. Ceci pourrait expliquer leur présence dans les salives des porcs du groupe Suvaxyn® MH-one/infecté et leur élévation dans ceux du rAdP97c/infecté.

Afin de confirmer les observations précédentes, nous avons examiné la réponse de ces anticorps dans les LBAs. Ainsi, tel qu'attendu, les IgG et les IgA anti-P97c ont été détectés de façon significative dans les LBAs de tous les groupes infectés par *M. hyopneumoniae* (**figure 27**). Comme dans les salives récoltées à J56 post-vaccination, une forte réponse des IgG et IgA contre la P97c provoquée par l'agent pathogène lui-même pourrait expliquer leur élévation dans les LBAs des groupes vaccinés. Néanmoins, les titres élevés de ces anticorps quantifiés dans le groupe rAdP97c/infecté, comparativement aux deux autres groupes éprouvés, confirment que le vecteur rAdP97c stimule une forte réponse au niveau des muqueuses respiratoires contre la P97c.

3.2.2. Type de la réponse humorale anti-P97c au niveau des muqueuses respiratoires

Dans le but de déterminer quel était le type de la réponse immunitaire induite par les vaccins et par l'infection épreuve au niveau des muqueuses respiratoires, nous avons évalué par ELISA la réponse en IgG1 et IgG2a anti-P97c dans les salives et les LBAs des groupes expérimentaux. Les résultats à la **figure 28A** montrent, qu'à J28 post-vaccination, ces isotypes anti-P97c ont été détectés dans les salives des animaux vaccinés avec rAdP97c, avec des niveaux d'IgG2a significativement plus élevés ($P < 0,05$) par rapport aux IgG1. Tel qu'attendu, ces anticorps n'ont pas été observés dans les autres groupes expérimentaux. À J56 post-vaccination (**figure 28B**), il a été détecté approximativement 6 fois plus d'IgG1 que d'IgG2a dans les salives du groupe non vacciné/infecté ce qui expliquerait encore une fois leur prédominance dans les salives du groupe Suvaxyn® MH-one/infecté et leur augmentation dans les salives des animaux vaccinés avec le rAdP97c. Les mêmes profils d'IgG1 et d'IgG2a anti-P97c ont été retrouvés dans les LBAs (**figure 28C**) confirmant une fois de plus que le vecteur rAdP97c

Figure 27. Réponse humorale anti-P97c dans les lavages broncho alvéolaires (LBAs) suite à la vaccination et à l'infection par *M. hyopneumoniae*. Les LBAs ont été effectués à J56 post-vaccination puis examinés pour la présence d'IgG et d'IgA anti-P97c par ELISA. Les titres moyens de ces anticorps, exprimés en $\log_{10} \pm$ l'écart type, ont été déterminés par extrapolation en fonction d'une courbe standard correspondant à chaque immunoglobuline.

a, b et c, différence significative comparée au groupe témoin, non vacciné/infecté et au groupe Suvaxyn MH-one/infecté, respectivement.

Figure 27.

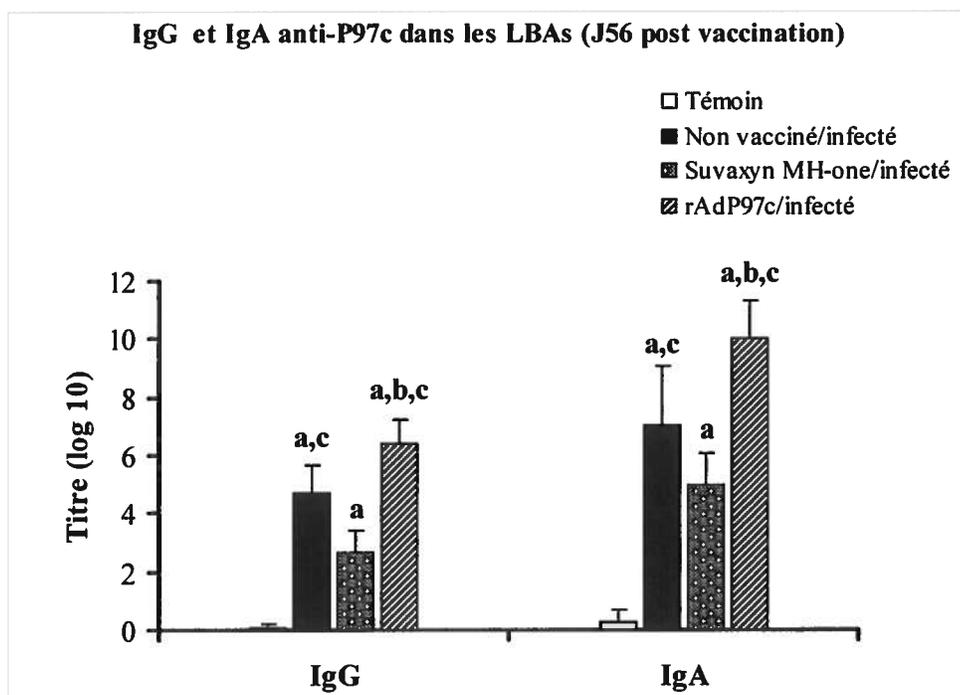
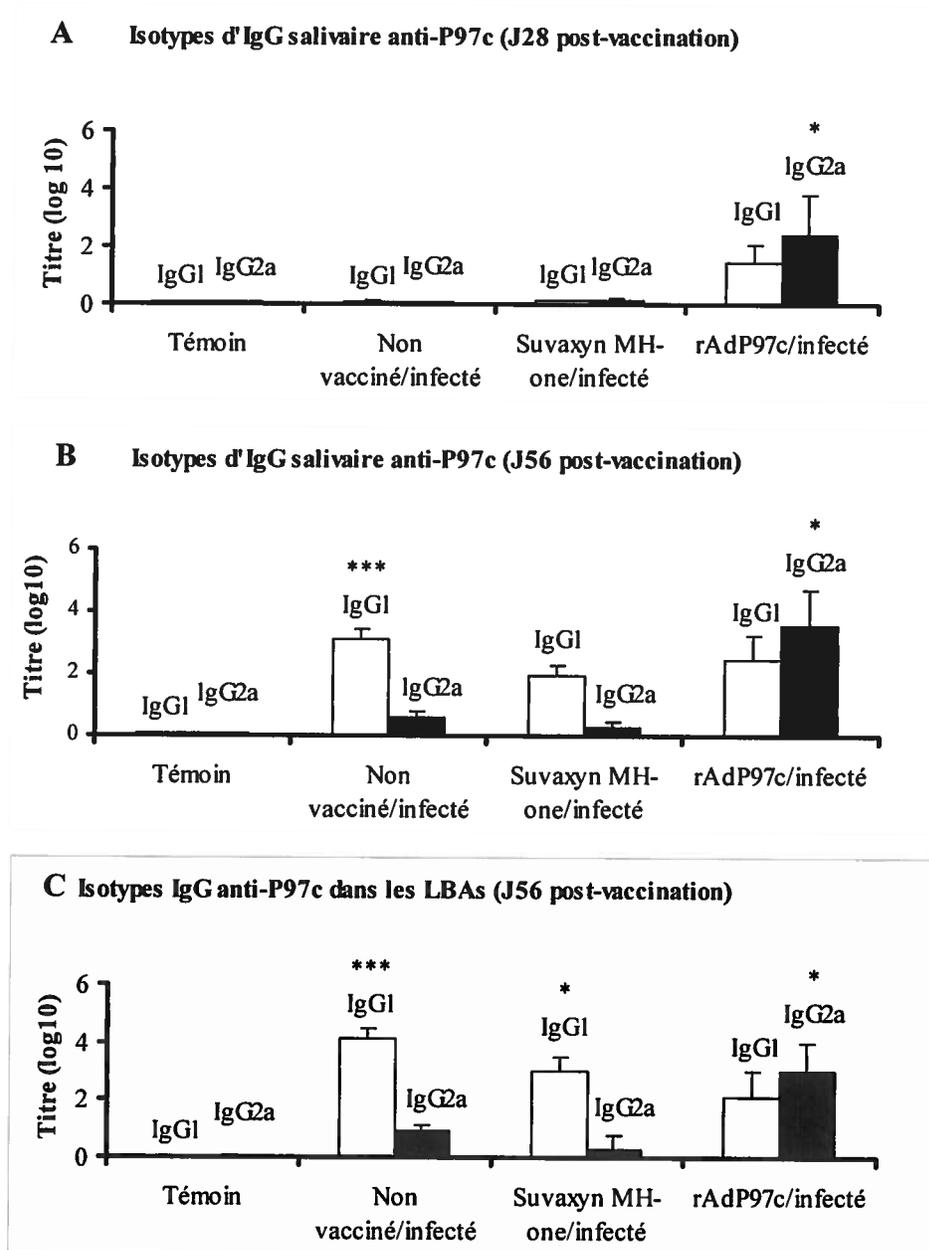


Figure 28. Profil d'isotypes d'IgG anti-P97c dans les salives et les lavages broncho-alvéolaires (LBAs). Les niveaux d'IgG1 et d'IgG2a ont été évalués par ELISA. Les histogrammes représentent les titres moyens, exprimés en $\log_{10} \pm$ l'écart-type. * différence significative entre les IgG1 et IgG2a à l'intérieur du même groupe (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

Figure 28.



favorise une réponse de type Th1 contre la P97c au niveau mucosale, alors que l'infection par la souche 232 de *M. hyopneumoniae* stimule une réponse type Th2.

3.3. Réponse à médiation cellulaire

Cette réponse a été examinée par des TTLs *in vitro* avec les PBMCs mises en culture en présence soit de la P97c, soit d'extraits de protéines totales de la souche 232 de *M. hyopneumoniae* ou de la ConA. La réponse lymphoproliférative a été mesurée en utilisant la méthode de marquage au BrdU (bromodésoxyuridine) qui est un analogue de la thymidine et qui s'incorpore à la place de celui-ci dans l'ADN des cellules en phase S de la mitose. Ainsi, à l'aide d'un AcMo anti-BrDU, il est possible de quantifier les cellules qui sont en division (Maghni *et al.*, 1999, Messele *et al.*, 2000). Un indice de prolifération au dessus de 3 est considéré comme étant significatif (Thacker *et al.*, 1998).

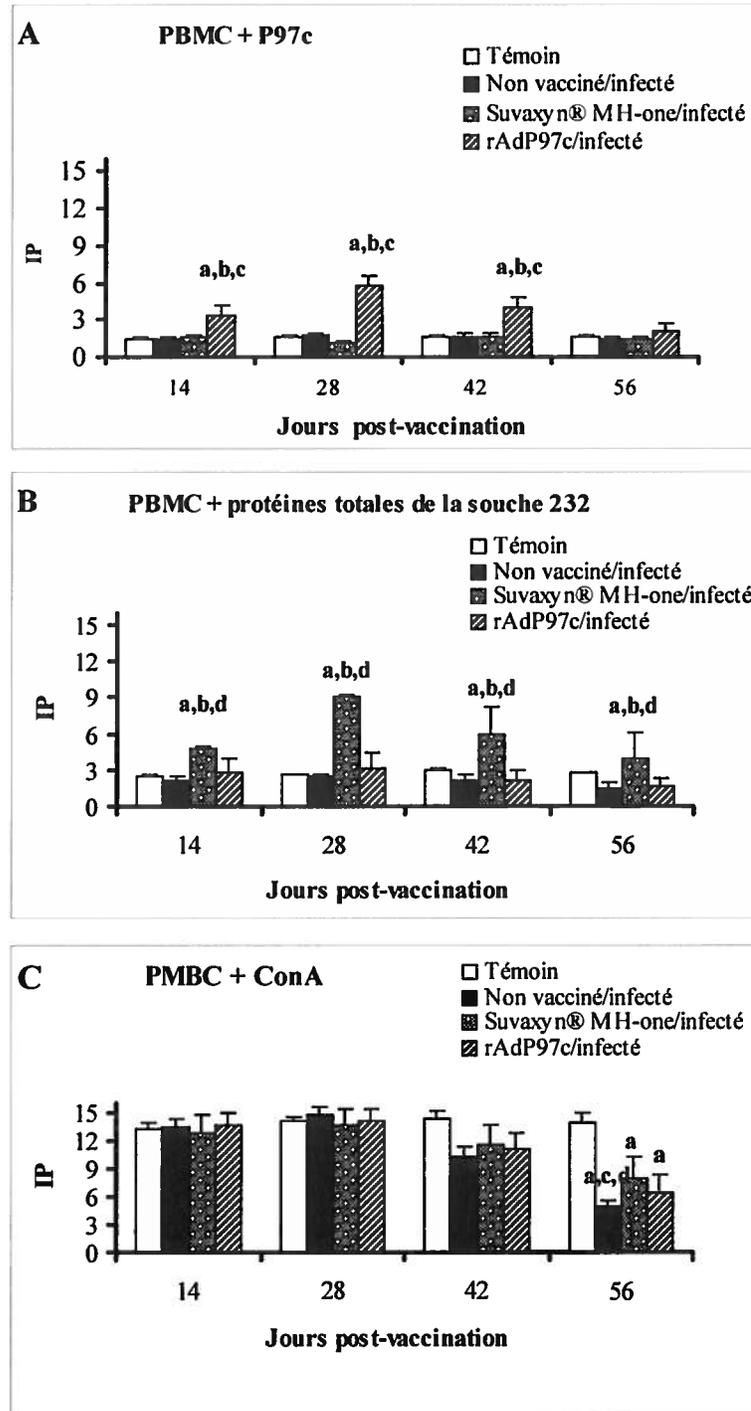
Lorsque les PBMCs étaient cultivées en présence de P97c (**figure 29A**), une réponse proliférative a été notée uniquement avec les cellules provenant des animaux vaccinés avec rAdP97c. Cette réponse était très significative ($P < 0,01$) à J14 post-vaccination, avec un indice de prolifération moyen de $3,4 \pm 0,694$. De plus, elle était augmentée après la dose rappel de rAdP97c (J28 post-vaccination) indiquant que le vecteur rAdP97c stimule une réponse à médiation cellulaire mémoire contre la P97c. Une baisse significative de cette réponse a été toutefois constatée après l'infection épreuve jusqu'à devenir non significative à J56 post-vaccination.

Lorsque les PBMCs ont été stimulées avec les protéines totales de la souche 232 de *M. hyopneumoniae*, une prolifération cellulaire significative n'a été observée qu'avec les PBMCs provenant des porcs vaccinés avec Suvaxyn® MH-one (**figure 29B**). Cette réponse proliférative était également très significative ($P < 0,01$) à partir J14 post-vaccination, avec un indice de prolifération moyen de $4,76 \pm 0,671$. Une baisse a également été notée suite à l'infection épreuve.

Figure 29. Réponse lymphoproliférative suite à la vaccination et l'infection par *M. hyopneumoniae*. Les PBMCs des différents groupes expérimentaux ont été isolées avant (J14 et J28 post-vaccination) et après (J42 et J56 post-vaccination) l'infection épreuve avec la souche 232 de *M. hyopneumoniae*. Leur réponse prolifération a été évaluée après leur stimulation avec la P97c (**A**), les protéines totales du mycoplasme (**B**) ou avec la ConA (**C**). Les histogrammes représentent les indices de prolifération (IP) moyens \pm l'écart type.

a, b, c et d, différence significative comparée au groupe témoin, non vacciné/infecté, Suvaxyn MH-one/infecté et au groupe rAddP97c/infecté, respectivement.

Figure 29.



En parallèle, nous avons également réalisé les TTL en utilisant le mitogène ConA afin de valider les résultats obtenus avec les antigènes mentionnés ci-haut. Ainsi, comme le montrent les résultats à la **figure 29C**, les PBMCs de tous les groupes expérimentaux ont répondu très significativement et de manière similaire à la stimulation par la ConA avant l'infection épreuve (aux J14 et J28 post-vaccination). Par ailleurs, une baisse significative de la réponse lymphoproliférative a été enregistrée dans tous les groupes éprouvés par *M. hyopneumoniae*. Cette baisse a été cependant plus importante dans le groupe non vacciné/infecté ainsi que dans le groupe rAdP97c/infecté confirmant l'effet protecteur de Suvaxyn® MH-one.

Ces résultats démontrent que les deux types de vaccins sont capables de stimuler la réponse à médiation cellulaire contre les antigènes de *M. hyopneumoniae* mais l'infection par cet agent pathogène semble réguler à la baisse la réponse médiation cellulaire suscitée par rAdP97c et Suvaxyn® MH-one.

4. Inhibition de croissance *in vitro*

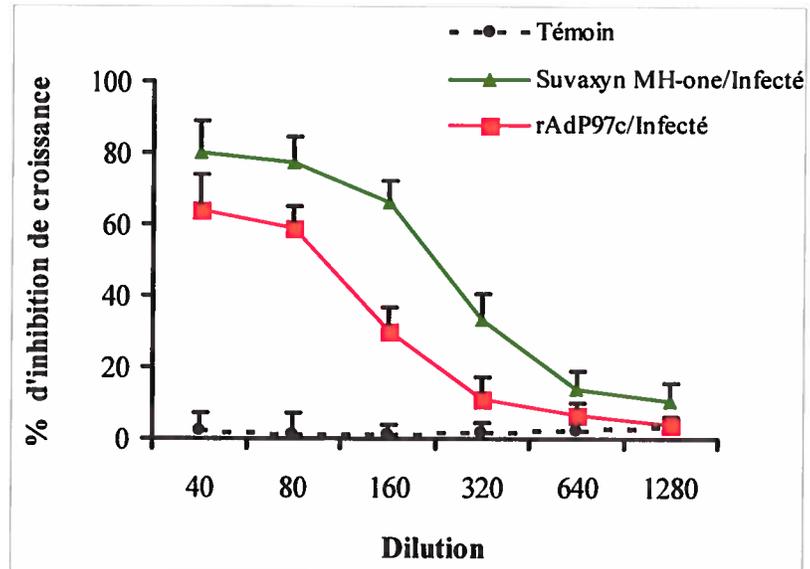
Afin d'expliquer en partie les raisons de la supériorité du vaccin Suvaxyn® MH-one face au vecteur rAdP97c, particulièrement en termes de protection contre l'infection par la souche 232 de *M. hyopneumoniae*, nous avons réalisé des tests d'inhibition de croissance. Ce test consiste à mesurer la capacité d'anticorps à inhiber la croissance de l'agent pathogène. Rappelons que la croissance du mycoplasme en milieu liquide cause la baisse du pH qui se traduit par l'acidification et le changement de couleur rouge du milieu (due à l'ajout du rouge de phénol) en jaune-orangé ou en jaune si la croissance est trop forte. Ainsi, la lecture de la DO (par exemple à 560 nm) permet de suivre la croissance du microorganisme.

Les tests d'inhibition de croissance ont été réalisés avec les sérums récoltés à J28 post-vaccination aussi bien chez les animaux vaccinés que chez les animaux témoins. Les résultats (figure 30) montrent que les sérums des animaux vaccinés avec rAdP97 ainsi

qu'avec Suvaxyn® MH-one inhibent de manière dose-dépendante la croissance de l'agent pathogène. Aucune inhibition de la croissance n'a été observée avec les sérums témoins indiquant que l'effet noté est spécifique aux anticorps anti-mycoplasme. Toutefois aux mêmes dilutions de 1:40 à 1:320, les sérums du groupe vaccin Suvaxyn® MH-one/infecté ont montré un effet inhibiteur plus marquant que ceux du groupe rAdP97/infecté. Il convient cependant de noter que l'inhibition de croissance n'indique en rien la supériorité vaccinale d'un antigène par rapport à un autre. En effet, il a été démontré que plusieurs antigènes de *M. hyopneumoniae* peuvent susciter une réponse en anticorps capables d'inhiber la croissance *in vitro* de l'agent pathogène (Chen *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2005). De plus, il n'y a pas à notre connaissance d'études démontrant l'incapacité des anticorps dirigés contre une protéine quelconque du microorganisme à inhiber sa croissance. Néanmoins, ces résultats révèlent qu'une réponse immunitaire dirigée contre plusieurs antigènes s'interpose mieux contre *M. hyopneumoniae* qu'une réponse immunitaire dirigée contre un seul antigène.

Figure 30. Inhibition *in vitro* de la croissance de *M. hyopneumoniae* par les anticorps anti-P97c de porcs. Approximativement 10^6 CCU du mycoplasme ont été mises en culture dans les plateaux à 96 puits en présence de dilutions en série de sérums récoltés à J28 post-vaccination. Après 5 jours de culture, les densités optiques ont été lues à 560 nm. Les pourcentages (%) d'inhibition ont été déterminés comme suit: $[(\text{DO moyen de la croissance du mycoplasme en présence de l'antisérum} - \text{DO moyen de la croissance du mycoplasme en absence de l'antisérum}) / ((\text{DO moyen du milieu de culture} - \text{DO moyen de la croissance du mycoplasme}))] \times 100$. Les valeurs correspondent aux % moyens d'inhibition \pm l'écart-type.

Figure 30.



CONCLUSION

Les résultats qui ont été présentés dans les différents tableaux et figures démontrent que le vecteur rAdP97c, possède un potentiel protecteur contre *M. hyopneumoniae*. Il a été observé dans cette étude que la vaccination des porcs avec rAdP97c induit une réponse immunitaire humorale locale et à médiation cellulaire contre la P97 qui s'avèrent partiellement protectrices contre *M. hyopneumoniae*. Il a été également noté une amélioration du GMQ chez les animaux vaccinés avec le rAdP97c comparé aux animaux non vaccinés mais infectés avec la souche virulente 232 de *M. hyopneumoniae*. De plus, nos résultats ont clairement montré que la vaccination des porcs avec le vecteur rAdP97c résulte en la réduction significative des lésions pulmonaires macroscopiques de la PEP, du titre de *M. hyopneumoniae* dans les organes pulmonaires. Il prévient aussi le développement d'une réponse pro-inflammatoire excessive en réduisant la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-8 et le TNF- α . Par ailleurs, nos résultats ont aussi révélé que le vecteur rAdP97c est moins efficace que le vaccin commercial Suvaxyn® MH-one sur tous les aspects évoqués d'évaluation de la protection contre la souche hétérologue 232 de *M. hyopneumoniae*.

- DISCUSSION GÉNÉRALE -

L'objectif de ce projet de doctorat était de développer une nouvelle stratégie vaccinale contre la pneumonie enzootique porcine (PEP), une maladie respiratoire d'allure chronique causée par *M. hyopneumoniae*. Cette stratégie était basée sur le vecteur rAdP97c, un AdV5 non répliatif exprimant la portion C-terminale de l'adhésine P97 (P97c) de la souche 25934 de *M. hyopneumoniae*. Puisque cette portion contient les régions RR1 et RR2, qui médient l'adhérence de l'agent pathogène aux cellules épithéliales respiratoires de l'hôte (Hsu et Minion, 1998^a; Minion *et al.*, 2000 ; Jenkins *et al.*, 2006), nous avons émis l'hypothèse qu'un vaccin capable de stimuler une réponse immunitaire mucoale complète, à la fois humorale et à médiation cellulaire contre la P97 pourrait aider à contrôler l'infection à *M. hyopneumoniae*. En effet, il existe dans la littérature quelques exemples où les vaccins à base d'adhésines se sont montrés très efficaces contre les agents pathogènes ciblés (Langermann *et al.*, 1997; Adkins et Wagstaff, 1998). Il a été décidé dans cette étude de choisir un AdV non répliatif comme vecteur de la P97c pour sa capacité à susciter une réponse immunitaire soutenue à la fois humorale et à médiation cellulaire contre le transgène (Zhang *et al.*, 2001; Tatsis et Ertl, 2004; Holst *et al.*, 2008). L'efficacité de vaccins à base d'AdV recombinants contre les maladies porcines a été rapportée dans plusieurs études dont quelques-unes ont été revues dans le **tableau 4**. De plus, un AdV5 recombinant, nommé ONRAB®, qui exprime la glycoprotéine du virus de la rage est actuellement utilisé au Canada contre l'agent pathogène chez le renard, le raton et la mouffette. Ce vaccin est administré sous forme d'appâts et démontre une efficacité protectrice supérieure au vaccin commercial traditionnel (V-RG) (Knowles *et al.*, 2009 ; Rosatte *et al.*, 2009)

Avant de discuter des résultats expérimentaux obtenus au cours de ce projet, remettons tout d'abord en contexte la PEP. Il s'agit d'une maladie répandue dans les élevages de porcs à travers le monde. Elle est responsable de pertes économiques considérables qui sont dues à la perte de croissance des porcs et l'interaction synergique de *M. hyopneumoniae* avec d'autres agents pathogènes du PDRC tels le VSRRP et le CVP-2 (Thacker, 2006). La lutte contre *M. hyopneumoniae* peut être accomplie par divers moyens incluant l'antibiothérapie et la vaccination. Toutefois, comme pour la plupart des

agents pathogènes et tel qu'amplement décrit dans notre revue bibliographique, la vaccination reste le moyen le plus fiable pour parvenir à réduire l'incidence de la PEP.

Les vaccins contre les infections à *M. hyopneumoniae* qui sont actuellement commercialisés sont exclusivement de type bactérine c'est-à-dire préparés à partir de souches inactivées de l'agent pathogène. Sans contredit, et tel qu'observé dans cette étude avec le vaccin Suvaxyn®MH-one ainsi que par d'autres études (Thacker *et al.*, 1998; Baccaro *et al.*, 2006, Maes *et al.*, 2008), ces vaccins sont efficaces contre l'infection à *M. hyopneumoniae*. En effet, ils préviennent le retard de croissance et le développement des lésions pathognomoniques de la PEP. Les bactérines présentent cependant un certain nombre de désavantages incluant leur incapacité à induire une réponse immunitaire durable et stérilisante au niveau des muqueuses respiratoires et, par conséquent, à prévenir le statut d'animaux porteurs. De plus, ils doivent faire face à la variabilité antigénique qui est fréquente chez les mycoplasmes et qui peut résulter en l'apparition d'isolats capables d'échapper à la surveillance immunitaire de l'hôte (Razin *et al.*, 1998). D'où, au regard de la littérature, l'intérêt de plus en plus croissant pour la mise en place des vaccins sous-unitaires. Dans cette optique, le ou les antigènes visés doivent, bien entendu, être présents et relativement conservés parmi les souches de l'agent pathogène. Ce qui semble apparemment être le cas pour l'adhésine P97 (Wilton *et al.*, 1998; Stakenborg *et al.*, 2006). Toutefois, tel qu'observé dans cette étude (**figure 17**) et dans d'autres (Djordjevic *et al.*, 2004, Stakenborg *et al.*, 2006), cette protéine démontre une variabilité en termes et de nombre d'unités répétées dans les régions RR1 et RR2 parmi les souches de *M. hyopneumoniae*. L'impact direct de cette variabilité dans la pathogénèse du microorganisme et de son interaction avec le système immunitaire de l'hôte n'est clairement pas élucidé.

Le premier volet de notre étude consistait à construire notre système vaccinal, à savoir un AdV recombinant non réplcatif qui exprime la P97c de la souche 25934 de *M. hyopneumoniae* (rAdP97c). Cette construction a été réalisée en deux étapes. Dans un premier temps, nous avons cloné notre gène d'intérêt codant pour la P97c dans le vecteur

de transfert. Par la suite, le vecteur rAdP97c a été obtenu suite un processus de recombinaison homologe entre le vecteur de transfert recombinant et le génome de l'AdV5 non répliquatif dans les cellules de complémentarité 293A. Au cours de ces étapes, nous n'avons pas rencontré de difficultés particulières, ce qui indique que la construction d'un tel système vaccinal est relativement facile à réaliser. De plus, nous avons obtenu un titre viral important de l'ordre de 2×10^{11} TCID₅₀/ml à partir de seulement 500 ml de culture. Ceci représente un avantage par rapport à la préparation de bactérines où l'obtention des doses vaccinales nécessite de grands volumes de culture, et ce en raison de la faible croissance de *M. hyopneumoniae in vitro* (Razin *et al.*, 1998).

Il est connu qu'une quantité suffisante d'antigène est requise pour sa reconnaissance par les cellules présentatrices d'antigènes lesquelles vont ensuite donner l'ordre aux lymphocytes B de proliférer et de se différencier en plasmocytes producteurs d'anticorps spécifiques. Nos résultats d'immunofluorescence indirecte et d'immunobuvardage de type Western ont montré que le rAdP97c induit une forte expression de la P97c *in vitro* dans les cellules 293A mais aussi dans les cellules NPTr qui ne permettent pas sa répliquation (**figures 12**). Toutefois, il a été aussi noté, après la révélation par chimioluminescence (ECL), la présence d'un fragment protéique d'approximativement 26 kDa dans les lysats des cellules 293A infectées avec le rAdP97c ou transfectées avec pAdP97c (**figure 13B**). Ce fragment a été également observé lors de production de la P97c chez *E. coli* (**figure 11**). Il est fort possible que celui-ci ne soit pas un produit de dégradation de la P97c. En effet, il a été rapporté auparavant que l'adhésine P97 subit des modifications post-traductionnelles générant plusieurs produits (dont un de 26 kDa) et dont les tailles varient selon les souches *M. hyopneumoniae* (Djordjevic *et al.*, 2004). Par ailleurs, le mécanisme du clivage de la P97 reste inconnu. Les informations obtenues dans cette étude, bien que partielles, permettent de suspecter un mécanisme d'autoclivage, car nous pensons qu'il est peu probable que la protéase responsable du clivage de cette protéine soit conservée aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Cette hypothèse peut être supportée par le fait que l'autoclivage a été décrit chez d'autres adhésines bactériennes et il serait indispensable pour leur sécrétion, pour

leur localisation à la surface membranaire ou encore pour le contrôle de l'adhérence (Charbonneau *et al.*, 2006).

Le deuxième volet de notre étude consistait à examiner la capacité du vecteur rAdP97c à stimuler une réponse immunitaire contre la P97c chez la souris. Ainsi, nos résultats ont clairement démontré que l'immunisation des souris BALB/c avec le vecteur rAdP97c, que ce soit par voie intramusculaire ou par voie intranasale, induit une forte réponse immunitaire contre la P97c tant au niveau systémique que des muqueuses respiratoires. Toutefois, la meilleure réponse au niveau des muqueuses respiratoires, caractérisée par la production d'IgA anti-P97c, n'a été obtenue que suite à l'inoculation du virus par voie intranasale (**Tableau 5**). Cette dernière a donc été choisie pour la vacciner les porcs avec le vecteur rAdP97c. Et, cela d'autant plus que notre approche vaccinale a été développée dans le but de stimuler préférentiellement une immunité mucoale qui est jugée importante contre les agents pathogènes des muqueuses, comme *M. hyopneumoniae* (Neutra et Kozlowski, 2006).

Par notre approche, nous voulions stimuler une réponse immunitaire de type Th1 ou à médiation cellulaire et de type Th2 ou humorale. D'autres auteurs ont postulé que la réponse de type Th1 est cruciale dans la protection contre *M. hyopneumoniae* (Messier *et al.*, 1990; Thacker *et al.*, 2000 ; Shimoji *et al.*, 2003). Suite à la vaccination de souris avec rAdP97c, une réponse en anticorps anti-P97c dominée par les IgG2a et IgG1 a été induite tant au niveau systémique que des muqueuses respiratoires (**figure 15**). Il est décrit que chez la souris la présence d'IgG1 indique l'activation des lymphocytes Th2 CD4+ lesquels stimulent la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes. Tandis que la production d'IgG2a résulte de l'activation des lymphocytes Th1 CD4+ lesquels activent les cellules T CD8+ et soutiennent la réponse CTL (Stevens *et al.*, 1988). De ce fait, nos résultats démontrent que le vaccin rAdP97c est capable de susciter à la fois une réponse de type Th1 et Th2 contre la P97c, confirmant ainsi la capacité décrite pour les vecteurs AdV à stimuler à la fois une réponse immunitaire de type Th1 (à médiation cellulaire) et de type Th2 (humorale) (Tatsis et Ertl, 2004).

Dans cette étude, il a été intéressant d'apercevoir que les sérums et les LBAs provenant des souris immunisées avec rAdP97c inhibaient de manière significative la croissance de *M. hyopneumoniae in vitro* (**figure 16**). Mentionnons que l'inhibition de croissance de *M. hyopneumoniae* n'est pas un attribut unique aux anticorps dirigés contre l'adhésine P97 car il a été décrit que les anticorps contre les antigènes du mycoplasme qui ne sont pas les adhésines, tel que la P42, inhibent également la croissance du microorganisme *in vitro* (Chen *et al.*, 2003 ; Yang *et al.*, 2005). Le mécanisme par lequel les anticorps inhibent la croissance des mycoplasmes implique le système du complément qui, en interagissant avec les anticorps spécifiques et l'antigène exprimé à la surface du mycoplasme, va désintégrer la membrane et provoquer la lyse cellulaire (Bredt *et al.*, 1977).

D'autres approches vaccinales utilisant la P97 comme antigène ont été développées au cours de ces dernières années. Par exemple, des vaccins à base de souches atténuées d'*Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 ou de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium exprimant la région RR1 de la P97 ont été décrits (Shimoji *et al.*, 2003, Chen *et al.*, 2003). Un autre système a été développé en fusionnant la région RR1 à la sous-unité B de l'entérotoxine labile à la chaleur d'*E coli* (Conceição *et al.*, 2006). D'après les essais d'immunisation réalisés chez les souris, ces systèmes vaccinaux induisent une réponse immunitaire à médiation cellulaire mais pas humorale contre le transgène, rapportent les auteurs. En comparant avec ces approches vaccinales, le vecteur rAdP97c stimule une réponse humorale et à médiation cellulaire contre le transgène. Par conséquent, il semble avoir un avantage en termes d'induction d'une réponse immunitaire contre l'antigène vaccinal par rapport à ces systèmes concurrents. Il convient cependant de noter que, contrairement à ces systèmes, la portion antigénique de la P97 qui a été utilisée dans notre étude ne contient pas uniquement la région RR1 mais les deux régions (RR1 et RR2) de la protéine. La différence de réponse immunitaire entre ces systèmes vaccinaux et le nôtre pourrait aussi s'expliquer par la nature de l'antigène utilisé.

Nos résultats d'immunobuvardage de type Western blot avec les sérums de souris immunisées avec le vecteur rAdP97c ont permis d'identifier un problème dans la nature immunogénique de la région RR1. Nous avons observé que ces sérums réagissaient avec le fragment de 26 kDa correspondant à la région RR2 mais pas avec le fragment de 35 kDa qui contient la région RR1, si l'on tient compte du clivage de la P97c (**figure 14**). Nos résultats associés à ceux des études citées ci-haut suggèrent que la région RR1 est peu immunogène ou qu'elle ne contient pas d'épitopes reconnus par les lymphocytes B, d'où l'absence d'une réponse humorale dirigée contre elle. Ces épitopes seraient localisés dans la région RR2. La co-existence de deux régions antigéniques contenant des épitopes distincts a été décrite pour l'adhésine P1 de *M. pneumoniae* (Jacobs *et al.*, 1990). Ces auteurs ont démontré que cette adhésine contient deux régions adjacentes séparées par une courte séquence de 3 acides aminés (TNT) : celle en N-terminale contient les épitopes reconnus par les lymphocytes T, tandis que celle en C-terminale renferme les épitopes reconnus par les lymphocytes B. Il est intéressant de s'apercevoir que les régions RR1 et RR2 de l'adhésine P97 sont aussi séparées par la séquence TNT (Djordjevic *et al.*, 2004).

Le troisième volet de notre projet consistait à évaluer le potentiel de rAdP97c à conférer une protection contre *M. hyopneumoniae*. L'efficacité de notre approche vaccinale a été évaluée contre l'infection épreuve avec la souche 232 du microorganisme. Cette dernière a été d'ailleurs utilisée pour infecter les porcs dans plusieurs études (Thacker *et al.*, 1999; Thanawongnuwech *et al.*, 2004; Reynolds *et al.*, 2008). Mentionnons que le recours à une infection épreuve hétérologue a été choisi pour des considérations pratiques étant donné, d'une part, la difficulté de reproduire *in vitro* de la souche homologue 25934 vis-à-vis de la P97c, et du fait, d'autre part, de l'exposition des animaux vaccinés en conditions de terrain à des infections naturelles hétérologues. Toutefois, avant d'utiliser la souche 232 pour les infections épreuves de cette étude, il a été jugé nécessaire de vérifier son pouvoir pathogène de cette souche. À titre de comparaison, nous avons inclus la souche commerciale ATCC 25095. Nos résultats ont effectivement confirmé que la souche 232 est virulente et induit des lésions pulmonaires

typiques de l'infection à *M. hyopneumoniae*. En revanche la souche ATCC 25095 s'est montrée avirulente; aucune lésion n'a été observée au niveau des poumons de porcs qu'elle a infectés. Il n'existe d'ailleurs pas dans la littérature des études décrivant l'utilisation de la souche ATCC 25095 lors des infections expérimentales de porcs. Nous avons vérifié par PCR que ces deux souches possèdent la séquence du gène de la P97 (données non présentées). Par contre, l'analyse des séquences protéiques (**figure 17**) a révélé une différence majeure dans le nombre d'unités répétées AAKPV(E) de la région RR1: 15 pour la souche 232 contre seulement 10 chez la souche ATCC 25095. Ceci pourrait expliquer la différence du pouvoir pathogène entre ces souches (Meyns *et al.*, 2007). Toutefois, il est rapporté qu'au moins 7 unités répétées de la région RR1 sont requises pour qu'une souche de *M. hyopneumoniae* soit considérée comme potentiellement virulente (Hsu et Minion, 1998^a, Minion *et al.*, 2000). Alors, la différence de virulence entre les deux souches de l'agent pathogène pourrait aussi impliquer d'autres facteurs protéiques qui restent à déterminer.

La capacité des vecteurs AdVs recombinants à induire une réponse immunitaire protectrice contre les maladies importantes en médecine vétérinaire a été rapportée dans plusieurs études (voir références dans le tableau 4). Toutefois, la presque totalité de ces études concernent les agents pathogènes viraux. À notre connaissance, cette étude est la première qui décrit l'évaluation d'une telle approche vaccinale contre une maladie d'origine bactérienne en particulier chez le porc. Cette étude a été réalisée selon deux axes : dans un premier temps, nous avons évalué sa capacité à stimuler une réponse immunitaire contre la P97c. Le second axe a porté sur les aspects cliniques, histopathologiques et bactériologiques suite à la vaccination et à l'infection épreuve avec la souche 232 de *M. hyopneumoniae*. Suite à la vaccination des porcs avec rAdP97c, celui-ci a clairement montré une capacité à stimuler une réponse immunitaire humorale complète contre la P97c caractérisée par la présence d'IgA, d'IgG1 et d'IgG2a dans les sérums, les salives et les LBAs. Au niveau des muqueuses respiratoires comme au niveau systémique, la réponse dominante a été de type Th1 (plus d'IgG2a que d'IgG1) (**figures 25 et 28**). Nos résultats corroborent une étude qui a aussi démontré que l'administration

par voie mucoale d'un vecteur AdV recombinant non répliatif chez le porc suscite la production des IgA ainsi que des IgG1 et des IgG2a au niveau systémique et des muqueuses respiratoires contre le transgène (Guo *et al.*, 2008) et le postulat selon lequel les vecteurs AdV induisent préférentiellement une réponse de type Th1 (Tatsis et Ertl, 2004). D'autre part, le vecteur rAdP97c induit également une réponse à médiation cellulaire contre la P97c à partir de J14 post-vaccination, qui a été mise en évidence, dans cette étude, par des tests de stimulation PBMCs *in vitro*. Ces tests ont en effet montré que ces cellules proliféraient en réponse à leur stimulation par la P97c (**figure 29A**), suggérant que ce vecteur induit une réponse immunitaire dirigée contre la P97c qu'il a pu exprimer *in vivo*.

Il a été démontré que les bactérines induisent une réponse humorale et à médiation cellulaire (Thacker *et al.*, 1998; 2000^a). Ainsi, tel qu'attendu, nos expériences ont montré que le vaccin Suvaxyn® MH-one stimule les deux types de réponse immunitaire, humorale et à médiation cellulaire, qui ont été mises en évidence par la présence d'IgG dans les sérums et une réponse proliférative *in vitro* des PBMCs contre les antigènes totaux de *M. hyopneumoniae* (**Tableau 10** et **figure 29B**). Un résultat surprenant est que ces réponses n'ont pas été significativement détectées lorsque la P97c a été utilisée comme antigène dans les tests ELISA ou de TTLs. Inversement, elles n'ont pas été révélées chez les animaux vaccinés avec le vecteur rAdP97c lorsque les antigènes totaux du mycoplasme ont été utilisés dans ces tests. Cette contradiction apparente pourrait s'expliquer par deux faits. D'une part, les adhésines ne représentent pas des composants majeurs des membranes des mycoplasmes (Razin *et al.*, 1998). Il est donc possible que la P97 ne soit pas présente en quantité suffisante dans le vaccin Suvaxyn® MH-one et dans le kit commercial «HerdChek *Mycoplasma hyopneumoniae* ». D'autre part, certains auteurs suggèrent que la P97 n'est pas exprimée de façon constitutive *in vitro* et elle ne serait exprimée que durant l'infection (Assunção *et al.*, 2005 ; Chen *et al.*, 2008). Ceci expliquerait pourquoi nous avons observé une augmentation significative de la réponse humorale chez les animaux vaccinés aussi bien avec le vecteur rAdP97c qu'avec Suvaxyn® MH-one après l'infection épreuve.

Chez les animaux vaccinés avec le vecteur rAdP97c comme chez ceux vaccinés avec Suvaxyn® MH-one, nous avons constaté une baisse de la réponse humorale à partir de la deuxième semaine post-infection épreuve, soit à J42 post-vaccination. Okada *et al.*, (2000) ont également observé une réduction de la réponse humorale suite à l'infection à *M. hyopneumoniae*. Dans le cas présent, puisque les deux types de vaccins réduisent de manière significative le titre de *M. hyopneumoniae* dans les LBAs et les poumons, il est possible que cette baisse soit due au fait qu'une partie des anticorps induits par chacun des vaccins ait été impliquée dans la formation des complexes immuns afin d'éliminer l'agent pathogène. Par ailleurs, cela pourrait aussi être l'une des raisons de la diminution progressive du niveau des IgG2a chez les animaux vaccinés, car ces anticorps sont les plus impliqués dans la formation des complexes immuns en raison de leur forte affinité pour les récepteurs Fc (Hulett *et al.*, 1993). Suite à l'infection épreuve, nous avons aussi noté une baisse de la réponse proliférative des PMBCs contre la P97c dans le groupe rAdP97c/infecté ou contre les antigènes totaux de *M. hyopneumoniae* dans le groupe Suvaxyn® MH-one/infecté. Cette baisse pourrait expliquer la diminution de la réponse en anticorps observée à J56 post-vaccination. Le déclin de la réponse proliférative des PMBCs a été clairement illustré dans tous les groupes infectés (y compris dans le groupe non vacciné/infecté) lorsque ces cellules étaient stimulées avec le mitogène ConA. Ces données indiquent que l'infection par souche 232 de *M. hyopneumoniae* inhibe la réponse à médiation cellulaire et corroborent d'autres travaux (Kishima et Ross, 1985; Messier et Ross; 1991). Toutefois, les mécanismes par lesquels cet agent pathogène inhibe la réponse de type Th1 ne sont pas définis.

Dans cette étude, l'isolement des PBMCs et les TTLs ont été réalisés de la même manière à différents temps. La même quantité de PBMCs (2×10^5 cellules) était introduite dans les puits. Alors, d'une part, cette baisse de la réponse lymphoblastique pourrait s'expliquer par la migration des lymphocytes T mémoires circulants vers le tractus respiratoire en réponse à l'inflammation locale causée par l'infection (Fagan *et al.*, 2001 ; Santosuosso *et al.*, 2006). Cela réduirait le nombre des cellules T réactives contre la P97c ou contre les antigènes totaux du mycoplasme dans le sang et, en conséquence, la réponse

proliférative des PBMCs. Un autre mécanisme proposé dans la littérature pour expliquer la baisse de la réponse lymphoblastique suite à une infection est la polarisation de la réponse immunitaire vers le type Th2. Nous avons en effet observé que *M. hyopneumoniae* induit une réponse de type Th2 et une polarisation vers cette réponse chez les animaux vaccinés après l'infection épreuve. La polarisation de la réponse immunitaire vers le type Th2 a été également décrite chez d'autres mycoplasmes incluant *M. pneumoniae*, *M. pulmonis* et *M. bovis* (Koh *et al.*, 2001; Vanden et Rosenbusch, 2003), et il est suggéré que cette polarisation serait une stratégie pour ces agents pathogènes d'échapper à la surveillance immunitaire de l'hôte afin d'établir une infection chronique (Vanden et Rosenbusch, 2003).

L'examen des poumons à la nécropsie a clairement montré que la vaccination de porcs avec rAd97c résulte en la réduction significative des lésions macroscopiques causées par la souche 232 de *M. hyopneumoniae* (**figure 19**) En effet, il a été noté en moyenne trois fois moins de surface pulmonaire présentant des lésions pathognomoniques de la PEP chez les porcs vaccinés avec rAdP97c qui ont présenté en moyenne $16 \pm 4,535\%$ de lésions macroscopiques contre $47,2 \pm 13,863\%$ chez les animaux non vaccinés mais infectés. Quant aux animaux vaccinés avec le Suvaxyn® MH-one, ils ne présentaient en moyenne que $1,44 \pm 1,72\%$ de lésions macroscopiques. L'examen des lésions microscopiques (**figure 20**) confirmait que les animaux du groupe Suvaxyn® MH-one/infecté présentaient beaucoup moins de lésions microscopiques que ceux des deux autres groupes infectés. Ce qui confirme la valeur protectrice de ce type de vaccin contre une infection à *M. hyopneumoniae*, telle qu'observée dans une autre étude (Thacker *et al.*, 1998). Il a été tout de même intéressant d'apercevoir que la sévérité des lésions microscopiques était moins prononcée chez les animaux vaccinés avec rAdP97c comparée aux animaux non vaccinés mais infectés.

Il est décrit que l'infection à *M. hyopneumoniae* induit la production de cytokines pro-inflammatoires telles que d'IL-1 β , d'IL-6, d'IL-8 et de TNF- α et celles-ci seraient responsables du développement de lésions pulmonaires en favorisant l'accumulation des

cellules inflammatoires dans les BALT (Sarradell *et al.*, 2003 ; Lorenzo *et al.*, 2006). Il a été en effet noté une forte production de ces cytokines dans les LBAs des animaux infectés par *M. hyopneumoniae* (**figure 22**). L'une des principales fonctions de l'IL-1 β est d'augmenter la réponse immunitaire en activant les lymphocytes T CD4+ et en favorisant ainsi leur accumulation dans les tissus infectés (Murtaugh et Foss, 2002). L'IL-6 joue un rôle dans l'élaboration de la réponse inflammatoire aiguë et dans la prolifération des lymphocytes. En effet, de fortes concentrations de ces deux cytokines, corrélant avec la proportion de lymphocytes, ont été trouvées dans les LBAs des animaux vaccinés avec le rAdP97c. Par ailleurs, ces deux cytokines ont été beaucoup moins produites dans le groupe Suvaxyn® MH-one comparativement aux deux autres groupes infectés. Ceci suggère qu'elles sont impliquées dans la pathogenèse de *M. hyopneumoniae*. Quant au TNF- α , il est principalement produit par les macrophages activés. À forte concentration, il augmente l'activité microbicide et phagocytaire des macrophages (Marshall *et al.*, 1995). Il a été rapporté que sa forte production corrèle positivement avec la diminution du nombre de macrophages dans les LBAs (Meyns *et al.*, 2007) et que la baisse de sa sécrétion est associée à la protection contre la *M. hyopneumoniae* (Okada *et al.*, 2000). Comme l'IL-8, le TNF- α est aussi un chemoattractant des neutrophiles (Smart et Casale, 1994). Nos résultats sont en accord avec ces études car nous avons en effet observé une augmentation du niveau de TNF- α et de l'IL-8 dans tous les groupes infectés, proportionnellement au nombre de macrophages et de neutrophiles dans les LBAs.

Enfin, l'efficacité du vaccin rAdP97c a été évaluée pour sa capacité à prévenir le retard de croissance causé par *M. hyopneumoniae*, ceci est le principal signe clinique qui intéresse les éleveurs et qui est considéré comme l'une des principales causes des pertes économiques considérables engendrées dans les élevages infectés par l'agent pathogène. En effet, ce retard de croissance contraint les éleveurs à augmenter l'âge des porcs à l'abattage de plusieurs jours et, par conséquent, des coûts additionnels de production à l'engraissement pouvant dépasser des dizaines de dollars par animal (Thacker *et al.*, 2006). Il a été intéressant de noter que le GMQ (gain moyen de poids quotidien) des porcs vaccinés avec rAdP97c était plus élevé (0,672 kg/jour) que celui des

animaux non vaccinés mais infectés (0,586 kg/jour)(Tableau 9). Toutefois, cette différence n'était pas significative, sans doute en raison des écarts-types observés. Alors, ces résultats indiquent que le vaccin rAdP97c tend à prévenir le retard de croissance causé par *M. hyopneumoniae*.

En conclusion, les résultats de cette étude ont démontré que le vaccin rAdP97c suscite des réponses immunitaires spécifiques au niveau des muqueuses respiratoires, humorale (IgG et IgA) et à médiation cellulaire lesquelles sont souhaitées pour la protection contre l'infection à *M. hyopneumoniae*. De plus, ces résultats ont aussi démontré que ce vaccin protège les porcs vaccinés contre l'infection par l'agent pathogène en prévenant le retard de croissance et la réponse inflammatoire et en réduisant de façon significative les lésions pathognomoniques de la PEP. Par ailleurs, il a été aussi clair, dans cette étude, que le vaccin rAdP97c est moins efficace que le vaccin commercial Suvaxyn® MH-one.

L'une des raisons qui peuvent être évoquées pour expliquer la différence d'efficacité entre les deux vaccins est le nombre d'antigènes dans chacune des compositions vaccinales. Rappelons que le vaccin Suvaxyn® MH-one, comme toutes les autres bactérines, contient plusieurs antigènes. Par conséquent, il suscite une réponse immunitaire large dirigée contre tous les antigènes immunodominants de *M. hyopneumoniae* qui le composent. Au vu des résultats de cette étude, il est possible qu'un seul antigène dans une formulation, même si celui-ci est une adhésine, ne soit pas suffisant pour conférer une protection contre l'agent pathogène à la hauteur de celle provoquée par les bactérines. D'autres études ont d'ailleurs démontré que la vaccination des porcs avec la P97 recombinante ou avec sa région RR1, qui médie l'adhérence de *M. hyopneumoniae* aux cils épithéliaux, vectorisée par une souche atténuée d'*E. rhusiopathiae* YS-19 ne résulte pas en la réduction importante des lésions pulmonaires (King *et al.*, 1997; Shimoji *et al.*, 2003). De plus, il a été démontré que les anticorps dirigés contre la P97, plus particulièrement contre sa région RR1, n'inhibent pas de façon complète l'adhérence de *M. hyopneumoniae* aux cellules cibles (Zhang *et al.*, 1995). Cela

suggère que d'autres protéines sont aussi impliquées dans ce processus d'adhérence. En effet, une protéine du mycoplasme nommée P159 a été aussi identifiée comme une adhésine (Burnett *et al.*, 2006) et pourrait jouer un rôle, comme d'autres adhésines non encore décrites dans le développement d'une immunité durable et efficace contre *M. hyopneumoniae*.

L'analyse des séquences (**figure 17**) des régions RR1 et RR2 de la P97 a révélé une forte homologie (95,3%) entre la souche 25934 de *M. hyopneumoniae*, à partir de laquelle la P97c a été isolée, et la souche hétérologue 232 utilisée lors des infections épreuves. Le faible polymorphisme antigénique constaté pourrait être à l'origine d'un défaut d'immunité contre l'épreuve hétérologue et, par conséquent, expliquer la protection partielle induite par le vaccin rAdP97c. En effet, Schneider *et al.* (2001) ont expliqué l'absence de protection chez des chimpanzés vaccinés par l'antigène TRAP de *Plasmodium falciparum* (*Thrombospondin Related Adhesive Protein*) et exposé à une infection épreuve hétérologue, par la présence d'une différence en résidus aminés entre le variant vaccinal et celui de la souche hétérologue utilisée dans les infections épreuves. Cependant, même en présence d'antigènes présentant une diversité antigénique importante, il y a persistance d'une immunité croisée responsable de la présence d'une protection partielle telle que notée dans notre étude.

- CONCLUSION GENERALE et PERSPECTIVES -

Mycoplasma hyopneumoniae est l'agent causal de la pneumonie enzootique porcine. Il s'agit d'une maladie respiratoire chronique qui est prédominante dans les élevages porcins à travers le monde et qui, lorsqu'elle est associée à d'autres maladies comme celles causées par VSRRP, le CVP-2 ou l'APP, est responsable de pertes économiques considérables dans l'industrie porcine. À ce jour, il n'existe aucune alternative aux vaccins de type bactérine contre *M. hyopneumoniae*. Ce projet de doctorat avait donc pour objectif d'évaluer le potentiel vaccinal de l'adhésine P97 de *Mycoplasma hyopneumoniae* vectorisée par un adénovirus recombinant non réplicatif comme une alternative à ces vaccins existants.

Comme nous l'avons démontré au cours de nos travaux avec le vaccin Suvaxyn® MH-one, les bactérines protègent contre l'infection à *M. hyopneumoniae*. Toutefois, ces vaccins présentent plusieurs limitations incluant le fait que leur production est difficile et qu'ils soient adjuvantés, ce qui justifie leur prix de vente relativement élevé. De surcroît, ils ne permettent pas de différencier des animaux vaccinés de ceux qui sont naturellement infectés par l'agent pathogène. Ceci en raison du fait qu'elles contiennent tous les antigènes de l'agent pathogène. De plus, une étude rapporte que ces vaccins peuvent favoriser d'autres infections chez le porc notamment celle due au CVP-2 (Opriessnig *et al.*, 2006).

Au cours de nos travaux de recherche, nous avons pu générer un système vaccinal, désigné rAdP97c, qui contient les régions RR1 et RR2 lesquelles sont impliquées dans le processus d'adhérence de *M. hyopneumoniae* aux cellules épithéliales respiratoires de porc. Nos essais d'immunisation de souris et de porcs avec le vaccin rAdP97c ont clairement démontré que ce dernier stimule une réponse immunitaire complète contre la P97c, à la fois de type Th1 et de type Th2, aussi bien au niveau des muqueuses respiratoires qu'au niveau systémique.

Suite à la vaccination des porcs, il a été possible de constater que le rAdP97c agit contre *M. hyopneumoniae* en réduisant les lésions pulmonaires ainsi que la réponse

inflammatoire pathologique résultant de l'infection par l'agent pathogène. De manière intéressante, une amélioration du gain moyen de poids quotidien (GMQ) a également pu être observée chez les animaux vaccinés avec le rAdP97c. Toutefois, sur tous ces aspects, le rAdP97c s'est montré inférieur face à la bactérine qui a été utilisée dans cette étude (Suvaxyn ® MH-one). Néanmoins, en regard des résultats de ce premier essai, il est possible de croire que le rAdP97c pourrait être plus efficace s'il est amélioré ou renforcé.

En définitive, notre travail souligne l'importance d'un vaccin multi- antigénique dans la protection contre *M. hyopneumoniae*. Ainsi, l'efficacité du vaccin rAdP97c pourrait être grandement renforcée en y ajoutant d'autres antigènes du mycoplasme. Au cours de nos travaux, nous avons également produit un adénovirus recombinant non répliquatif qui exprime l'antigène P65 dont l'immunogénicité a déjà été démontrée. D'autres antigènes tels que la P159 qui est une autre adhésine du mycoplasme ainsi que la réductase ribonucléotidique (nrDF) pourraient aussi être considérés.

Les travaux effectués au cours de cette thèse de doctorat ont permis de confirmer certains faits relatifs aux vecteurs adénovirus. En effet, ils sont faciles à produire en grandes quantités *in vitro* et ils stimulent de préférence une réponse de type Th1 contre le transgène. Nos résultats ont également permis de confirmer que l'infection à *M. hyopneumoniae* retarde la croissance des porcs qui sont sévèrement affectés et qu'elle stimule une forte réponse de cytokines pro-inflammatoires. Par ailleurs, il reste beaucoup d'aspects à découvrir sur *M. hyopneumoniae*, en particulier sur l'adhésine P97. En effet, au cours de nos travaux, nous avons suspecté que cette protéine est capable de se cliver par elle-même (autoclivage). Il serait donc logique d'essayer de comprendre l'importance de cet autoclivage dans la pathogenèse de *M. hyopneumoniae*.

Nos résultats nous ont également permis de suspecter que la région RR1 (qui initie l'adhérence de *M. hyopneumoniae* aux cellules épithéliales respiratoires) ne contient pas d'épitopes qui stimulent une forte réponse humorale. Puisque cette dernière est requise pour bloquer l'adhérence de l'agent pathogène aux cellules cibles, cela pourrait être une

des raisons de l'efficacité partielle de notre approche vaccinale ainsi que de celle d'autres vaccins basés sur la région RR1 de la P97 décrits dans la littérature. Ceci souligne la nécessité, autant que possible, d'une évaluation préliminaire des antigènes candidats sur la base d'indicateurs immunologiques afin de mieux prédire leur reconnaissance par le système immunitaire et leur implication dans l'induction de réponse immunitaire potentiellement protectrice contre l'infection à *M. hyopneumoniae*

- REMERCIEMENTS -

Mes pensées vont tout d'abord au Dr. Serge Dea pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et dirigé la première année de cette thèse. Merci pour tes qualités humaines et ton soutien. Repose en paix.

Mes sincères remerciements au Dr. Maximilien Arella pour m'avoir permis de poursuivre cette thèse, pour son implication et son soutien sans faille. Merci pour ton encadrement, tes conseils scientifiques et humains et pour ta disponibilité.

Les mots me manquent pour remercier le Dr. Carl A. Gagnon, mon codirecteur de thèse, qui m'a permis de poursuivre mes travaux de doctorat dans son laboratoire et qui m'a donné les moyens de les mener à terme. Je te remercie pour ta pertinence scientifique et tes qualités humaines.

Mes remerciements vont aussi aux membres de mon comité d'encadrement, Dr. Veronika von Messling, Dr. Peter Tijssen et Dr. Angela Pearson, pour toute l'aide scientifique et les encouragements qu'ils m'ont apportés.

Je voudrais également remercier le Dr. Veronika von Messling, le Dr. Guy Lemay et le Dr. Serge Messier d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Nadzad Music et J. J. Jia, merci de votre aide durant les expériences d'infections expérimentales

Enfin, je remercie le Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) et l'Institut Armand-Frappier pour le support financier grâce auquel ce projet a pu être réalisé.

- BIBLIOGRAPHIE -

Adams, C., J. Pitzer, and F. C. Minion. 2005. *In vivo* expression analysis of the P97 and P102 paralog families of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infect Immun* 73:7784-7787.

Adkins, J. C., and A. J. Wagstaff. 1998. Recombinant hepatitis B vaccine: a review of its immunogenicity and protective efficacy hepatitis B. *BioDrugs* 10:137-58.

Akita, H., and H. Harashima. 2008. Advances in non-viral gene delivery: using multifunctional envelope-type nano-device. *Expert Opin Drug Deliv* 5:847-859.

Alba, R., A. Bosch, and M. Chillon. 2005. Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Ther* 12:18-27.

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

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

Asai, T., M. Okada, Y. Yokomizo, S. Sato, and Y. Mori. 1996. Suppressive effect of bronchoalveolar lavage fluid from pigs infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* on chemiluminescence of porcine peripheral neutrophils. *Vet Immunol Immunopathol* 51:325-331.

Assuncao, P., C. De la Fe, A. S. Ramirez, O. Gonzalez Llamazares, and J. B. Poveda. 2005. Protein and antigenic variability among *Mycoplasma hyopneumoniae* strains by SDS-PAGE and immunoblot. *Vet Res Commun* 29:563-574.

Baccaro, M. R., F. Hirose, O. Umehara, L. C. Goncalves, D. S. Doto, R. Paixao, L. T. Shinya, and A. M. Moreno. 2006. Comparative efficacy of two single-dose bacterins in

the control of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine raised under commercial conditions in Brazil. *Vet J* 172:526-531.

Balish, M. F., and D. C. Krause. 2006. Mycoplasmas: a distinct cytoskeleton for wall-less bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* 11:244-255.

Baluchamy, S., H. N. Rajabi, R. Thimmapaya, A. Navaraj, B. Thimmapaya. 2003. Repression of c-Myc and inhibition of G1 exit in cells conditionally overexpressing p300 that is not dependent on its histone acetyltransferase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9524-9529.

Baluchamy, S., N. Sankar, A. Navaraj, E. Moran, B. Thimmapaya. 2007. Relationship between E1A binding to cellular proteins, c-myc activation and S-phase induction. *Oncogene* 26:781-787.

Barcia, C., M. Jimenez-Dalmaroni, K. M. Kroeger, M. Puntel, A. J. Rapaport, D. Larocque, et al. 2007. Sustained, one year expression from high-capacity helper-dependent adenoviral vectors delivered to the brain of animals with a pre-existing systemic anti-adenoviral immune response: implications for clinical trials. *Mol Ther* 15:2154-2163.

Barker, D. D., and A. J. Berk. 1987. Adenovirus proteins from both E1b reading frames are required for transformation of rodent cells by viral infection and DNA transfection. *Virology* 156:107-121.

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

Bébéar, C., and C. M. Bébéar. 2007. Infections humaines a mycoplasmes. *Revue Francophone des Laboratoires* 391:63-69.

Beekhuizen, H., and J. S. van de Gevel. 2007. Gamma interferon confers resistance to infection with *Staphylococcus aureus* in human vascular endothelial cells by cooperative proinflammatory and enhanced intrinsic antibacterial activities. *Infect Immun* 75:5615-5626.

Beilage, E., and A. Schreiber. 2002. Transmission of maternal antibodies against *M. hyopneumoniae* onto piglets of vaccinated Sows and their reaction on the vaccination with HYORESP® in the first and fourth or four and eight week respectively. *Proceeding of the 17th IPVS Congress* 36.

Benihoud, K., P. Yeh, and M. Perricaudet. 1999. Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol* 10:440-447.

Berns, K. I. 1990. Parvovirus replication. *Microbiol Rev* 54:316-329.

Betz, M., and B. S. Fox. 1991. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J Immunol* 146:108-113.

Bilbao, G., M. Feng, C. Rancourt, W. H. Jackson, Jr., and D. T. Curiel. 1997. Adenoviral/retroviral vector chimeras: a novel strategy to achieve high-efficiency stable transduction in vivo. *FASEB J* 11:624-634.

Bossé J. T, H. Janson, B. J. Sheehan, A. J. Beddek, A. N. Rycroft, J. S. Kroll, and P. R. Langford. 2002. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes Infect* 4:225-235.

Bousquet, E., P. Pommier, S. Wessel-Robert, H. Morvan, H. Benoit-Valiergue, and A. Laval. 1998. Efficacy of doxycycline in feed for the control of pneumonia caused by

Pasteurella multocida and *Mycoplasma hyopneumoniae* in fatterling pigs. *Vet. Rec* **143**:269-272.

Boyer, O., et D. Klatzmann. 1999. Thérapie génique anticancéreuse par gènes suicides: du gène à l'essai thérapeutique. *Médecine/sciences* **15** : 625-634.

Bredt, W., B. Wellek, H. Brunner, and M. Loos. 1977. Interactions between *Mycoplasma pneumoniae* and the first components of complement. *Infect Immun* **15**:7-12.

Burnett, T. A., K. Dinkla, M. Rohde, G. S. Chhatwal, C. Uphoff, M. Srivastava, S. J. Cordwell, S. Geary, X. Liao, F. C. Minion, M. J. Walker, and S. P. Djordjevic. 2006. P159 is a proteolytically processed, surface adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae*: defined domains of P159 bind heparin and promote adherence to eukaryote cells. *Mol Microbiol* **60**:669-686.

Calsamiglia, 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 Invest* **11**:246-251.

Calsamiglia, M., J. E. Collins, and C. Pijoan. 2000. Correlation between the presence of enzootic pneumonia lesions and detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchial swabs by PCR. *Vet Microbiol* **76**:299-303.

Calus, D., M. Baele, T. Meyns, A. de Kruif, P. Butaye, A. Decostere, F. Haesebrouck, and D. Maes. 2007. Protein variability among *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. *Vet Microbiol* **120**:284-291.

Carter, P. J., and R. J. Samulski. 2000. Adeno-associated viral vectors as gene delivery vehicles. *Int J Mol Med* **6**:17-27.

Caswell, J. L., and M, Archambault. 2008. *Mycoplasma bovis* pneumonia. *Animal Health Research Reviews* 8:161-186.

Chambaud, I., R. Heilig, S. Ferris, V. Barbe, D. Samson, F. Galisson, I. Moszer, K. Dybvig, H. Wroblewski, et al. 2001. The complete genome sequence of the murine respiratory pathogen *Mycoplasma pulmonis*. *Nucleic Acids Res* 29:2145-2153.

Saveanu, L., P. van Endert. 2005. Dendritic cells : open for presentation business. *Nat Immunol* 6 : 7-8.

Lizee, G., G. Basha, J. Tiong, et al. 2003. Control of dendritic cell cross-presentation by the major histocompatibility complex class I cytoplasmic domain. *Nat Immunol* 4 : 1065-73.

Charbonneau, M. E., F. Berthiaume, and M. Mourez. 2006. Proteolytic processing is not essential for multiple functions of the *Escherichia coli* autotransporter adhesin involved in diffuse adherence (AIDA-I). *J Bacteriol* 188:8504-8512.

Charerntantanakul, W., and J. A. Roth. 2006. Biology of porcine T lymphocytes. *Anim Health Res Rev* 7:81-96.

Cheikh Saad Bouh, K. 2004. Immunobiologie des protéines recombinants P46, P65 et P97 de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Thèse de doctorat Numéro 288, *Université du Québec, INRS-Institut Armand-Frappier*, page:69-91.

Cheikh Saad Bouh, K., F. Shareck, and 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. *Clin Diagn Lab Immunol* 10:459-468.

Chen, A. Y., S. R. Fry, G. E. Daggard, and T. K. Mukkur. 2008. Evaluation of immune response to recombinant potential protective antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* delivered as cocktail DNA and/or recombinant protein vaccines in mice. *Vaccine* **26**:4372-4378.

Chen, A. Y., S. R. Fry, J. Forbes-Faulkner, G. Daggard, and T. K. Mukkur. 2006. Evaluation of the immunogenicity of the P97R1 adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae* as a mucosal vaccine in mice. *J Med Microbiol* **55**:923-929.

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

Chen, S. H., H. D. Shine, J. C. Goodman, R. G. Grossman, and S. L. Woo. 1994. Gene therapy for brain tumors: regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:3054-3057.

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

Clark, L. K., A. B. Scheidt, V. B., Mayrose et al. 1989. Methodology to reduce days market in swine herds with enzootic pneumonia. *Proc Iowa Vet Med Assoc* **107**: 24-27.

Clarke, S. R., and S. J. Foster. 2006. Surface adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Adv Microb Physiol* **51**:187-224.

Conceicao, F. R., A. N. Moreira, and O. A. Dellagostin. 2006. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. *Vaccine* **24**:5734-5743.

Cooper, A. M., D. K. Dalton, T. A. Stewart, J. P. Griffin, D. G. Russell, and I. M. Orme. 1993. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med* **178**:2243-2247.

Crawley, A., and B. N. Wilkie. 2003. Porcine Ig isotypes: function and molecular characteristics. *Vaccine* **21**:2911-2922.

Crystal, R. G., A. Jaffe, S. Brody, A. Mastrangeli, N. G. McElvaney, M. Rosenfeld, C. S. Chu, C. Danel, J. Hay, and T. Eissa. 1995. A phase 1 study, in cystic fibrosis patients, of the safety, toxicity, and biological efficacy of a single administration of a replication deficient, recombinant adenovirus carrying the cDNA of the normal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in the lung. *Hum Gene Ther* **6**:643-666.

Davison, A. J., M. Benko, and B. Harrach. 2003. Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol* **84**:2895-908.

de Castro, L. A., T. Rodrigues Pedroso, S. S. Kuchiishi, M. Ramenzoni, J. D. Kich, A. Zaha, M. Henning Vainstein, and H. Bunselmeyer Ferreira. 2006. Variable number of tandem aminoacid repeats in adhesion-related CDS products in *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. *Vet Microbiol* **116**:258-269.

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

Demeure, C. E., L. P. Yang, C. Desjardins, P. Raynauld, and G. Delespesse. 1997. Prostaglandin E2 primes naive T cells for the production of anti-inflammatory cytokines. *Eur J Immunol* **27**:3526-3531.

Djordjevic, S. P., G. J. Eamens, L. F. Romalis, P. J. Nicholls, V. Taylor, and 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.

Djordjevic, S. P., S. J. Cordwell, M. A. Djordjevic, J. Wilton, and F. C. Minion. 2004. Proteolytic processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin. *Infect Immun* **72**:2791-2802.

Dobner, T, and J. Kzhyshkowska. 2001. Nuclear export of adenovirus RNA. *Curr Top Microbiol Immunol* **259**:25-54.

Donahue, R. E., S.W. Kessler, D. Bodine, K. McDonagh et al. 1992. Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer. *J Exp Med* **176**:1125-1135.

Douglas, J. T. 2007. Adenoviral vector for therapy. *Mol. Biotechnol* **36**:71-80.

Droesse, M., G. Tangen, I. Gummelt, H. Kirchhoff, L. R. Washburn, and R. Rosengarten. 1995. Major membrane proteins and lipoproteins as highly variable immunogenic surface components and strain-specific antigenic markers of *Mycoplasma arthritidis*. *Microbiology* **141**:3207-3219.

Dubendorff, J. W., and F. W. Studier. 1991. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J Mol Biol* **219**:45-59.

Dubosson, C. R., C. Conzelmann, R. Miserez, P. Boerlin, J. Frey, W. Zimmermann, H. Hani, and P. Kuhnert. 2004. Development of two real-time PCR assays for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in clinical samples. *Vet Microbiol* **102**:55-65.

Ebner, K., W. Pinsker, and T. Lion. 2005. Comparative sequence analysis of the hexon gene in the entire spectrum of human adenovirus serotypes: phylogenetic, taxonomic, and clinical implications. *J. Virol* **79**:12635-12642.

Eiz, B., T. Adrian, and P. Pring-Åkerblom. 1997. Recombinant fiber proteins of human adenoviruses Ad9, Ad15, and Ad19: localization of the haemagglutination and the type-specific determinant. *Res Virol* **148**:5-10.

Elahi, S. M., W. Oualikene, L. Naghi, M. O'Connor-McCourt, and B. Massie. 2002. Adenovirus-based libraries: efficient generation of recombinant adenoviruses by positive selection with the adenovirus protease. *Gene Ther* **18**:1238-124.

Fagan, P. K., M.J. Walker, J. Chin J, G. J. Eamens, and 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**:101-10.

Fagan, P. K., S. P. Djordjevic, G. J. Eamens, J. Chin, and 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.

Fano, E., C. Pijoan, and S. Dee. 2007. Infection dynamics of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a continuous-flow population of pigs also infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Rec* **161**:515-520.

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.

Ferber, D. 2001. Gene therapy. Safer and virus-free? *Science* **294**:1638-1642.

Ferrari, M., A. Scalvini, M. N. Losio, A. Corradi, M. Soncini, E. Bignotti, E. Milanesi, P. Ajmone-Marsan, S. Barlati, D. Bellotti, and M. Tonelli. 2003. Establishment and characterization of two new pig cell lines for use in virological diagnostic laboratories. *J Virol Methods* **107**:205-212.

Ferreira, T. B., P. M. Alves, J. G. Aunins, and M. J. Carrondo. 2005. Use of adenoviral vectors as veterinary vaccines. *Gene Ther* **12 Suppl 1**:S73-83.

Flesja, K. I., and I. Solberg. 1981. Pathological lesions in swine at slaughter. IV. Pathological lesions in relation to rearing system and herd size. *Acta Vet Scand* **22**:272-282.

Fraser, C. M., et al. 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* **270**: 397-403.

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

Freytag, L. C., et J. D. Clements. 1999. Bacterial toxins as mucosal adjuvants. *Curr. Top. Microbiol Immunol.* **236.** 25-36.

Friis, N. F. 1975. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare*: a survey. *Vet Med* **27**:337-339.

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.

Fyfe, J. A., P. M. Keller, P. A. Furman, R. L. Miller, and G. B. Elion. 1978. Thymidine kinase from herpes simplex virus phosphorylates the new antiviral compound, 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine. *J Biol Chem* **253**:8721-8727.

Ganly, I., D. Kirn, G. Eckhardt, G. I. Rodriguez, D.S. Soutar, et al. 2000. A phase I study of Onyx-015, an E1B attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer. *Clin Cancer Res* **6**:798-806.

Ganly, I., D. Kirn, G. Eckhardt, G. I. Rodriguez, D.S. Soutar, et al. 2000. A phase I study of Onyx-015, an E1B attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer. *Clin Cancer Res* **6**:798-806.

Gerlic, M., J. Horowitz, S. Farkash, and S. Horowitz. 2007. The inhibitory effect of *Mycoplasma fermentans* on tumour necrosis factor (TNF)-alpha-induced apoptosis resides in the membrane lipoproteins. *Cell Microbiol* **9**:142-153.

Germain, R. N., and I. Stefanova. 1999. The dynamics of T cell receptor signaling: complex orchestration and the key roles of tempo and cooperation. *Annu Rev Immunol* **17**:467-522.

Ginsberg, H. S., U. Lundholm-Beauchamp, R. L. Horswood, B. Pernis, W. S. Wold, R. M. Chanock, and G. A. Prince. 1989. Role of early region 3 (E3) in pathogenesis of adenovirus disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:3823-3827.

Glass, J. I., E. J. Lefkowitz, J. S. Glass, C. R. Heiner, E. Y. Chen, and G. H. Cassell. 2000. The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. *Nature* **407**:757-762.

Gogev, S., N. Vanderheijden, M. Lemaire, F. Schynts, J. D'Offay, I. Deprez, M. Adam, M. Eloit, and E. Thiry. 2002. Induction of protective immunity to bovine herpesvirus type 1 in cattle by intranasal administration of replication-defective human adenovirus type 5 expressing glycoprotein gC or gD. *Vaccine* **20**:1451-1465.

Goodwin, R. F. 1985. Apparent reinfection of enzootic-pneumonia-free pig herds: search for possible causes. *Vet Rec* **116**:690-694.

Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell, and R. Nairn. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**:59-72.

Guo, L., J. Wang, H. Zhou, H. Si, M. Wang, J. Song, B. Han, Y. Shu, L. Ren, J. Qu, and T. Hung. 2008. Intranasal administration of a recombinant adenovirus expressing the norovirus capsid protein stimulates specific humoral, mucosal, and cellular immune responses in mice. *Vaccine* **26**:460-468.

Haesebrouck, F., F. Pasmans, K. Chiers, D. Maes, R. Ducatelle, and A. Decostere. 2004. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? *Vet. Microbiol* **100**:255-268.

Hammond, J. M., and M. A. Johnson. 2005. Porcine adenovirus as a delivery system for swine vaccines and immunotherapeutics *Vet J* **169**:17-27.

Hammond, J. M., R. J. McCoy, E. S. Jansen, C. J. Morrissy, A. L. Hodgson, and M. A. Johnson. 2000. Vaccination with a single dose of a recombinant porcine adenovirus

expressing the classical swine fever virus gp55 (E2) gene protects pigs against classical swine fever. *Vaccine* **18**:1040-1050.

Harris, D. I., S. L. Edgerton, E. R. Wilson. 1990. Large thymus gland in Isowean pigs. *Proc 11th Congr Pig Vet Soc, Lausanne*, p291.

Heath, W. R., and F. R. Carbone. 2003. Immunology dangerous liaisons. *Nature* **425**:460-461.

Heath, W. R., and F. R. Carbone. 2001. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol* **2**:126-134.

Hecht, J.R., R. Bedford, J. L. Abbruzzese, S. Lahoti, T. R. Reid, R. M. Soetikno, D. H. Kirn, and S. M. Freeman. 2003. A phase I/II trial of intratumoral endoscopic ultrasound injection of ONYX-015 with intravenous gemcitabine in unresectable pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res* **9**:555-561.

Herweijer, H., and J. A. Wolff. 2003. Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene Ther* **10**:453-458.

Himmelreich, R., H. Hilbert, H. Plagens, E. Pirkl, B. C. Li, and R. Herrmann. 1996. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res* **24**:4420-4449.

Holmgren, J., and C. Czerkinsky. 2005. Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med* **11**:S45-S53.

Holst, P. J., M. R. Sorensen, C. M. Mandrup Jensen, C. Orskov, A. R. Thomsen, and J. P. Christensen. 2008. MHC class II-associated invariant chain linkage of antigen

dramatically improves cell-mediated immunity induced by adenovirus vaccines. *J Immunol* **180**:3339-3346.

Howitt, J., C. W. Anderson, and P. Freimuth. 2003. Adenovirus interaction with its cellular receptor CAR. *Top Microbiol Immunol* **272**:272-264.

Hsu, T., and F. C. Minion. 1998^a. Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. *Infect Immun* **66**:4762-4766.

Hsu, T., and F. C. Minion. 1998^b. Molecular analysis of the P97 cilium adhesin operon of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Gene* **214**:13-23.

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

Hulett, M. D., I. F. McKenzie, and P. M. Hogarth. 1993. Chimeric Fc receptors identify immunoglobulin-binding regions in human Fc gamma RII and Fc epsilon RI. *Eur J Immunol* **23**:640-645.

Hwang, M. H., J. H. Lim, H. I. Yun, J. C. Kim, B. Y. Jung, W. H. Hsu, and S. C. Park. 2006. The effect of polyclonal antibody on intracellular calcium increase induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal cells. *Vet J* **172**:556-560.

Igietseme, J. U., F. O. Eko, Q. He, and C. M. Black. 2004. Antibody regulation of Tcell immunity: implications for vaccine strategies against intracellular pathogens. *Expert Rev Vaccines* **3**:23-34.

Inamine, J. M., K. C. Ho, S. Loechel, and P. C. Hu. 1990. Evidence that UGA is read as a tryptophan codon rather than as a stop codon by *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium*, and *Mycoplasma gallisepticum*. *J Bacteriol* **172**:504-506.

Inamoto, T., H. Takahashi, K. Yamamoto, Y. Nakai, and K. Ogimoto. 1994. Antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolated from swine. *J Vet Med Sci* **56**:393-394.

Jacobs, E., A. Pilatschek, B. Gerstenecker, K. Oberle, and W. Brecht. 1990. Immunodominant epitopes of the adhesin of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol* **28**:1194-1197.

Jeffrey, A. M., J. M. Boss, and L. R. Gooding. 2003. The Adenovirus E3 Promoter Is Sensitive to Activation Signals in Human T Cells. *J Virol* **77**:1112-1119.

Jenkins, C., J. L. Wilton, F. C. Minion, L. Falconer, M. J. Walker, and S. P. Djordjevic. 2006. Two domains within the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin bind heparin. *Infect Immun* **74**:481-487.

Johnson, M. A., C. Pooley, J. Ignjatovic, and S. G. Tyack. 2003. A recombinant fowl adenovirus expressing the S1 gene of infectious bronchitis virus protects against challenge with infectious bronchitis virus. *Vaccine* **21**:2730-2736.

Jones, H. P., L. Tabor, X. Sun, M. D. Woolard, and J. W. Simecka. 2002. Depletion of CD8⁺ T cells exacerbates CD4⁺ Th cell-associated inflammatory lesions during murine mycoplasma respiratory disease. *J Immunol* **168**:3493-3501.

Kheyar A, A. Jabrane, C. Zhu, P. Cl  roux, B. Massie, S. Dea , C. A. Gagnon. 2005. Alternative codon usage of PRRS virus ORF5 gene increases eucaryotic expression of

GP(5) glycoprotein and improves immune response in challenged pigs. *Vaccine*. **23**:4016-4022.

Khuri, F. R, J. Nemunaitis, I. Ganly, J. Arseneau, I. F. Tannock, et al. 2000. A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat Med* **6**:879-85.

King, K. W., D. H. Faulds, E. L. Rosey, and 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.

Kishima, M., and R. F. Ross. 1985. Suppressive effect of nonviable *Mycoplasma hyopneumoniae* on phytohemagglutinin-induced transformation of swine lymphocytes. *Am J Vet Res* **46**:2366-2368.

Klimkait, T., and W. Doerfler. 1987. E1B functions of type C adenoviruses play a role in the complementation of blocked adenovirus type 12 DNA replication and late gene transcription in hamster cells. *Virology* **161**:109-120.

Knowles, M. K., D. Roberts, S. Craig, M. Sheen, S. A. Nadin-Davis, and A. I. Wandeler. 2009. *In vitro* and *in vivo* genetic stability studies of a human adenovirus type 5 recombinant rabies glycoprotein vaccine (ONRAB). *Vaccine* **27**:2662-2668.

Kobayashi, Y. 2006. Neutrophil infiltration and chemokines. *Crit Rev Immunol* **26**:307-316.

Kobisch, M., and C. Marois. 2008. Les mycoplasmoses porcines. *Bull Acad Vet France* **161**:179-184.

- Kobisch, M., and N. F. Friis. 1996.** Swine mycoplasmoses. *Rev Sci Tech* 15:1569-1605.
- Kochanek, S. 1999.** High-capacity adenoviral vectors for gene transfer and somatic gene therapy. *Hum Gene Ther* 10: 2451-2459.
- Koh, Y. Y., Y. Park, H. J. Lee, and C. K. Kim. 2001.** Levels of Interleukin-2, Interferon- γ , and Interleukin-4 in Bronchoalveolar Lavage Fluid From Patients With *Mycoplasma pneumoniae*: Implication of Tendency Toward Increased Immunoglobulin E Production. *Pediatrics* 107:e39.
- Kozak, M. 1987.** Effects of intercistronic length on the efficiency of reinitiation by eucaryotic ribosomes. *Mol Cell Biol* 7:3438-3445.
- Kwon, D., C. Choi, and C. Chae. 2002.** Chronologic localization of *mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs. *Vet Pathol* 39:584-587.
- Laemmli, U. K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Langermann, S., S. Palaszynski,, M. Barnhart, G. Auguste, J. S. Pinkner, J. Burlein, P. Barren, S. Koenig , S. Leath, C. H. Jones, and S. J. Hultgren. 1997.** Prevention of mucosal *Escherichia coli* infection by FimH-based systemic vaccination. *Science* 276:607-611.
- Le Carrou, J., M. Laurentie, M. Kobisch, and A. V. Gautier-Bouchardon. 2006.** Persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs after marbofloxacin treatment and detection of mutations in the parC gene. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1959-1966.

Le Grand, A., and M. Kobisch. 1996. Comparison of the use of a vaccine and sequential antibiotic treatment in a herd infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Res* 27:241-253.

L'Ecuyer, C., and P. Boulanger. 1970. Enzootic pneumonia in pigs: identification of a causative mycoplasma in infected pigs and in cultures by immunofluorescent staining. *Can J Comp Med* 34:38-46.

Levine, M. M., and M. B. Sztein. 2004. Vaccine development strategies for improving immunization: the role of modern immunology. *Nat Immunol* 5:460-464.

Lieber, A., D. S. Steinwaerder, C. A. Carlson, and A. K. Mark. 1999. Integrating Adenovirus-Adeno-Associated Virus Hybrid Vectors Devoid of All Viral Genes *J Virol* 73: 9314-9324.

Liew, F. Y. 2002. Th1 and Th2 cells. A historical perspective. *Nature Rev Immunol* 2: 55-60.

Lochmüller, H., A. Jani, J. Huard, S. Prescott, M. Simoneau, B. Massie, G. Karpati, and G. Acsadi. 1994. Emergence of early region 1-containing replication-competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus recombinants (delta E1 + delta E3) during multiple passages in 293 cells. *Hum Gene Ther* 5:1485-1491.

Lorenzo, H., O. Quesada, P. Assuncao, A. Castro, and F. Rodriguez. 2006. Cytokine expression in porcine lungs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Immunol Immunopathol* 109:199-207.

Lowin, B., M. C. Peitsch, and J. Tschopp. 1995. Perforin and granzymes: crucial effector and molecules in cytolytic T T lymphocytes and natural killer cell-mediated Cytotoxicity. *Curr Top Microbiol Immunol* 198:1-24.

Ma, L., J. S. Jensen, L. Myers, J. Burnett, M. Welch, Q. Jia, and D. H. Martin. 2007. *Mycoplasma genitalium*: an efficient strategy to generate genetic variation from a minimal genome. *Mol Microbiol* **66**:220-236.

Maes, D. G., H. Deluyker, M. Verdonck, F. Castryck, C. Miry, B. Vrijens, R. Ducatelle, and A. De Kruif. 2001. Non-infectious factors associated with macroscopic and microscopic lung lesions in slaughter pigs from farrow-to-finish herds. *Vet Rec* **148**:41-46.

Maes, D., J. Segales, T. Meyns, M. Sibila, M. Pieters, and F. Haesebrouck. 2008. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Vet Microbiol* **126**:297-309.

Maghni, K., O. M. Nicolescu, and J. G. Martin. 1999. Suitability of cell metabolic colorimetric assays for assessment of CD4+ T cell proliferation: comparison to 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) ELISA. *J Immunol Methods* **223**:185-194.

Makower, D., A. Rozenblit, H. Kaufman, M. Edelman, M. E. Lane, J. Zwiebel, H. Haynes, and S. Wadler. 2003. Phase II clinical trial of intralesional administration of the oncolytic adenovirus ONYX-015 in patients with hepatobiliary tumors with correlative p53 studies. *Clin Cancer Res* **9**:693-702.

Mare, C. J., and W. P. Switzer. 1965. New Species: *Mycoplasma hyopneumoniae*; a Causative Agent of Virus Pig Pneumonia. *Vet Med Small Anim Clin* **60**:841-846.

Marois, C., J. Le Carrou, M. Kobisch, and A. V. Gautier-Bouchardon. 2007. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. *Vet Microbiol* **120**:96-104.

- Marois, C., M. Gottschalk, H. Morvan, C. Fablet, F. Madec, and M. Kobisch. 2009.** Experimental infection of SPF pigs with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 alone or in association with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol* **135**:283-291.
- Marshall, A. J., R. J. Miles, and L. Richards. 1995.** The phagocytosis of mycoplasmas. *J Med Microbiol* **43**:239-250.
- Matsuo, E., G. Sampei, K. Mizobuchi, and K. Ito. 1999.** The plasmid F OmpP protease, a homologue of OmpT, as a potential obstacle to E. coli-based protein production. *FEBS Lett* **461**:6-8.
- Matthias, L., K. Kastenmüller, M. Neuenhahn, H. Weighardt, D. H. Busch, W. Reindl, and I. Förster. 2008.** Decreased Susceptibility of Mice to Infection with *Listeria monocytogenes* in the Absence of Interleukin-18. *Infect Immun* **76**: 3881-3890.
- Messele, T., M. T. Roos, D. Hamann, M. Koot, A. L. Fontanet, F. Miedema, P. T. Schellekens, and T. F. Rinke de Wit. 2000.** Nonradioactive techniques for measurement of in vitro T-cell proliferation: alternatives to the [(3)H]thymidine incorporation assay. *Clin Diagn Lab Immunol* **7**:687-692.
- Messier, S., and R. F. Ross. 1991.** Interactions of *Mycoplasma hyopneumoniae* membranes with porcine lymphocytes. *Am J Vet Res* **52**:1497-1502.
- Messier, S., R. F. Ross, and P. S. Paul. 1990.** Humoral and cellular immune responses of pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am J Vet Res* **51**:52-58.
- Meyns, T., D. Maes, D. Calus, S. Ribbens, J. Dewulf, K. Chiers, A. de Kruif, E. Cox, A. Decostere, and F. Haesebrouck. 2007.** Interactions of highly and low virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates with the respiratory tract of pigs. *Vet Microbiol* **120**:87-95.

Minion, F. C., C. Adams, and T. Hsu. 2000. R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. *Infect Immun* **68**:3056-3060.

Minion, F. C., E. J. Lefkowitz, M. L. Madsen, B. J. Cleary, S. M. Swartzell, and G. G. Mahairas. 2004. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. *J Bacteriol* **186**:7123-7133.

Molinier-Frenkel, V., H. Gahery-Segard, M. Mehtali, C. Le Boulaire, S. Ribault, P. Boulanger, et al. 2000. Immune Response to Recombinant Adenovirus in Humans: Capsid Components from Viral Input Are Targets for Vector-Specific Cytotoxic T Lymphocytes. *J Virol* **74**:7678-7682.

Monteil, M., M. F. Le Pottier, A. A. Ristov, R. Cariolet, R. L'Hospitalier, B. Klonjkowski, and M. Eloit. 2000. Single inoculation of replication-defective adenovirus-vectored vaccines at birth in piglets with maternal antibodies induces high level of antibodies and protection against pseudorabies. *Vaccine* **18**:1738-1742.

Morr, M., O. Takeuchi, S. Akira, M. M. Simon, and P. F. Muhlradt. 2002. Differential recognition of structural details of bacterial lipopeptides by toll-like receptors. *Eur J Immunol* **32**:3337-3347.

Mosman, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin, and R. L. Coffman. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphocyte activities and secreted proteins. *J. Immunol.* **136**:2348-2357.

Mueller, C., and T. R. Flotte. 2008. Gene therapy for cystic fibrosis. *Clin Rev Allergy Immunol* **35**:164-178.

Mullen, L. M., S. P. Nair, J. M. Ward, A. N. Rycroft, R. J. Williams, G. Robertson, N. J. Mordan, and B. Henderson. 2008. Novel adhesin from *Pasteurella multocida* that binds to the integrin-binding fibronectin FnIII9-10 repeats. *Infect Immun* **76**:1093-1104.

Muneta, Y., Y. Minagawa, Y. Shimoji, R. Nagata, P. F. Markham, G. F. Browning, and Y. Mori. 2006. IL-18 expression in pigs following infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Interferon Cytokine Res* **26**:637-644.

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

Murtaugh, M. P., and D. L. Foss. 2002. Inflammatory cytokines and antigen presenting cell activation. *Vet Immunol Immunopathol* **87**:109-121.

Muzyczka, N. 1992. Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **158**, 97-129.

Mymryk, J. S., and S. T. Bayley. 1993. Multiple pathways for gene activation in rodent cells by the smaller adenovirus 5 EA1 protein and their relevance to growth and transformation. *J Gen Virol* **74**:2131-2141.

Nathan, C. F., T. J. Prendergast, M. E. Wiebe, E. R. Stanley, E. Platzner, H. G. Remold, K. Welte, B. Y. Rubin, and H. W. Murray. 1984. Activation of human macrophages: comparison of other cytokines with interferon-gamma. *J Exp Med* **160**:600-605.

Neutra, M. R., and P. A. Kozlowski. 2006. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat. Rev. Immunol.* **6**:148-158.

Nocard, E., and E. Roux. 1990. The microbe of pleuropneumonia. *Rev Infect Dis* 12:354-358.

Okada, M., T. Asai, M. Ono, T. Sakano, and 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.

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

O'Neal, W. K., H. Zhou, N. Morral, C. Langston, R. J. Parks, F. L. Graham, S. Kochanek, and A. L. Beaudet. 2000. Toxicity associated with repeated administration of first-generation adenovirus vectors does not occur with a helper-dependent vector. *Mol. Med* 6:179-195.

Opriessnig, T., P. G. Halbur, S. Yu, E. L. Thacker, M. Fenaux, and X. J. Meng. 2006. Effects of the timing of the administration of *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin on the development of lesions associated with porcine circovirus type 2. *Vet Rec* 158:149-154.

Ossewaarde, J. M., A. de Vries, T. Bestebroer, and A. F. Angulo. 1996. Application of a *Mycoplasma* group-specific PCR for monitoring decontamination of *Mycoplasma*-infected *Chlamydia* sp. strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:328-331.

Oualikene, W., L. Lamoureux, J. M. Weber, and B. Massie. 2000. Protease-Deleted Adenovirus Vectors and Complementing Cell Lines: Potential Applications of Single-

Round Replication Mutants for Vaccination and Gene Therapy. *Hum Gene Ther* **11**:1341-1353.

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

Parronchi, P., et al. 1991. Allergen-and bacterial antigen specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:4538-4542.

Patti, J. M., and M. Hook. 1994. Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. *Curr Opin Cell Biol* **6**:752-758.

Peter, P. J., J. Borst, V. Oorschot, M. Fukada, O. Krahenbuhl, J. Tschopp, J. W. Slot, and H. J. Geuze. 1991. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med* **173**:1099-1109.

Philpott, N. J., M. Nociari, K. B. Elkon, and E. Falck-Pedersen. 2004. Adenovirus-induced maturation of dendritic cells through a PI3 kinase-mediated TNF-alpha induction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:6200-6205.

Pointon, A. M., P. Heap, and P. McCloud. 1985. Enzootic pneumonia of pigs in South Australia--factors relating to incidence of disease. *Aust Vet J* **62**:98-101.

Popham, P. L., T. W. Hahn, K. A. Krebes, and D. C. Krause. 1997. Loss of HMW1 and HMW3 in noncytadhering mutants of *Mycoplasma pneumoniae* occurs post-translationally. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:13979-13984.

Rautiainen, E., V. Tuovinen, and K. Levonen. 2000. Monitoring antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae* in sow colostrum--a tool to document freedom of infection. *Acta Vet Scand* **41**:213-225.

Razin, S., D. Yagev, and Y. Naot. 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:1094-1156.

Reynolds, S. C., L. B. St Aubin, L. G. Sabbadini, J. Kula, J. Vogelaar, P. Runnels, and A. R. Peters. 2008. Reduced lung lesions in pigs challenged 25 weeks after the administration of a single dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine at approximately 1 week of age. *Vet J* **17**:933-943.

Romagnani, S. 1997. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* **18**:263-266.

Rosatte, R. C, D. Donovan, J. C. Davies, M. Allan, P. Bachmann, B. Stevenson, K. Sobey, et al. 2009. Aerial distribution of onrab(r) baits as a tactic to control rabies in raccoons and striped skunks in ontario, Canada. *J Wildl Dis* **45**:363-374.

Rosenfeld, M. A., K. Yoshimura, B. C. Trapnell, K. Yoneyama, E. R. Rosenthal, and W. Dalemans. 1992. In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. *Cell* **68**:143-155.

Ross, R. F. 1992. Mycoplasmal diseases. p. 537-551. *In Diseases of swine* (A. D. Leman, B. Straw, W. Mengeling, S. D'Allaire and D. Taylor, eds). 7th 536 Ed. Iowa State University Press, Ames.

Roth, J. A., and E. L. Thacker. 2006. Immune system. In: Straw, BE, Zimmerman, JJ, D'Allaire, S and Taylor, DJ (eds) *Diseases of Swine*. Ames, IA: Iowa State University Press, pp. 15-36.

Rothmann, T., A. Hengstermann, N. J. Whitaker, M. Scheffner, and H. zur Hausen. 1998. Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells. *J Virol* **72**:9470-9478.

Rottem, S. 2003. Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiol Rev* **83**:417-432.

Rowe, W. P., R. J. Huebner, L. K. Gilmore, R. H. Parrott, and T. G. Ward. 1953. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* **84**:570-573.

Russell, W. C. 2000. Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* **81**:2573-2604.

Rux, J. J., and R. M. Burnett. 2004. Adenovirus structure. *Hum Gene Ther* **15**:1167-1176.

Saalmuller, A, T. Werner, and V. Fachinger. 2002. T-helper cells from naive to committed. *Vet Immunol Immunopathol* **87**: 137–145.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual (2nd Ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Santosuosso, M., S. McCormick, and Z. Xing. 2005. Adenoviral vectors for mucosal vaccination against infectious diseases. *Viral Immunol* **18**:283-291.

Santosuosso, M., S. McCormick, X. Zhang, A. Zganiacz, and Z. Xing. 2006. Intranasal boosting with an adenovirus-vectored vaccine markedly enhances protection by parenteral *Mycobacterium bovis* BCG immunization against pulmonary tuberculosis. *Infect Immun* **74**:4634-4643.

Sarkis, C., S. Philippe, J. Mallet, and C. Serguera. 2008. Non-integrating lentiviral vectors. *Curr Gene Ther* **8**:430-437.

Sarradell, J., M. Andrada, A. S. Ramirez, A. Fernandez, J. C. Gomez-Villamandos, A. Jover, H. Lorenzo, P. Herraez, and F. Rodriguez. 2003. A morphologic and immunohistochemical study of the bronchus-associated lymphoid tissue of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Pathol* **40**:395-404.

Sasaki, Y., J. Ishikawa, A. Yamashita, K. Oshima, T. Kenri, K. Furuya, C. Yoshino, A. Horino, T. Shiba, T. Sasaki, and M. Hattori. 2002. The complete genomic sequence of *Mycoplasma penetrans*, an intracellular bacterial pathogen in humans. *Nucleic Acids Res* **30**:5293-5300.

Schmidt, J. A., G. F. Browning, and P. F. Markham. 2007. *Mycoplasma hyopneumoniae* mhp379 is a Ca²⁺-dependent, sugar-nonspecific exonuclease exposed on the cell surface. *J Bacteriol* **189**:3414-3424.

Schneider, J., J. A Langermans , S.C. Gilbert , T. J. Blanchard, et al. 2001. A prime-boost immunisation regimen using DNA followed by recombinant modified vaccinia virus Ankara induces strong cellular immune responses against the *Plasmodium falciparum* TRAP antigen in chimpanzees. *Vaccine* **19**:4595-4602.

Sergeeva, M. G., M. V. Gonchar, A. T. Mevkh, and S. D. Varfolomeyev. 1997. Prostaglandin E2 biphasic control of lymphocyte proliferation: inhibition by picomolar concentrations. *FEBS Lett* **418**:235-238.

Sheldrake, R. F., L. F. Romalis, and 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.

Shenk, T. 2001. *Adenoviridae*: the viruses and their replication. In *Fields Virology*, 4th edn, vol. 2, pp. 2265-2300. Edited by D. M. Knipe and P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.

Sheppard, M., W. Werner, E. Tsatas, R. McCoy, S. Prowse, and M. Johnson. 1998. Fowl adenovirus recombinant expressing VP2 of infectious bursal disease virus induces protective immunity against bursal disease. *Arch Virol* **143**:915-930.

Shimoji, Y., E. Oishi, Y. Muneta, H. Nosaka, and 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.

Shirakawa, T. 2009. Clinical trial design for adenoviral gene therapy products. *Drug News Perspect* **22**:140-145.

Sibila, M., M. Calsamiglia, D. Vidal, L. Badiella, A. Aldaz, and J. C. Jensen. 2004. Dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in 12 farms with different production systems. *Can J Vet Res* **68**:12-18.

Sibila, M., M. Nofrarias, S. Lopez-Soria, J. Segales, O. Valero, A. Espinal, and M. Calsamiglia. 2007. Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs. *Vet Microbiol* **122**:97-107.

Simecka, J. W. 2005. Immune responses following mycoplasma infection, p. 485-534. In A. Blanchard and G. Browing (ed.), *Mycoplasma: molecular biology, pathogenicity and strategies for control*. CRC Press, Oxford, United Kingdom.

Smart, S. J., and T. B. Casale. 1994. Pulmonary epithelial cells facilitate TNF-alpha-induced neutrophil chemotaxis. A role for cytokine networking. *J Immunol* **152**:4087-4094.

Smith, D. G., W. C. Russell, W. J. Ingledew, and D. Thirkell. 1993. Hydrolysis of urea by *Ureaplasma urealyticum* generates a transmembrane potential with resultant ATP synthesis. *J Bacteriol* **175**:3253-3258.

Sorensen, V., K. Barfod, and N. C. Feld. 1992. Evaluation of a monoclonal blocking ELISA and IHA for antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae* in SPF-pig herds. *Vet Rec* **130**:488-490.

Sorensen, V., S. V. Jorsal, and J. Mousing. 2006. Diseases of the respiratory system. In: Straw BE, Zimmermann J, D'Allaire S, Taylor DJ, editors, Diseases of swine. 9th ed. Ames: Iowa State University Press. p. 149-177.

St Clair, M. H., C. U. Lambe, and P. A. Furman. 1987. Inhibition by ganciclovir of cell growth and DNA synthesis of cells biochemically transformed with herpesvirus genetic information. *Antimicrob. Agents Chemother* **31**:844-849.

Stakenborg, T., J. Vicca, D. Maes, J. Peeters, A. de Kruif, F. Haesebrouck, and P. Butaye. 2006. Comparison of molecular techniques for the typing of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. *J Microbiol Methods* **66**:263-275.

Stakenborg, T., J. Vicca, P. Butaye, D. Maes, F. C. Minion, J. Peeters, A. De Kruif, and F. Haesebrouck. 2005. Characterization of *in vivo* acquired resistance of *Mycoplasma hyopneumoniae* to macrolides and lincosamides. *Microb Drug Resist* **11**:290-294.

Stano, N. M., and S. S. Patel. 2004. T7 lysozyme represses T7 RNA polymerase transcription by destabilizing the open complex during initiation. *J Biol Chem* **279**: 16136-16143.

Stark, K. D., J. Nicolet, and J. Frey. 1998. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by air sampling with a nested PCR assay. *Appl Environ Microbiol* **64**:543-548.

Stein, R. W., M. Corrigan, P. Yaciuk, J. Whelan, and E. Moran. 1990. Analysis of E1A-mediated growth regulation functions: binding of the 300-kilodalton cellular product correlates with E1A enhancer repression function and DNA synthesis-inducing activity. *J Virol* **64**: 4421-4427.

Stevens, T. L., A. Bossie, V. M. Sanders, R. Fernandez-Botran, R. L. Coffman, T. R. Mosmann, and E. S. Vitetta. 1988. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* **334**:255-258.

Strait, E. L., M. L. Madsen, F. C. Minion, J. Christopher-Hennings, M. Dammen, K. R. Jones, and E. L. Thacker. 2008. Real-time PCR assays to address genetic diversity in *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Clin Microbiol* **8**:2491-2498.

Straw, B. E., V. K. Tuovinen, and M. Bigras-Poulin. 1989. Estimation of the cost of pneumonia in swine herds. *J Am Vet Med Assoc* **195**:1702-1706.

Suomalainen, M., M. Y. Nakano, K. Boucke, S. Keller, and U. F. Greber. 2001. Adenovirus-activated PKA and p38/MAPK pathways boost microtubule-mediated nuclear targeting of virus. *EMBO J* **20**:1310-1319.

Sutton, V. R., M. E. Wowk, M. Cancilla, and J. A. Trapani. 2003. Caspase activation by granzyme B is indirect, and Caspase autoprocessing requires the release of proapoptotic mitochondrial factors. *Immunity* **18**:319-329.

Tajima, M., T. Yagihashi, and T. Nunoya. 1985. Ultrastructure of mycoplasmal capsules as revealed by stabilization with antiserum and staining with ruthenium red. *Nippon Juigaku Zasshi* **47**: 217 – 223.

Tang, J., M. Hu, S. Lee, and R. Roblin. 2000. A polymerase chain reaction based method for detecting *Mycoplasma/Acholeplasma* contaminants in cell culture. *J Microbiol Methods* **39**:121-126.

Tatsis, N., and H. C. Ertl. 2004. Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol Ther* **10**:616-629.

Thacker, E. L. 2006. Mycoplasmal diseases. In: Straw BE, Zimmermann J, D'Allaire S, Taylor DJ, editors, Diseases of swine. 9th ed. Ames: Iowa State University Press. p.700-713.

Thacker, E. L., B. J. Thacker, M. Kuhn, P. A. Hawkins, and W. R. Waters. 2000^a. 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., B. J. Thacker, T. F. Young, and P. G. Halbur. 2000^b. Effect of vaccination on the potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-induced pneumonia by *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vaccine* **18**:1244-1252.

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**:620-627.

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

Thanawongnuwech, R., B. Thacker, P. Halbur, and E. L. Thacker. 2004. Increased production of proinflammatory cytokines following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Clin Diagn Lab Immunol* **11**:901-908.

Thanawongnuwech, R., T. F. Young, B. J. Thacker, and E. L. Thacker. 2001. Differential production of proinflammatory cytokines: in vitro PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* co-infection model. *Vet Immunol Immunopathol* **79**:115-127.

Theiss, P. M., M. F. Kim, and K. S. Wise. 1993. Differential protein expression and surface presentation generate high-frequency antigenic variation in *Mycoplasma fermentans*. *Infect Immun* **61**:5123-5128.

Trachtenberg, S. 2006. The cytoskeleton of *spiroplasma*: a complex linear motor. *J Mol Microbiol Biotechnol* **11**:265-283.

Tripathy, S. K., H. B. Black, E. Goldwasser, and J. M. Leiden. 1996. Immune responses to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors. *Nat Med* **2**:545-550.

Twiehaus, M. J., and N. J. Underdahl. 1975. Control and elimination of swine diseases through reproduction with specific-pathogen-free stock. In: H. W. Dunne and A. d. Leman, editors. Diseases of swine. 4th ed. Ames: Iowa State University Press. p.1163-1179.

Ullman, A. J., N. C. Reich, and P. Hearing. 2007. Adenovirus E4 ORF3 Protein Inhibits the Interferon-Mediated Antiviral Response. *J. Virol* **81**:4744-4752.

Urs, H., and M. Dobbstein. 2004. E1B-55-Kilodalton Protein Is Not Required To Block p53-Induced Transcription during Adenovirus Infection. *J Virol* **78**: 7685-7697.

Van Oostrum, J, and R. M., Burnett. 1985. Molecular composition of the adenovirus type 2 virion. *J Virol* **56**: 439-48.

Vanden Bush, T. J., and R. F. Rosenbusch. 2003. Characterization of the immune response to *Mycoplasma bovis* lung infection. *Vet Immunol Immunopathol* **94**:23-33.

Vanderplasschen, A., and P. P. Pastoret. 2003. The uses of poxviruses as vectors. *Curr Gene Ther* **3**:583-595.

Vasconcelos, A. T., et al., 2005. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. *J Bacteriol* **187**:5568-5577.

Verdin, E., C. Saillard, A. Labbe, J. M. Bove, and M. Kobisch. 2000. A nested PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tracheobronchiolar washings from pigs. *Vet Microbiol* **76**:31-40.

Vicca, J., D. Maes, L. Jonker, A. de Kruif, and F. Haesebrouck. 2005. Efficacy of in-feed medication with tylosin for the treatment and control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections. *Vet Rec* **156**:606-610.

Vicca, J., T. Stakenborg, D. Maes, P. Butaye, J. Peeters, A. de Kruif, and F. Haesebrouck. 2004. In vitro susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:4470-4472.

Vicca, J., T. Stakenborg, D. Maes, P. Butaye, J. Peeters, A. de Kruif, and F. Haesebrouck. 2003. Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Vet Microbiol* **97**:177-190.

Wales, J., B. Foxwell, and M. Feldmann. 2007. Targeting intracellular signaling: a novel approach to vaccination. *Expert Rev Vaccines* 6:971-980.

Walter, D., J. T. Holck, and S. Sornsen. 2000. The effect of a metaphylactic pulse dosing in-feed antimicrobial strategy on finishing pig health and performance. *Swine Health Prod* 8:65-71.

Wang, H., F. Kong, P. Jelfs, G. James, and G. L. Gilbert. 2004. Simultaneous detection and identification of common cell culture contaminant and pathogenic mollicutes strains by reverse line blot hybridization. *Appl Environ Microbiol* 70:1483-1486.

Wang, K., T. Guan, D. A. Cheresh, and G. R. Nemerow. 2000. Regulation of adenovirus membrane penetration by the cytoplasmic tail of integrin beta5. *J Virol* 74:2731-2739.

Wang, Q., G. Greenburg, D. Bunch, D. Farson, and M. H. Finer. 1997. Persistent transgene expression in mouse liver following in vivo gene transfer with a delta E1/delta E4 adenovirus vector. *Gene Ther* 4:393-400.

Weber, E., W. F. Anderson, and N. Kasahara. 2001. Recent advances in retrovirus vector-mediated gene therapy: teaching an old vector new tricks. *Curr Opin Mol Ther* 3:439-453.

Webster, A., I. R. Leith, J. Nicholson, J. Hounsell, and R. T. Hay. 1997. Role of preterminal protein processing in adenovirus replication. *J Virol* 71:6381-6389.

Weisburg, W. G., J. G. Tully, D. L. Rose, J. P. Petzel, H. Oyaizu, D. Yang, L. Mandelco, J. Sechrest, T. G. Lawrence, J. Van Etten, and et al. 1989. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *J Bacteriol* 171:6455-6467.

Westberg, J., A. Persson, A. Holmberg, A. Goesmann, J. Lundeberg, K. E. Johansson, B. Pettersson, and M. Uhlen. 2004. The genome sequence of *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* SC type strain PG1T, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). *Genome Res* 14:221-227.

Whibley, C., P. D. Pharoah, and M. Hollstein. 2009. p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat Rev Cancer* 9:95-107.

Wickham, T. J., P. Mathias, D. A. Cheresch, and G. R. Nemerow. 1993. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 73:309-319.

Willby, M. J., M. F. Balish, S. M. Ross, K. K. Lee, J. L. Jordan, and D. C. Krause. 2004. HMW1 is required for stability and localization of HMW2 to the attachment organelle of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Bacteriol* 186:8221-8228.

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

Woese, C. R., J. Maniloff, and L. B. Zablen. 1980. Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:494-498.

Wu, P., M. I. Phillips, J. Bui, and E. F. Terwilliger. 1998. Adeno-Associated Virus Vector-Mediated Transgene Integration into Neurons and Other Nondividing Cell Targets. *J Virol* 72:5919-5926.

Xie, Y., J. D. Gilbert, J. H. Kim, and S. O. Freytag. 1999. Efficacy of adenovirus-mediated CD/5-FC and HSV-1 thymidine kinase/ganciclovir suicide gene therapies concomitant with p53 gene therapy. *Clin Cancer Res* 5:4224-4232.

Xiong, W., S. Goverdhana, S. A. Sciascia, M. Candolfi, J. M. Zirger, C. Barcia, et al. 2006. Regulatable gutless adenovirus vectors sustain inducible transgene expression in the brain in the presence of an immune response against adenoviruses. *J Virol* **80**:27-37.

Yang, W. J., J. F. Lai, K. C. Peng, H. J. Chiang, C. N. Weng, and D. Shiuan. 2005. Epitope mapping of *Mycoplasma hyopneumoniae* using phage displayed peptide libraries and the immune responses of the selected phagotopes. *J Immunol Methods* **304**:15-29.

Yang, Y., F. A. Numes, K. Berencsi, E. E. Furth, E. Gönczöl, and J. M. Wilson. 1994. Cellular immunity to viral antigens limits E1 deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:4407-4411.

Ye, L., S. Zhang, G. Ma, F. Zhang, and H. Rongliang. 2008. Efficacy and safety of a live adenovirus-vectored rabies virus vaccine in swine. *Vaccine* **28**:5368-5372.

Yoshimura, K., M. A. Rosenfeld, H. Nakamura, E. M. Scherer, A. Pavirani, J. P. Lecocq, R. G. Crystal. 1992. Expression of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in the mouse lung after in vivo intratracheal plasmid-mediated gene transfer. *Nucleic Acids Res* **20**:3233-3240.

Young, C. S. 2003. The structure and function of the adenovirus major late promoter. *Curr Top Microbiol Immunol* **272**:213-249.

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

Zhang, Y., N. Chirmule, G. P. Gao, R. Qian, M. Croyle, B. Joshi, J. Tazelaar, and J. M. Wilson. 2001. Acute cytokine response to systemic adenoviral vectors in mice is mediated by dendritic cells and macrophages. *Mol Ther* **3**:697-707.

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

Zimmermann, J., D. A. Benfield, M. P. Murtaugh, F. Osorio, G. W. Stevenson, and M. Torremorell. 2006. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (Porcine Arterivirus). In: B. E. Straw, J. Zimmermann, S. D'Allaire and D. J. Taylor, Editors, *Diseases of Swine*. 9th ed. Iowa State University Press. p.387-417.

- ANNEXE A - :
« Publication avec comité de lecture »

Contribution des co-auteurs dans la publication

«Immune Responses Induced by Replication-Defective Adenovirus Expressing the C-terminal portion of *Mycoplasma hyopneumoniae*-P97 Adhesin»

Plusieurs personnes ont travaillé sur cette recherche. Le Dr Kane Cheikh Saad Bouh a réalisé la mutagenèse dirigée du gène p97c. Il a ensuite cloné le gène muté dans le vecteur pGEX-4T1 et produit l'anticorps monoclonal 8H4-G6 utilisé dans cette étude. Le Dr Emmanuel Moreau a participé aux prises de sang chez les souris. Il s'est également impliqué dans la correction de la publication. Le Dr Bernard Massie nous a fourni le vecteur de transfert et l'AdV5 non répliatif qui ont servi à la construction du vecteur rAdP97c. Il a aussi mis à notre disposition le protocole pour la production du virus recombinant. Le Dr Max Arella et le Dr Carl. A. Gagnon, à titre de directeur et de co-directeur de recherche, respectivement, ont supervisé mes travaux. Ils se sont également impliqués dans la correction de la publication.

Pour ma part, j'ai effectué tous les travaux expérimentaux. À partir du plasmide pGEX-4T1 contenant le gène p97c muté (pGEX/P97c), j'ai transformé les bactéries et produit la protéine recombinante P97c (rP97c). Toujours à partir de ce plasmide, j'ai amplifié par PCR le gène P97c puis construit le vecteur de transfert pAdP97c et l'adénovirus recombinant non répliatif (rAdP97c). J'ai aussi immunisé les souris et procédé à la collecte des échantillons (sérum et LBA) avec l'aide du Dr Emmanuel Moreau. Les résultats d'immunobuvardage de type Western, d'immunofluorescence indirecte et des tests d'ELISA sont issus de mes travaux. Finalement, j'ai écrit l'article et effectué la revue de littérature, les figures et les tableaux qu'il contient.

Immune Responses Induced by Replication-Defective Adenovirus Expressing the C-Terminal Portion of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 Adhesin[∇]

F. R. Okamba,¹ E. Moreau,¹ K. Cheikh Saad Bouh,¹ C. A. Gagnon,² B. Massie,^{1,3} and M. Arella^{1*}

INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, Canada¹; Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP), Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada²; and Biotechnology Research Institute, National Research Council, Montreal, Québec, Canada³

Received 5 November 2006/Returned for modification 29 December 2006/Accepted 21 March 2007

Mycoplasma hyopneumoniae, the causative agent of porcine enzootic pneumonia, colonizes the respiratory cilia of affected swine, causing significant economic losses to swine production worldwide. Vaccination is the most cost-effective strategy for the control and prevention of this disease. The goal of this study was to design and evaluate a replication-defective recombinant adenovirus, rAdP97c, expressing the C-terminal portion of P97 adhesin (P97c), an important pathogenesis-associated protein of *M. hyopneumoniae*, as a new vaccine candidate against *M. hyopneumoniae* infection. P97c-specific immune responses were evaluated in BALB/c mice following intranasal and intramuscular inoculation with rAdP97c. Mice inoculated by both routes of immunization produced significant levels of specific immunoglobulin G (IgG) antibodies in the serum and in bronchoalveolar lavage fluids (BALs). Animals immunized intranasally also produced a significant level of P97c-specific IgA in BALs. Intramuscular inoculation of rAdP97c induced a systemic and mucosal Th1-type biased response, evidenced by the predominance of IgG2a in the serum and BALs, whereas intranasal inoculation resulted in a mixed Th1/Th2-type response (balanced levels of IgG1 and IgG2a) in both systemic and mucosal compartments. P97c-specific antibodies were able to inhibit the growth of *M. hyopneumoniae* cells *in vitro*. These data suggest that rAdP97c vaccine may represent a new strategy for controlling infection by *M. hyopneumoniae*.

Mycoplasma hyopneumoniae is the etiological agent of enzootic porcine pneumonia (PEP), one of the most economically significant diseases in the swine industry worldwide. The disease is characterized by chronic nonproductive cough, retarded growth rate, and inefficient food conversion (29). Adherence of *M. hyopneumoniae* to the swine respiratory epithelial cells causes reduction of ciliary activity, ciliostasis, and loss of cilia (7), predisposing the swine to secondary infections. For example, it is now clear that *M. hyopneumoniae* potentiates and exacerbates the severity and duration of pneumonia caused by the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (38). After colonizing, *M. hyopneumoniae* stimulates numerous changes, consisting of infiltrates, mononuclear cells (macrophages and lymphocytes) around bronchi and bronchioles, secretion of proinflammatory cytokines, and lymphoid hyperplasia of bronchus-associated lymphoid tissue (22, 26, 30). Traditionally, *M. hyopneumoniae* infection is controlled by the use of antibiotics. However, this practice does not prevent infection, and treatment cost is prohibitive. In addition to the use of antibiotics and animal management procedures, the prevention of PEP through vaccination is needed. The commonly used vaccines against *M. hyopneumoniae* are in the form of inactivated whole cells or bacterins. These vaccines are efficacious against *M. hyopneumoniae* challenge (8, 37) but do

not prevent colonization by the pathogen or completely eliminate pneumonia (14). In addition, their preparation is very expensive, because the growth of *M. hyopneumoniae* *in vitro* requires a rich culture medium and is time-consuming (19).

To develop the next generation of *M. hyopneumoniae* vaccines, several research groups are pursuing different strategies, including subunit vaccines (6, 18) and utilization of bacterial or plasmid vectors expressing *M. hyopneumoniae* proteins (4, 5, 32). Some immunodominant antigens of *M. hyopneumoniae* have been identified. They include the cytosolic 36-kDa protein (P36), lipoproteins P65 and Mhp378 (17, 23, 35), and the P97 protein. The last is identified as a ciliary adhesion molecule on the basis that monoclonal antibodies against P97 inhibit adherence of *M. hyopneumoniae* to swine cilia *in vitro* (45). P97 contains two repeat regions, R1 and R2, located in its C-terminal portion (15). The cilium binding site is located in R1, and at least seven AAKPV/E repeats are required for functional binding (15, 24). R2, located downstream of R1, is involved in attachment of *M. hyopneumoniae* to the host extracellular matrix (16). P97 is typically well conserved among different strains of *M. hyopneumoniae*, and the lack of cytoadhesion of avirulent strains of *M. hyopneumoniae* is related to the absence of functional P97 adhesin (41). Therefore, P97 adhesin could represent an attractive target to develop effective vaccines against *M. hyopneumoniae*. However, when used as a recombinant vaccine, P97 did not protect swine from infection or reduce the severity of lung lesions caused by *M. hyopneumoniae* (18). On the other hand, Shimoji et al. (32) showed that intranasal immunization of pigs with an attenu-

* Corresponding author. Mailing address: INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, Canada H7V 1B. Phone: (450) 687-5010, ext. 4356. Fax: (450) 686-5626. E-mail: max.arella@iaf.inrs.ca.

[∇] Published ahead of print on 4 April 2007.

TABLE 1. Oligonucleotide primer sequences

Designation ^a	Nucleotide sequence (5' to 3') ^b	Description ^c
P97c546EcoRI(F)	TGATGAATTCGGGGCCTTTAAATCCGTGCTTAATTCCT GGACAGGAAAAATTCAGC	Cloning and SDM
P97c546(R)	GTCTAATTTTGCCCAAGGAGCAAAATT	SDM
P97c766(F)	AATAATTTTGCTCCTTGGGCAAAATTAGAC	SDM
P97c766(R)	CAACCTCTGTTTTCCAATTTTACCTTG	SDM
P97c1054(F)	CAAGGTAAAAATTGAAAACAGAGGTTG	SDM
P97c1054(R)	TTGTCGACTTATTTAGATTCTGGTTCCTC	Cloning and SDM
pAd97cBglII(F)	GGAAGATCTGCCACCATGAATTCGGGGCCTTTAAATCC	Cloning
pAd97cBglII(R)	GGAAGATCTTTATTTAGATTCTGGTTCCTC	Cloning

^a The numbers indicate the position of the nucleotide A (in TGA codons) replaced by the nucleotide G during site-directed mutagenesis. F, forward primer; R, reverse primer.

^b The underlined sequences represent EcoRI, Sall, or BglII restriction sites. GCCACC, Kozak sequence.

^c SDM, site-directed mutagenesis.

ated strain of *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 expressing the C-terminal portion of the P97 protein significantly reduced lung lesions caused by *M. hyopneumoniae*, despite the absence of antigen-specific antibody responses. This finding indicates that the P97 antigen can be protective if administered in a manner that increases its immunogenicity.

As *M. hyopneumoniae* infection is restricted to the swine respiratory tract, the ideal vaccine would be mucosally administered and able to stimulate a suitable mucosal immunity, including specific T helper (Th) response and immunoglobulin A (IgA), which can prevent the adherence of pathogens to mucosal cell surfaces (25). Replication-defective recombinant adenoviruses (rAds) are extensively used as antigen delivery vehicle vectors (11, 36). They display several attractive features, including (i) natural tropism for epithelial cells, (ii) efficient gene delivery to antigen-presenting cells, and (iii) high immunogenicity to induce both humoral and cellular immune responses to the transgene product, in some cases after a single inoculation (36).

The purpose of the present study was to construct a rAd expressing the C-terminal portion of *M. hyopneumoniae* P97 adhesin (rAdP97c) and to characterize the P97c-specific immune response induced in a murine model. Alternative routes of administration of rAdP97c and their effects on humoral immunity were evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Cells, virus, and plasmids. *M. hyopneumoniae* strain 25934 was obtained from the American Type Collection Culture (ATCC) (Manassas, VA). *Escherichia coli* DH5 and BL21(DE3)pLysS strains were used for plasmid DNA amplification and production of recombinant proteins, respectively, and were grown in Luria-Bertani medium at 37°C. Human embryonic kidney (HEK) 293 cells (ATCC CRC-1573) were used for the production of rAds, and they were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and 2 mM L-glutamine at 37°C in a 5% CO₂ incubator. The Ad used in this study was a replication-defective E1- and E3-deleted human serotype 5 (Ad5). The pAdPS-CMV5-Cuo-IRES-GFP (pAd) plasmid was used as an Ad5 transfer vector for the generation of rAds (28). Both pAd and Ad5 were obtained from B. Massie, Biotechnology Research Institute, National Research Council of Canada. The pGEX4T1 plasmid (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Québec, Canada) was used to express recombinant proteins in fusion with glutathione S-transferase (GST).

PCR amplification of the P97c gene and site-directed mutagenesis. Genomic DNA from *M. hyopneumoniae* was prepared as previously described (3) and was used as a template for the amplification of a 1,676-bp fragment (containing the R1 and R2 regions), which was designated the C-terminal portion of the P97 gene (P97c). The oligonucleotide primers used for amplification were P97c546EcoRI(F) and P97c1054Sall(R) (Table 1). They were designed from the previously published sequence of the P97 adhesin gene (GenBank accession no. U50901). To express the full-length P97c protein in heterologous cells, mycoplasma TGA codons (tryptophan) found in the P97c gene were replaced with the universal TGG (tryptophan) codons by site-directed mutagenesis using the overlapping extension-PCR method (Fig. 1). Primers each carrying the appropriate substitution used for site-directed mutagenesis are listed in Table 1. Amplification reactions were carried out using Vent DNA polymerase. After

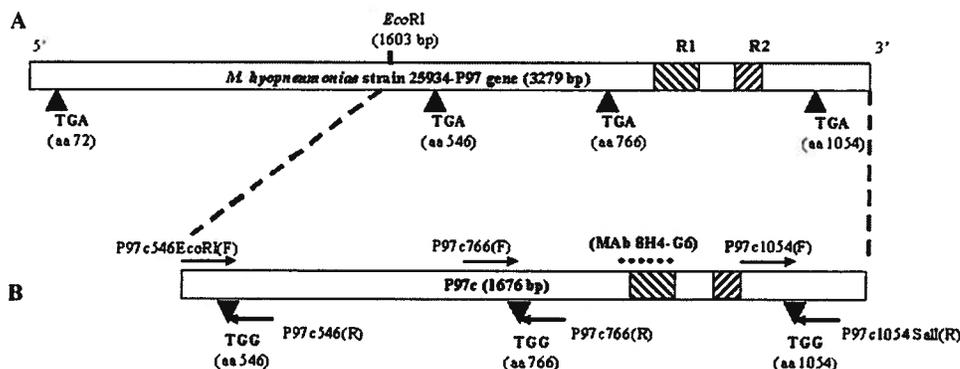


FIG. 1. (A) Schematic representation of the P97 adhesin gene of *M. hyopneumoniae* strain 25934 showing the R1 and R2 regions (hatched) and the positions of TGA codons. (B) Schematic representation of site-directed mutagenesis of TGA codons in the C-terminal portion of the P97 adhesin gene (P97c). The arrows indicate the orientations of the overlapping primers used. The region of the P97c protein recognized by MAb 8H4-G6 is indicated (square dot).

amplification, all products were sequenced to confirm that changes from A to G occurred at the third position of the targeted codons.

Cloning and purification of recombinant P97c. The mutated P97c gene was digested with EcoRI and Sall and cloned into the pGEX4T1 plasmid. The resulting pGEX/P97c vector was transformed into *E. coli* BL21(DE3)pLysS. An overnight culture was diluted in 1 liter of LB medium supplemented with 100 µg/ml ampicillin and incubated at 37°C until late log phase (the A_{600} reached 0.6 to 0.8). Protein expression was induced by the addition of isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside to a final concentration of 1 mM for 3 h. Cells were harvested and resuspended in ice-cold 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4) containing 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mg/ml lysozyme, and protease inhibitors. The cells were sonicated, and 1% Triton X-100 was added, followed by a 30-min incubation period at room temperature (RT). The GST-P97c protein was purified by affinity chromatography on glutathione-Sepharose 4B beads (Amersham Pharmacia) and either eluted with reduced glutathione (20 mM glutathione, 50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 120 mM NaCl) or directly cleaved for 16 h at RT with 20 units of thrombin protease. The recombinant P97c protein (rP97c) was then dialyzed against PBS and decontaminated using a Detoxi-Gel endotoxin-removing column (Pierce, Rockford, IL). The protein concentration was determined using a Bio-Rad protein assay in conjunction with a bovine serum albumin standard curve (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada). The rP97c protein was identified by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and confirmed by Western blot analysis with mouse monoclonal anti-P97c antibody (MAb 8H4-G6). This MAb was previously produced in our laboratory by intraperitoneally immunizing BALB/c mice with the recombinant GST-P97c fusion protein (unpublished data).

Construction of replication-defective rAds. The mutated P97c gene was reamplified by PCR from the pGEX/P97c plasmid using the forward primer pAd97cBgIII(F) (including a GCCACC Kozak consensus sequence and an ATG initiation codon) and the reverse primer pAd97cBgIII(R). After digestion with BgIII, the PCR product (1,676 bp) was inserted between the BgIII and BamHI sites of the pAd plasmid under the control of the constitutive cytomegalovirus immediate-early promoter/enhancer, yielding the pAdP97c plasmid. The pAd vector was digested with BgIII and BamHI to remove the gene encoding green fluorescent protein (GFP), in order to screen the positive clones by immunofluorescence analysis. rAd5 carrying P97c (rAdP97c) was generated using the transfection/infection method (10). pAdP97c was linearized by PacI digestion and transferred into HEK 293 cells using polyethylenimine as a transfection reagent (Polysciences Inc.). The next day, cells were infected with Ad5 at various multiplicities of infection and incubated for 4 days to maximize homologous recombination. The cells were lysed by freeze/thaw cycles, and supernatant was used to reinfect fresh HEK 293 cells for 6 h. After being overlaid with 1.25% agarose SeaPlaque-Dulbecco's modified Eagle's medium mixture, the cells were incubated until lysis plaques formed. The viral plaques were screened for P97c expression by immunofluorescence and Western blotting. One positive clone was plaque purified and amplified on HEK 293 cells. After freeze/thaw cycles, rAdP97c was purified by double cesium chloride centrifugation and dialyzed against PBS. The rAd5 expressing GFP (rAdGFP) was constructed in the same way. Viruses were titered by the 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀) method (27) and stored at -80°C.

Immunofluorescence analysis. Indirect immunofluorescence assays were performed on HEK 293 cells seeded in 24-well plates and transfected with 2 µg of pAdP97c or infected with rAdP97c (multiplicity of infection, 100:1). Mock-infected cells were used as negative controls. After 48 h of incubation, the cells were washed with PBS-0.1% Tween 20 (PBST) and fixed with cold acetone-methanol (1:1). The plates were incubated with MAb 8H4-G6 for 1 h at 37°C. After the plates were washed, bound MAb was detected with fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) and visualized by fluorescence microscopy (Leica; Leitz, Wetzlar, Germany).

SDS-PAGE and Western blot analysis. To determine the expression of rP97c in *E. coli*, proteins from transformed cells were subjected to 12% SDS-PAGE under reducing conditions and then visualized by Coomassie blue staining or transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Cells transformed by pGEX-4T1 served as negative controls. To check for P97c expression in eukaryotic cells, HEK 293 cells were seeded in 60-mm dishes and transfected with pAdP97c or infected with rAdP97c as described above. Cells transfected with pAd or infected with rAdGFP or mock-infected cells were used as negative controls. The cells were lysed in a buffer containing 150 mM NaCl, 10 mM Tris [pH 7.8], 1% Triton X, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, and complete protease inhibitors. Cell lysates were separated on 12% SDS-PAGE and blotted onto a nitrocellulose membrane. For Western blot analysis, the membrane was blocked overnight at 4°C in 5% nonfat milk in PBST and then probed with MAb

8H4-G6 for 1 h at RT. After being washed with PBST, the membrane was treated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma). Immunoreactive protein bands were detected with 0.005% (wt/vol) 4-chloro-1-naphthol-0.015% (vol/vol) hydrogen peroxide in PBS.

Mice and immunization experiments. Female BALB/c mice aged 7 to 8 weeks were obtained from Charles River Breeding Laboratory (Montreal, Quebec, Canada) and maintained under specific-pathogen-free conditions at the Experimental Biology Center of the Armand-Frappier Institute (Laval, Quebec, Canada). Immunization experiments were performed according to the Institutional Animal Care and Use Committee guidelines. Mice ($n = 5$ per group) were immunized either intranasally (i.n.) or intramuscularly (i.m.) with rAdP97c or rAdGFP (as a negative control). For i.n. immunization, mice were anesthetized with isoflurane and inoculated with 20 µl in each nare using a Finn pipette for a total of 5×10^7 TCID₅₀ in PBS. For i.m. inoculation, a total volume of 100 µl of viruses (5×10^7 TCID₅₀) was injected into each quadriceps (50 µl/quadriceps) using a 25-gauge needle. The mice received a booster at day 30 with the same dose. The mice were bled at days 14, 30, and 60 postinfection (p.i.). At day 60, the mice were sacrificed, and bronchoalveolar lavages were performed by infusion of 0.5 ml of PBS-5 mM EDTA into the lungs, using a 0.58-mm polyethylene catheter. Bronchoalveolar lavage fluids (BALs) were then filtered through a sterile 100-µm membrane to remove mucus and cell debris. Sera and BALs were heat inactivated at 56°C for 30 min, pooled by immunization group, and stored at -80°C until they were used.

Detection of P97c-specific antibodies. P97c-specific antibody responses in immunized mice were assayed by Western blotting and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). For Western blot analysis, rP97c was submitted to SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was blocked overnight at 4°C in 5% nonfat milk-PBST and cut into strips. Individual strips were probed with sera (diluted 1:200 in PBST) from rAdP97c-immunized mice. P97c-specific antibodies were detected with HRP-conjugated goat anti-mouse IgG and visualized as described above. Preimmune serum and sera from rAdGFP-immunized mice were used as negative controls. Levels of P97c-specific IgA and IgG were determined by indirect ELISA. Ninety-six-well plates (ICN Biomedicals) were coated with rP97c (0.5 µg/well, diluted in PBS). After overnight incubation at 4°C, the plates were washed three times with PBST and blocked for 2 h at RT with 100 µl of PBST plus 2% bovine serum albumin. The wells were washed, and 100 µl of sera (1:200 dilution in PBST) or BALs (1:50 dilution) was added to each well. Each sample was assayed in duplicate. The plates were incubated for 2 h at 37°C and then washed, and detection of bound immunoglobulins was performed by adding 100 µl of HRP-conjugated anti-mouse IgG (1:2,000) or IgA (1:1,000) (Sigma). After incubation for 1 h, the plates were washed four times, and 100 µl of 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine substrate (Sigma) was added to each well. The reaction was stopped by adding 30 µl of 2N HCl per well, and optical densities were read at 405 nm (OD₄₀₅) with a spectrophotometer plate reader (Bio-Tek Instruments). In another set of experiments, P97c-specific IgG isotype responses were assayed using HRP-conjugated anti-mouse IgG1, IgG2a, IgG2b, or IgG3 as a secondary antibody (Boehringer Mannheim).

Growth inhibition assay. *M. hyopneumoniae* cells were grown at 37°C for 3 days in Friis medium (12) supplemented with 20% (vol/vol) porcine serum, 5% yeast extract, 0.15 mg/ml bacitracin, 0.08 mg/ml thallium acetate. Cells were harvested by centrifugation at 20,000 × g for 25 min and resuspended in growth medium. Mycoplasma cells (approximately 1×10^4 color-changing units/100 µl) were seeded in triplicate in 96-well plates in the presence of sera or BALs (100-µl serial dilutions in PBS). Phenol red (40 µg/ml) was added to increase the sensitivity of the assay. Cells incubated with sera or BALs from mice immunized with rAdGFP or with medium without antibodies were used as negative controls. The change in color-changing units with phenol red as the indicator at OD₅₆₀ was measured as an estimate of the growth of mycoplasma cells (5).

Statistical analysis. Statistical differences were determined by using a two-tailed Student *t* test. Data are expressed as the means ± the standard deviations of the means. A *P* value of <0.05 was considered significant.

Nucleotide sequence accession number. The GenBank accession number for the C-terminal portion of the P97 gene (P97c) is AY512905.

RESULTS

Construction of a rAd expressing P97c. In order to ensure full-length expression of P97c in heterologous cells, the TGA codons (which encode a tryptophan rather than a translation stop in mycoplasmas) within the DNA sequence of P97c were

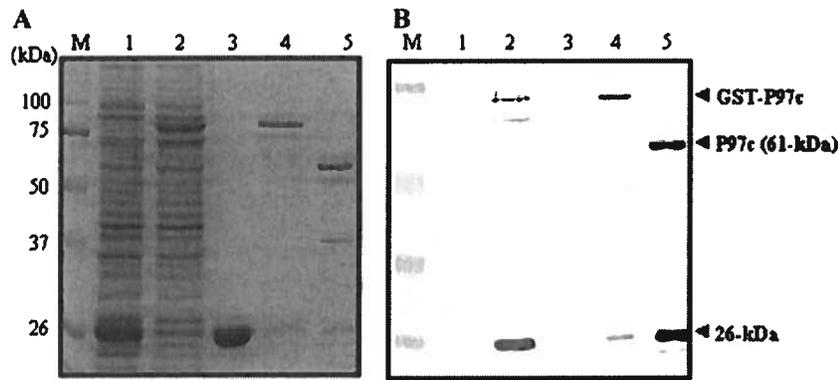


FIG. 2. Expression of P97c in *E. coli*. (A) SDS-PAGE detection of IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)-induced expression of P97c in BL21(DE3)pLys. The pGEX/P9c plasmid was transformed into the BL21(DE3)pLys strain of *E. coli* and induced by 1 mM IPTG for 3 h at 37°C. Proteins were separated on 12% SDS-PAGE, followed by Coomassie blue staining. (B) Western blot analysis using an anti-P97c MAb (MAb 8H4-G6). Lane 1, *E. coli* transformed with pGEX-4T1; lane 2, *E. coli* transformed with pGEX/P97c; lane 3, purified GST protein; lane 4, purified GST-P97c protein; lane 5, purified P97c protein after thrombin cleavage. M, molecular mass marker (in kDa).

converted to TGG codons by site-directed mutagenesis (Fig. 1). The mutated P97c gene was cloned into the pGEX-4T1 plasmid and expressed as a fusion protein with GST in *E. coli*. The expected mass of the P97c protein is 61 kDa. After purification, the SDS-PAGE analysis revealed a prominent band of 87 kDa corresponding to the GST-P97c fusion protein (Fig. 2A, lane 4). After thrombin cleavage, the expected protein band of 61 kDa was observed, as well as two other bands of approximately 26 and 35 kDa (Fig. 2A, lane 5). Western blotting using an anti-P97c MAb (MAb 8H4-G6) revealed the expected 61-kDa band, together with the product of 26 kDa, but not 36 kDa (Fig. 2B, lane 5). No immunoreactive bands were detected with controls (Fig. 2B, lanes 1 and 3). These results suggest that the epitope recognized by this MAb is located in the 26-kDa polypeptide, as indicated in Fig. 1. A previous study reported that the P97 cilium adhesin is cleaved at multiple sites during its expression in host cells, generating a family of peptides (9).

Next, the mutated P97c gene was subcloned into the Ad5 transfer vector. The resulting plasmid (pAdP97c) was used to generate rAd5 carrying the P97c gene (rAdP97c) by homologous recombination in HEK 293 cells. To assess whether P97c protein could be expressed in mammalian cells, cells were transfected with pAdP97c or infected with rAdP97c. Indirect immunofluorescence analysis performed with MAb 8H4-G6 demonstrated that the protein was expressed by both constructs. A strong immunofluorescence signal was detected in cells transfected with pAdP97c or infected with rAdP97c (Fig. 3A, a and b). As expected, no fluorescence signal was visible in mock-infected cells (Fig. 3A, c). The cell lysates were assayed by Western blotting using the same MAb. A band of 61 kDa, corresponding to the expected size of P97c, was detected in the lysates from cells transfected with pAdP97c or infected with rAdP97c (Fig. 3B, lanes 3 and 5, respectively), but not from controls (Fig. 3B, lanes 1, 2, and 4). However, the P97c protein seemed not to be cleaved in HEK 293 cells, since the 26-kDa product was not detected.

Systemic antibody responses elicited by rAdP97c. The ability of rAdP97c to stimulate an antibody response to P97c was determined after i.n. or i.m. immunization of BALB/c mice at

day 0 and boost at day 30. Mice inoculated with rAdGFP were used as negative controls. First, preimmune serum and sera collected at days 14, 30, and 60 were analyzed for the presence of P97c-specific antibodies by Western blotting using the purified rP97c as the antigen. As expected, P97c-specific antibodies were not detected in the preimmune serum and serum from mice immunized with rAdGFP (Fig. 4, lanes 1 and 2, respectively). P97c-specific IgG antibodies were detectable in sera of mice immunized with rAdP97c by either the i.n. or the i.m. route (Fig. 4, a and b, respectively). Sera collected at days 14, 30, and 60 p.i. immunoreacted with the 61-kDa protein (P97c). In addition, sera collected at days 30 and 60 also immunoreacted with the cleaved product of 26 kDa, but not of 35 kDa, suggesting that the immunogenic epitopes of P97c are located

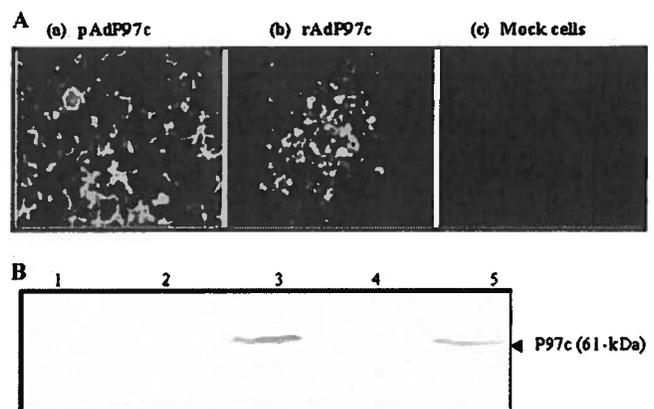


FIG. 3. Expression of the P97c gene in 293 cells. (A) Indirect immunofluorescence analysis. HEK 293 cells were transfected with pAdP97c (a), infected with rAdP97c (b), or mock infected (c) and probed with an anti-P97c MAb (MAb 8H4-G6). (B) Western blot analysis. Proteins were separated on 12% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membranes, and probed with MAb 8H4-G6. Lane 1, mock-infected cells; lane 2, cells transfected with original transfer vector; lane 3, cells transfected with pAdP97c; lane 4, cells infected with rAdGFP; lane 5, cells infected with rAdP97c. The arrow indicates the expected mass of the P97c protein.

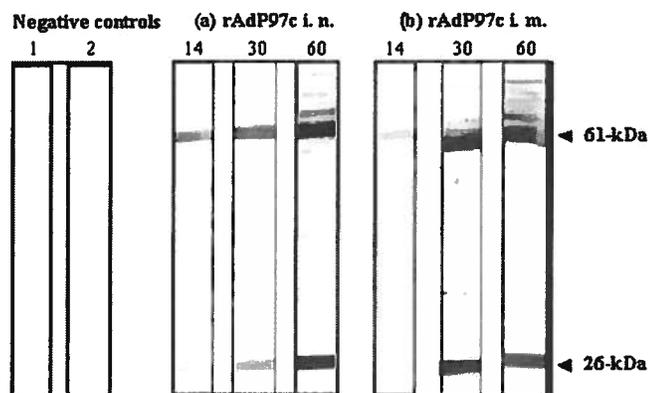


FIG. 4. Western blot analysis for P97c-specific antibody responses. The recombinant P97c protein was submitted to 12% SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane. Individual strips were incubated with serum (diluted 1:200). Lane 1, preimmune serum; lane 2, serum from rAdGFP-immunized mice; a and b, sera collected at days 14, 30, and 60 postimmunization from mice immunized with rAdP97c via the i.n. or i.m. route, respectively. These sera reacted with the expected protein corresponding to P97c (61 kDa) and also with the product of 26 kDa.

in the 26-kDa fragment (containing the R1 region), as indicated in Fig. 1.

Levels of P97c-specific antibodies induced by rAdP97c were further determined by indirect ELISA. As shown in Table 2, mice immunized (i.n. and i.m.) with rAdP97c produced significant levels of specific IgG as early as day 14 p.i. compared with the control groups ($P < 0.05$). There was no considerable difference between the i.n. and i.m. routes for the induction of specific antibodies at days 14 and 30. In contrast, we found that at day 60, the P97c-specific IgG level was two times higher in i.m.-inoculated animals than i.n.-immunized mice.

Mucosal antibody responses elicited by rAdP97c. To determine levels of mucosal IgG and IgA responses against P97c induced in mice following immunization with rAdP97c, BALs were collected at day 60 p.i. and examined by indirect ELISA (Table 1). Significant levels of P97c-specific IgG were detected in BALs of mice inoculated with rAdP97c by the i.n. and i.m. routes ($P < 0.05$). There was no considerable difference between the routes for the induction of local IgG. Immunization using the i.m. route did not induce P97c-specific IgA in BALs. In contrast, mice immunized i.n. gave a significant IgA response. This result indicates that P97c-specific IgA antibodies

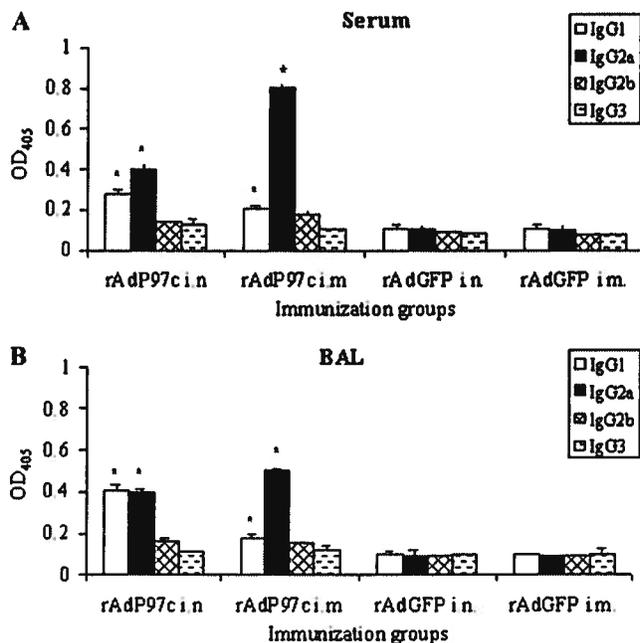


FIG. 5. Specific IgG isotype responses in mice immunized with rAd97c. Mice (five per group) were immunized with rAdP97c or with rAdGFP (negative control). Pools of sera (A) and BALs (B) collected at day 60 p.i. were examined for P97c-specific IgG isotypes by ELISA in duplicate. The data represent the mean OD_{405} plus the standard deviations. *, significant difference ($P < 0.05$) compared with negative controls.

detected in BALs were locally produced in the respiratory tract.

P97c-specific IgG isotypes. The P97c-specific IgG isotypes in sera and BALs were measured at day 60 p.i. in order to determine which Th subset responses were elicited. In mice, IgG1 is indicative of a Th2-type response, whereas IgG2a is predominantly produced during a Th1-type response (34). In sera of mice immunized with rAdP97c i.n. and i.m., IgG1 and IgG2a were significantly detected ($P < 0.05$); levels of IgG2b and IgG3 did not rise significantly above those of negative controls (Fig. 5A). Mice immunized i.m. produced more IgG2a than IgG1 (IgG2a/IgG1 ratio = 4), whereas those immunized i.n. had approximately equal levels of IgG2a and IgG1, with a ratio of 1.4. Analysis of P97c-specific IgG isotypes in BALs also revealed that IgG1 and IgG2a were predominantly induced

TABLE 2. ELISA for P97c-specific antibody responses of BALB/c mice immunized with rAdP97c^a

Group	Mean $OD_{405} \pm SD$ (P)					
	Serum			BAL		
	IgG on:		IgA on day 60	IgG on day 60		IgA on day 60
Day 14	Day 30	Day 60				
rAdGFP i.n.	0.068 ± 0.003	0.071 ± 0.0049	0.066 ± 0.0063	0.075 ± 0.009	0.087 ± 0.009	0.071 ± 0.002
rAdGFP i.m.	0.065 ± 0.002	0.071 ± 0.0063	0.058 ± 0.0014	0.058 ± 0.0014	0.081 ± 0.015	0.067 ± 0.001
rAdP97c i.n.	0.249 ± 0.003 (0.008)*	0.36 ± 0.029 (0.026)*	0.668 ± 0.046 (0.019)*	0.106 ± 0.018 (0.054)	0.781 ± 0.028 (0.012)*	0.378 ± 0.037 (0.029)*
rAdP97c i.m.	0.231 ± 0.005 (0.004)*	0.487 ± 0.022 (0.0084)*	1.138 ± 0.108 (0.0229)*	0.106 ± 0.018 (0.054)	0.587 ± 0.012 (0.01)*	0.096 ± 0.022 (0.154)

^a Groups of five mice were immunized with rAdP9c or rAdGFP (negative control) by the i.n. or i.m. route. Samples were collected at days 14, 30, and 60 and pooled by group. Sera were diluted 1:200 and BALs 1:50 and then analyzed for P97c-specific antibodies by ELISA in duplicate. *, significant difference ($P < 0.05$) compared with rAdGFP groups.

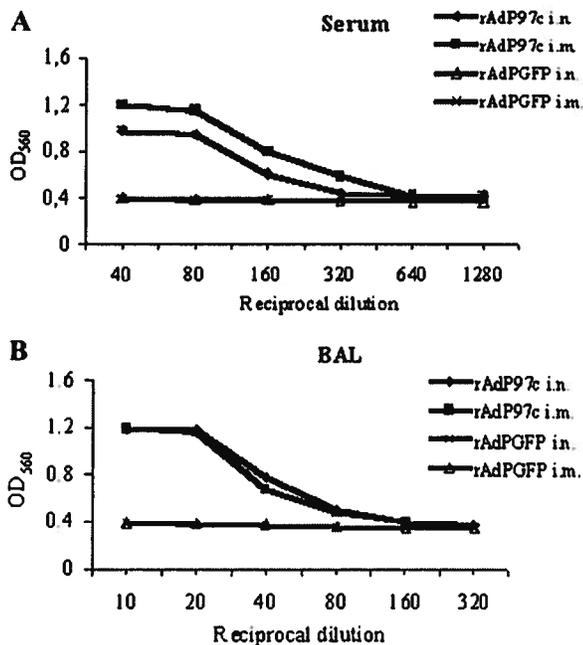


FIG. 6. Growth inhibition of *M. hyopneumoniae*. Mycoplasma cells were cultured in the presence of serial dilutions of sera (A) or BALs (B) from mice immunized with rAdP97c or with negative control rAdGFP. The growth inhibition was determined by measuring the OD₅₆₀. The results are means of triplicate experiments \pm standard deviations.

(Fig. 5B). Both i.n. and i.m. inoculation of rAdP97c generated profiles similar to those observed in the sera. These results suggest that the Th-type response to P97c stimulated in mice by rAdP97c is modulated by the route of immunization. Immunization by the i.m. route seems to favor a Th1-type response against P97c, while the i.n. route induces rather a mixed Th1/Th2-type response in both systemic and mucosal compartments.

Growth inhibition of *M. hyopneumoniae*. We examined whether P97c-specific antibodies induced by rAdP97c were capable of interfering with the growth of *M. hyopneumoniae*. The growth of *M. hyopneumoniae* can be monitored in vitro by the color and OD change of the indicator (phenol red) in the growth medium (5, 44). As the mycoplasma cells grow, the red color of phenol red gradually turns yellow, resulting in a decrease in the OD. We performed growth inhibition assays by incubation of *M. hyopneumoniae* cells in the presence of medium without antibodies (as a negative control) or with serial dilutions of sera or BALs of immunized mice collected at day 60 p.i. The OD decreased from 1.22 (at day zero) to 0.4 (after 3 days of incubation) as *M. hyopneumoniae* cells grew in the culture medium without antibodies, indicating cell growth during the incubation period (data not shown). In contrast, in the presence of sera of mice immunized (i.n. and i.m.) with rAdP97c, the inhibitory effect was observed. The best inhibition was obtained with dilutions of 1:40 and 1:80 (Fig. 6A). BALs of mice inoculated (i.n. and i.m.) with rAdP97c also exhibited inhibitory activity, and the best inhibition was achieved with dilutions ranging from 1:10 to 1:40 (Fig. 6B). As expected, the growth of cells was not affected by the samples

from mice immunized (i.n. and i.m.) with rAdGFP. The results indicate that the growth of *M. hyopneumoniae* was inhibited by P97c-specific antibodies in the sera and BALs and that the inhibitory effect was concentration dependent.

DISCUSSION

The most effective strategy to prevent diseases caused by bacteria may be to block interactions between microbial adhesins and their host cell receptors. Many studies have demonstrated the efficiency of adhesin-based vaccines in blocking attachment in vitro, as well as in vivo (42). As a more successful example, vaccination with the FimH adhesin of uropathogenic *E. coli* reduced in vivo colonization of the bladder mucosa by the pathogen up to 99% in the murine cystitis model (20). However, pure adhesins generally elicit poor immune responses and need to be administered together with an immunostimulative carrier molecule or vector (6, 42). The initial event in *M. hyopneumoniae* pathogenesis is its adherence to the cilia of the respiratory tract epithelial cells (46), which is mediated by specific regions of adhesins, such as the R1 motif located in the C-terminal portion of P97 (15, 24). Therefore, vaccines inducing immune responses to the R1 region could prevent colonization of pigs by the microorganism. Replication-defective rAds display a natural tropism for the respiratory epithelial cells and are known to be efficient in eliciting both humoral and cellular immunity to the expressed antigens (36).

In the present study, a rAd vector carrying the C-terminal portion of the P97 adhesin (rAdP97c) was constructed and evaluated for its potential to induce P97c-specific immune responses in mice. First, we demonstrated that the P97c protein was sufficiently expressed in vitro in cells infected with rAdP97c and could be detected by immunoblotting. To our knowledge, this is the first report of the construction of a rAd expressing a mycoplasma antigen. P97c-specific immune responses induced by rAdP97c were examined in BALB/c mice. We found that when inoculated by either the i.n. or i.m. route, rAdP97c stimulated the production of systemic and mucosal antibodies to P97c, likely directed to the fragment containing the R1 repeat region. Significant P97c-specific IgG responses were induced after a single inoculation and were considerably enhanced by a booster immunization. Interestingly, inoculation of rAdP97c by the i.n. route (the natural route of *M. hyopneumoniae* infection) elicited a suitable mucosal immune response, as evidenced by the presence of P97c-specific IgA in BALs. IgA is produced primarily by plasma cells in the mucosa and is actively secreted, whereas IgG can appear in mucosal secretions as a transudate from serum (2). Passive diffusion could account for a portion of IgG detected in BALs after i.m. inoculation. Our results are in agreement with previous studies showing that mucosal immunization with rAd results in both local and systemic immune responses, while parenteral immunization preferentially induces a systemic immune response (21, 43).

The rAdP97c-induced antisera and BALs were shown to be able to inhibit the growth of *M. hyopneumoniae* cells. The inhibition activity was likely related to the presence of IgG, since despite their IgA levels, BALs from i.n.-immunized mice did not demonstrate a higher inhibition than those from mice

immunized by the i.m. route (Fig. 6A). In addition, the inhibition effects of samples were proportional to their IgG titers. The mechanism by which antibodies inhibit the growth of *M. hyopneumoniae* remains unknown, and thus, we cannot rule out the possibility that P97c-specific IgA could interfere with the pathogen in vivo and specifically during the adherence process.

Conceicao et al. (6) have shown that immunization of mice with pure recombinant R1 of P97 adhesin did not induce specific systemic and mucosal antibodies to R1. In contrast, immunization with the R1 region fused to the B subunit of the heat-labile enterotoxin B subunit of *E. coli* (rLTBR1) produced high levels of specific antibody and cellular responses. Other systems have been developed in which the R1 region is expressed by an attenuated strain of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *aroA* (4) or *E. rhusiopathiae* YS-19 (32). Mice immunized with these vectors failed to elicit a humoral immune response to the antigen, indicating that these live strategies are less effective than rAdP97c for the induction of antibody responses against the P97 adhesin. Our results also demonstrate that rAdP97c displays the ability to enhance the immunogenicity of the R1 antigen.

The induction of P97c-specific antibodies in BALs could be important, since local IgA can prevent attachment of mycoplasmas to the ciliated epithelium and IgG can participate in opsonization and phagocytosis (31, 40). However, the relationship between locally secreted antibody responses and protection against mycoplasma infections is still controversial. In humans, *Mycoplasma pulmonis*-specific IgA responses have been found to correlate better with protection than serum (33). Similarly, Avikan and Ley (1) found a positive correlation between *Mycoplasma gallisepticum*-specific IgA levels in tracheal secretions and decreased lesions caused by the microorganism. In contrast, Djordjevic et al. (8) reported that locally secreted antibodies appeared to play a limited role in recovery from *M. hyopneumoniae* infection, since the pathogen can survive despite vigorous local antibody responses in the host.

It is suggested that an effective immunity against *M. hyopneumoniae* requires humoral and cell-mediated immune responses (14, 37). Both immune responses are driven by activation of CD4⁺ Th cells. Differentiation of naive CD4⁺ Th cells into Th1 and Th2 cells determines whether humoral or cell-mediated immunity will be predominant (13, 34). CD4⁺ Th1 cells are involved in the cell-mediated immune response and activate B cells to produce opsonizing antibodies, such as IgG2a, whereas CD4⁺ Th2 cells favor humoral immunity and secretion of IgG1 and IgA. Here, we have demonstrated that rAdP97c is capable of inducing both Th1 and Th 2 responses to P97c, as evidenced by the presence of IgG2a and IgG1 in sera and BALs of immunized mice. After i.m. immunization of mice with rAdP97c, there is a clear predominance of P97c-specific IgG2a in sera and BALs, suggesting a Th1-biased immune response. Of note, i.n. inoculation stimulated a mixed Th1/Th2-type response in both systemic and mucosal compartments. However, many factors, such as the vector, the delivery route, and the antigen, may modulate immune responses (13, 39).

In summary, the data presented in this study demonstrate that vaccination of mice with rAdP97c leads to the elicitation of both systemic immune responses to the encoded antigen, suggesting

that this strategy may represent a new approach to the design of vaccines against *M. hyopneumoniae*. However, the immune response of mice should not be extrapolated, and the effectiveness of rAdP97c for the control of PEP requires further studies in pigs.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Conseil de Recherches en Pêche et Agroalimentaire du Québec (grant 4600).

We thank Veronika Von Messling for critical review of the manuscript.

REFERENCES

- Avikan, A. L., and D. H. Ley. 1993. Protective immune response to *Mycoplasma gallisepticum* demonstrated in respiratory-tract washings from *M. gallisepticum*-infected chickens. *Avian Dis.* 37:697-705.
- Brandtzaeg, P., and I. N. Farstad. 1998. The human mucosal B-cell system, p. 439-468. In J. Mestecky, P. L. Ogra, and P. Bland (ed.), *Mucosal immunology*, 2nd ed. Academic Press, San Diego, CA.
- Caron, J., N. Sawyer, B. Ben Abdel Moumen, K. Cheikh Saad Bouh, and S. Dea. 2000. Species-specific monoclonal antibodies to *Escherichia coli*-expressed p36 cytosolic protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7:528-535.
- Chen, A. Y., S. R. Fry, J. Forbes-Faulkner, G. Daggard, and T. K. Mukkur. 2006. Evaluation of the immunogenicity of the P97R1 adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae* as a mucosal vaccine in mice. *J. Med. Microbiol.* 55:923-929.
- Chen, Y. L., S. N. Wang, W. J. Yang, Y. J. Chen, H. H. Lin, and D. Shiuan. 2003. Expression and immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* heat shock protein antigen P42 by DNA vaccination. *Infect. Immun.* 71:1155-1160.
- Conceicao, F. R., A. N. Moreira, and O. A. Dellagostin. 2006. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. *Vaccine* 24:5734-5743.
- DeBey, M. C., and R. F. Ross. 1994. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infect. Immun.* 62:5312-5318.
- Djordjevic, S. P., G. J. Eamens, L. F. Romalis, P. J. Nicholls, V. Taylor, and 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.
- Djordjevic, S. P., S. J. Cordwell, M. A. Djordjevic, J. Wilton, and F. C. Minion. 2004. Proteolytic processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin. *Infect. Immun.* 72:2791-2802.
- Elahi, S. M., W. Oualikene, L. Naghi, M. O'Connor-McCourt, and B. Massie. 2002. Adenovirus-based libraries: efficient generation of recombinant adenoviruses by positive selection with the adenovirus protease. *Gene Ther.* 18:1238-1240.
- Ferreira, T. B., P. M. Alves, J. G. Aunins, and M. J. Carrondo. 2005. Use of adeno-viral vectors as veterinary vaccines. *Gene Ther.* 12:73-83.
- Friis, N. F. 1973. The pathogenicity of *Mycoplasma flocculare*. *Acta Vet. Scand.* 14:344-346.
- Haddad, D., S. Liljeqvist, S. Stahl, P. Perlmann, K. Berzins, and N. Ahlborg. 1998. Differential induction of immunoglobulin G subclasses by immunization with DNA vectors containing or lacking a signal sequence. *Immunol. Lett.* 61:201-204.
- Haesebrouck, F., F. Pasmans, K. Chiers, D. Maes, R. Ducatelle, and A. Decostere. 2004. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? *Vet. Microbiol.* 100:255-268.
- Hsu, T., and F. C. Minion. 1998. Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. *Infect. Immun.* 66:4762-4766.
- Jenkins, C., J. L. Wilton, F. C. Minion, L. Falconer, M. J. Walker, and S. P. Djordjevic. 2006. Two domains within the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin bind heparin. *Infect. Immun.* 74:481-487.
- 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.
- King, K. W., D. H. Faulds, E. L. Rosey, and 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.
- Kobisch, M., and N. F. Friis. 1996. Swine mycoplasmoses. *Res. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 15:1569-1605.
- Langermann, S., S. Palaszynski, M. Barnhart, G. Auguste, J. S. Pinkner, J. Burlein, P. Barren, S. Koenig, S. Leath, C. H. Jones, and S. J. Hultgren. 1997. Prevention of mucosal *Escherichia coli* infection by FimH-based systemic vaccination. *Science* 276:607-611.

21. Lemiale, F., W. P. Kong, L. M. Akyurek, X. Ling, Y. Huang, B. K. Chakrabarti, M. Eckhaus, and G. J. Nabel. 2003. Enhanced mucosal immunoglobulin A response of intranasal adenoviral vector human immunodeficiency virus vaccine and localization in the central nervous system. *J. Virol.* 77:10078–10087.
22. Lorenzo, H., O. Quesada, P. Assuncao, A. Castro, and F. Rodriguez. 2006. Cytokine expression in porcine lungs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 109:199–207.
23. Meens, J., M. Selke, and G. F. Gerlach. 2006. Identification and immunological characterization of conserved *Mycoplasma hyopneumoniae* lipoproteins Mhp378 and Mhp651. *Vet. Microbiol.* 25:85–95.
24. Minion, F. C., C. Adams, and T. Hsu. 2000. R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. *Infect. Immun.* 68:3056–3060.
25. Neutra, M. R., and P. A. Kozlowski. 2006. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat. Rev. Immunol.* 6:148–158.
26. Okada, M., T. Asai, M. Ono, T. Sakano, and 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.
27. Reddehase, M. J., F. Weiland, K. Munch, S. Jonjic, A. Luske, and U. H. Koszinowski. 1985. Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *J. Virol.* 55:264–273.
28. Romieu-Mourez, R., M. Solis, A. Nardin, D. Goubau, V. Baron-Bodo, R. Lin, B. Massie, M. Salcedo, and J. Hiscott. 2006. Distinct roles for IFN regulatory factor (IRF)-3 and IRF-7 in the activation of antitumor properties of human macrophages. *Cancer Res.* 66:10576–10585.
29. Ross, R. F. 1992. Mycoplasmal diseases, p. 537–551. In A. D. Leman, B. Straw, W. Mengeling, S. D'Allaire, and D. Taylor (ed.), *Diseases of swine*, 7th ed. Iowa State University Press, Ames.
30. Sarradell, J., M. Andrada, A. S. Ramirez, A. Fernandez, J. C. Gomez-Villamandos, A. Jover, H. Lorenzo, P. Herraez, and F. Rodriguez. 2003. A morphologic and immunohistochemical study of the bronchus-associated lymphoid tissue of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Pathol.* 40:395–404.
31. Sheldrake, R. F., L. F. Romalis, and 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.
32. Shimoji, Y., E. Oishi, Y. Muneta, H. Nosaka, and 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.
33. Simecka, J. W. 2005. Immune responses following mycoplasma infection, p. 485–534. In A. Blanchard and G. Browning (ed.), *Mycoplasma: molecular biology, pathogenicity and strategies for control*. CRC Press, Oxford, United Kingdom.
34. Stevens, T. L., A. Bossie, V. M. Sanders, R. Fernandez-Botran, R. L. Coffman, T. R. Mosmann, and E. S. Vitetta. 1988. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* 334: 255–258.
35. Strasser, M., J. Frey, G. Bestetti, M. Kobisch, and 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.
36. Talsis, N., and H. C. Ertl. 2004. Adenovirus as vectors. *Mol. Ther.* 10:616–629.
37. Thacker, E. L., B. J. Thacker, M. Kuhn, P. A. Hawkins, and W. R. Waters. 2000. 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.
38. 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.* 37:620–627.
39. Vercammen, M., T. Scorza, K. Huygen, J. De Braekeleer, R. Diet, D. Jacobs, E. Saman, and H. Verscheren. 2000. DNA vaccination with genes encoding *Taroplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. *Infect. Immun.* 68:38–45.
40. Walker, J., R. Lee, N. Mathy, S. Doughty, and J. Conlon. 1996. Restricted B-cell responses to microbial challenge of the respiratory tract. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 54:197–204.
41. Wilton, J. L., A. L. Scarman, M. J. Walker, and S. P. Djordjevic. 1998. Reiterated repeat region variability in the ciliary adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Microbiology* 144:1931–1943.
42. Wizemann, T. M., J. E. Adamou, and S. Langermann. 1999. Adhesins as targets for vaccine development. *Emerg. Infect. Dis.* 5:395–403.
43. Xiang, Z., Y. Li, G. Gao, J. M. Wilson, and H. C. Ertl. 2003. Mucosally delivered E1-deleted adenoviral vaccine carriers induce transgene product-specific antibody responses in neonatal mice. *J. Immunol.* 171:4287–4293.
44. Yang, W. F., J. F. Lai, K. C. Peng, H. J. Chiang, C. N. Weng, and D. Shiuan. 2005. Epitope mapping of *Mycoplasma hyopneumoniae* using phage displayed peptide libraries and the immune responses of the selected phagotopes. *J. Immunol. Methods.* 304:15–29.
45. Zhang, Q., T. F. Young, and R. F. Ross. 1995. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. *Infect. Immun.* 63:1013–1019.
46. Zielinski, G. C., and R. F. Ross. 1993. Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine ciliated respiratory tract cells. *Am. J. Vet. Res.* 54:1262–1269.

- ANNEXE B -

« Publication dans un résumé de congrès »

Protection induced by a recombinant replication-defective adenovirus vaccine expressing the P97 protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* in challenged pigs: Comparison to Suvaxyn[®] MH-one vaccine

F. R. Okamba¹; M. Arella¹; N. Music²; J.J. Jia²; B. Massie³; C.A. Gagnon²

¹INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, Canada;

²Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP), Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada;

³Biotechnology Research Institute, National Research Council, Montreal, Québec, Canada

Introduction

Mycoplasma hyopneumoniae is the causative agent of enzootic pneumonia in pigs, a chronic respiratory disease that causes major economic losses to the pig industry worldwide. The disease is characterized by chronic non-productive cough, retarded growth rate, and inefficient food conversion. Vaccination against *M. hyopneumoniae* is an important prophylactic approach used to control mycoplasma pneumonia in pigs. The commonly used vaccines consist of inactivated whole cells, such as Suvaxyn[®] MH-one. Although numerous studies report that these vaccines are protective against experimental challenge, vaccination failure in production settings is also documented.¹ Adherence to epithelial cells of the respiratory tract of swine is crucial in the pathogenesis of *M. hyopneumoniae* and the surface protein called P97, particularly its C-terminal portion, is implicated.²⁻¹² Therefore, this protein could represent an attractive target to develop effective vaccines against *M. hyopneumoniae*. Replication-defective recombinant adenoviruses (rAd) are extensively used as antigen delivery vehicles and are known to induce both humoral and cellular protective immune responses against several diseases.⁸ In addition, as live vectors; rAd can be administered by mucosal route to stimulate the mucosal immunity. The objective of this study was to compare the vaccination efficiency of a subunit vaccine based on rAd expressing the C-terminal portion of P97 adhesin of *M. hyopneumoniae* and the commercial vaccine (Suvaxyn[®] MH-one) following experimental infection of pigs with *M. hyopneumoniae*.

Materials and methods

Vaccines. The rAdP97c vector, a recombinant replicative-defective human adenovirus serotype 5 expressing the C-terminal portion of the P97 adhesin of *M. hyopneumoniae*, was constructed as previously described.⁴ The commercial vaccine, Suvaxyn[®] MH-one (Wyeth Animal Health, Guelph, Ontario, Canada), was used according to the manufacturer's recommendations.

Experimental animal challenge and design. Twenty-eight pigs aged from 18 to 21 days were obtained from a herd serologically negative for *M. hyopneumoniae*. Pigs were randomly assigned to four groups as summarized in Table 1. The experiment was conducted at the animal facility of the Canadian Food Inspection Agency (St-Hyacinthe, Québec, Canada) in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. The duration of the experiment was 56 days. Pigs were challenged at day 28 after the first vaccination with the 232 virulent strain of *M. hyopneumoniae*, obtained from Dr E. L. Thacker (College of Veterinary Medicine, Iowa State University, USA). Pigs were observed regularly for clinical signs. Animals were weighed biweekly to measure the average daily gain (ADG) which was determined as follows: (mean of weight at day 56 post-vaccination minus mean of weight at day 0 post-vaccination)/56. At necropsy, the percentage of macroscopic lung lesions was determined using the diagram described by Sorensen et al.⁷ At days 0, 14, 28, 42 and 56 post-vaccination, blood samples were collected for serological analysis and lymphocyte stimulation test. The bronchoalveolar lavage (BAL) fluids were collected at necropsy (day 56 post-vaccination).

Table 1: Experimental design and groups

Groups	Vaccination		Challenge
	day 0	day 14	day 28
Control (N = 5)	None	None	None
Non-vaccinated/ challenged (N = 5)	None	None	10 ⁶ CCU Intratracheal
Suvaxyn MH-one/ challenged (N = 8)	2 ml Intramuscular	None	10 ⁶ CCU Intratracheal
rAdP97c/ challenged (N = 10)	2 x 10 ¹⁰ TCID ₅₀ Intranasal	2 x 10 ¹⁰ TCID ₅₀ Intranasal	10 ⁶ CCU Intratracheal

CCU, Color Changing Unit.

TCID₅₀, the tissue culture infectious dose 50.

Note: All pigs were necropsied at four weeks post-challenge (at day 56 post-vaccination).

Serological analysis. The detection of anti-*M hyopneumoniae* specific antibodies in sera was achieved using a commercial ELISA kit (HerdChek *Mycoplasma hyopneumoniae* Antibody test kit, IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, Maine) according to the manufacturer's recommendations. Sample was considered seropositive if the sample/positive (S/P) ratio was > 0.3. For the detection of P97c-specific antibodies, ELISA plates were coated with the recombinant P97c (rP97c) produced in *Escherichia coli*. Sera were diluted 1:200 and the BAL fluids were not diluted. The specific antibody isotype (IgG or IgA) was determined using peroxidase-labelled heavy-chain specific goat anti-swine IgA or IgG (Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas). The experiment was done in duplicate or triplicate and the results were reported as optical density (OD) at 450 nm ± the standard deviation (SD).

Lymphocyte proliferation test. Blood samples were collected into sodium-heparinized tube (Monoject, Mansfield, MA, USA). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by differential centrifugation of diluted blood in PBS over Histopaque 1.077 density gradient (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada). The PBMCs were resuspended in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) containing 10% FBS, 2 mM L-glutamine, penicillin-streptomycin (100 U/ml and 100 µg/ml, respectively) and 50 µM β-mercaptoethanol. The PBMCs were dispensed into each well of a flat-bottomed 96-well microplate and incubated in presence of P97c or total proteins of *M hyopneumoniae* 232 strain cell lysate. The PBMCs stimulated with Concanavalin A (ConA) were included as positive controls. After incubation for

three days, the lymphocyte proliferative response was measured using the 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) kit (Exalpha Biologicals, Inc., MA). The results were expressed as a stimulation index ± SD, which was calculated by dividing the OD 450 nm of stimulated cultures divided by those in non stimulated cultures.

Statistical analysis. Tukey's test for one-way ANOVA was used to determine differences among experimental groups. If the *P* value generated by ANOVA was < 0.05, difference between groups was considered to be significant.

Results

Animal health and clinical signs. No sign of coughing was observed in control group during the experiment. However, coughing was observed in all challenged groups from week 1 post-challenge to the end of the experiment (data not shown). At the end of experiment, the mean of ADG in the control group was 830 ± 37 g/day and was not significantly different (*P* > 0.05) from ADG Suvaxyn[®] MH-one group (743 ± 88 g/day). On the opposite, the mean ADG in non vaccinated/challenged group (586 ± 10.4 g/days) and in rAdP97c/challenged group (627 ± 6.8 g/day) were significantly lower compared to the control and Suvaxyn[®] MH-one groups (*P* < 0.01). These results demonstrate that the Suvaxyn[®] MH-one vaccine is more efficient than the rAdP97c vaccine in preventing the reduction of growth caused by *M hyopneumoniae* infection. As shown in Figure 1, control pigs had no macroscopic lung lesions, while all pigs in the non vaccinated/challenged group had macroscopic

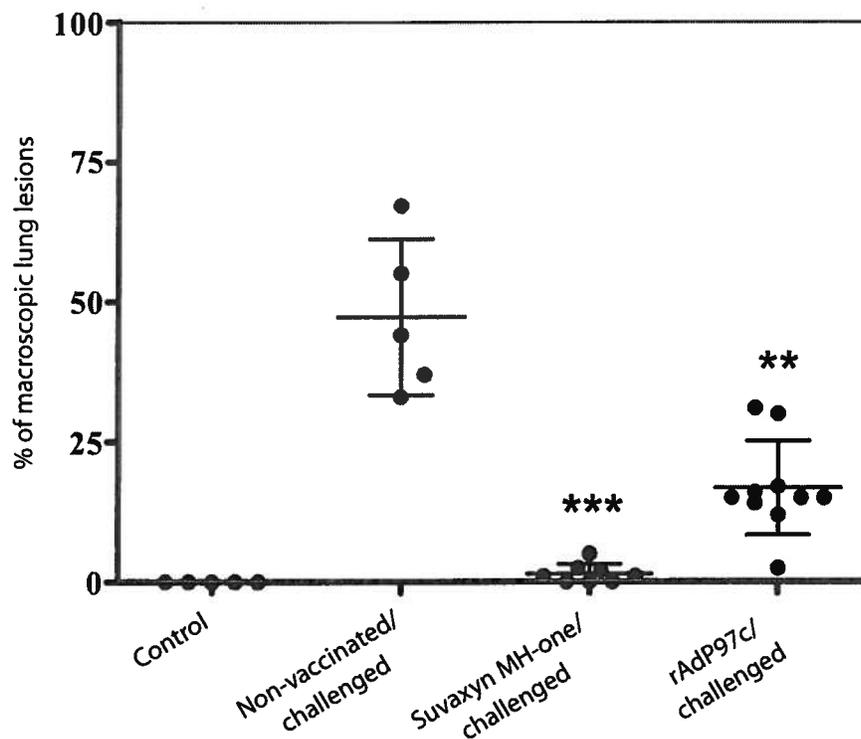
lung from 33% to 67% (mean of 47.2%) All pigs in the rAdP97c/challenged group also had macroscopic lung lesions (2,5%-31%) but the mean (16%) was significantly lower ($P < 0.001$) compared to non vaccinated group. In the Suvaxyn[®] MH-one /challenged group the percentages of lung lesions were significantly lower, ranging from 0% to 5% with a mean of only 1,4% (Figure 1). Furthermore, we have observed that the Suvaxyn[®] MH-one vaccinated animals had a significant reduction of microscopic lung lesions compared to rAdP97c vaccinated and non-vaccinated animals (data not shown).

Serological responses. All animals were seronegatives for *M hyopneumoniae* at the prevaccination bleeding (day 0) (Table 2). Animals in the control group remained seronegatives over the course of the experiment. The amount of anti-*M hyopneumoniae* antibodies in the non-vaccinated/challenged animals was significant only four weeks after infection (day 56 post-vaccination) indicating that the seroconversion after *M hyopneumoniae* infection is progressive. In the Suvaxyn[®] MH-one /challenged group, 2/8 animals had the S/P ratio > 3 at day 14 post-vaccination. At day 28 post-vaccination 5/8 animals were found positive (mean S/P

ratio of 0.455 ± 0.164) and the level of the response had increased after the challenge and decreased at day 56 post-vaccination. All animals in the rAdP97c/challenged group were negatives by HerdChek ELISA over the course of the experiment. However, with a P97c specific ELISA, an antibody response was detected in the sera of rAdP97c-vaccinated pigs as early as day 14 post-vaccination. This response was significantly enhanced 2 weeks after the challenge and declined at day 56 post-vaccination (Figure 2). By contrast, only a small response against the P97c antigen was detected at 42 days post-vaccination in the sera of animals vaccinated with Suvaxyn[®] MH-one and at 56 days in non-vaccinated/challenged animals. In BAL fluids (Figure 3), a significant level of P97 specific IgG and IgA was found in both vaccinated groups as well as in the non vaccinated/challenged group ($P < 0.001$, compared to control group) with a higher amount being detected in rAdP97c vaccinated animals.

Lymphocyte proliferation. No lymphocyte proliferative response against the P97c protein or against the *M hyopneumoniae* cell lysate was detected in the control and non vaccinated/challenged groups over the course

Figure 1: Percentage of macroscopic lung lesions



Significant difference compared to control group (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)

Table 2: ELISA HerdChek anti-*Mycoplasma hyopneumoniae* antibodies in serum

Groups	Ratio S/P ± SD (number of positive pigs per group)				
	day 0	day 14	day 28	day 42	day 56
Control (N = 5)	0.013 ± 0.015 (0/5)	0.026 ± 0.057 (0/5)	0.042 ± 0.027 (0/5)	-0.044 ± 0.021 (0/5)	0.062 ± 0.014 (0/5)
Non-vaccinated/ challenged (N = 5)	0.028 ± 0.025 (0/5)	0.028 ± 0.024 (0/5)	0.022 ± 0.019 (0/5)	0.194 ± 0.083 (0/5)	0.36 ± 0.182 (3/5)
SuvaxynMH-one/ challenged (N = 8)	0.029 ± 0.024 (0/8)	0.24 ± 0.019 (2/8)	0.455 ± 0.164 (5/8)	1.3 ± 0.426 (8/8)	0.75 ± 0.501 (8/8)
rAdP97c/challenged (N = 10)	0.026 ± 0.013 (0/10)	0.044 ± 0.104 (0/10)	0.055 ± 0.085 (0/10)	0.154 ± 0.094 (0/10)	0.096 ± 0.084 (0/10)

of the experiment. By contrast, the PBMCs from animals vaccinated with rAdP97c proliferated upon stimulation with the P97c protein but not with *M hyopneumoniae* cell lysate (Figure 4A and B). On the contrary, the PBMCs from Suvaxyn[®] MH-one-vaccinated animals proliferated in response to *M hyopneumoniae* cell lysate but not against the P97c protein (Figure 4A and B). In both vaccinated groups, the maximum level of PBMC cells proliferation response was observed at day 28 post-vaccination. However after challenge the PBMC cells proliferation response dropped progressively suggesting that *M hyopneumoniae* has an immunosuppressive effect in infected animals. This immunosuppressive effect was clearly demonstrated when the PBMCs from all challenged groups were stimulated with ConA while the response remained high with the PBMC cells from non-infected animals (Figure 4C).

Discussion

The most effective strategy to prevent diseases caused by bacteria may be to block interactions between adhesins and their receptors.¹¹ In this report, we have examined whether vaccination of pigs using the P97 adhesin protein of *M hyopneumoniae* vectorized by an adenovirus (rAdP97c) may represent an efficient approach in the control of *M hyopneumoniae* infection. The efficacy of this strategy was evaluated following vaccination by the intranasal route and compared to the commercial vaccine Suvaxyn[®] MH-one. The mechanisms of immune protection against *M hyopneumoniae* are not fully understood. However, it is believed that both cellular and humoral immune responses, preferentially in the respiratory tract, are needed.⁶⁻⁹ Interestingly, we have shown that the vaccination of pigs with the rAdP97c vector resulted in the induction of specific mucosal, systemic and humoral and cellular immune responses against the P97c. As expected, our results have also demonstrated that Suvaxyn[®] MH-one induced both humoral and cellular immune responses. However, the immune response in Suvaxyn[®] MH-one vaccinated animals was negative or very low when the P97c antigen was used in the analysis (Figures 2, 3 and 4A). This observation is not surprising because the existence of bacterins that does not contain a detectable amount of P97 antigen has been reported.¹⁰ According to other studies,³ we have observed a substantial decrease of the immune responses following *M hyopneumoniae* infection. The mechanisms by which *M hyopneumoniae* 232 downregulates immune responses are unknown but this could be due to the reduction of antigen-presenting cells such as macrophages. Indeed, it has been reported

Figure 2: Anti-P97c IgG antibodies level in serum

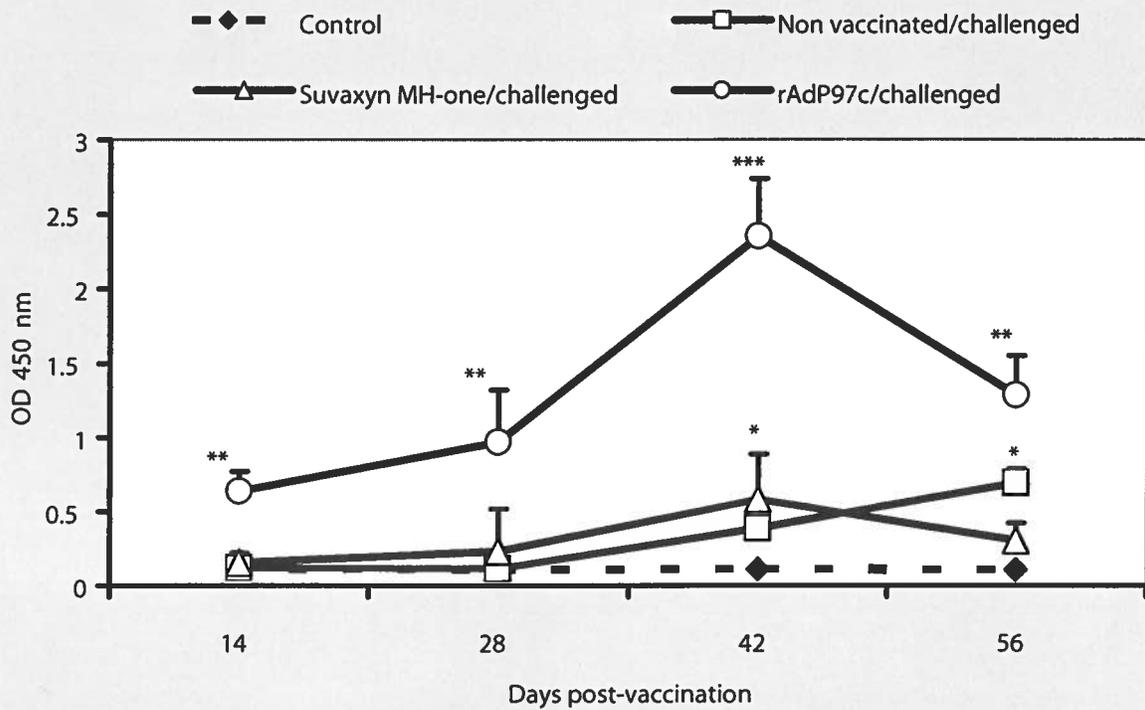
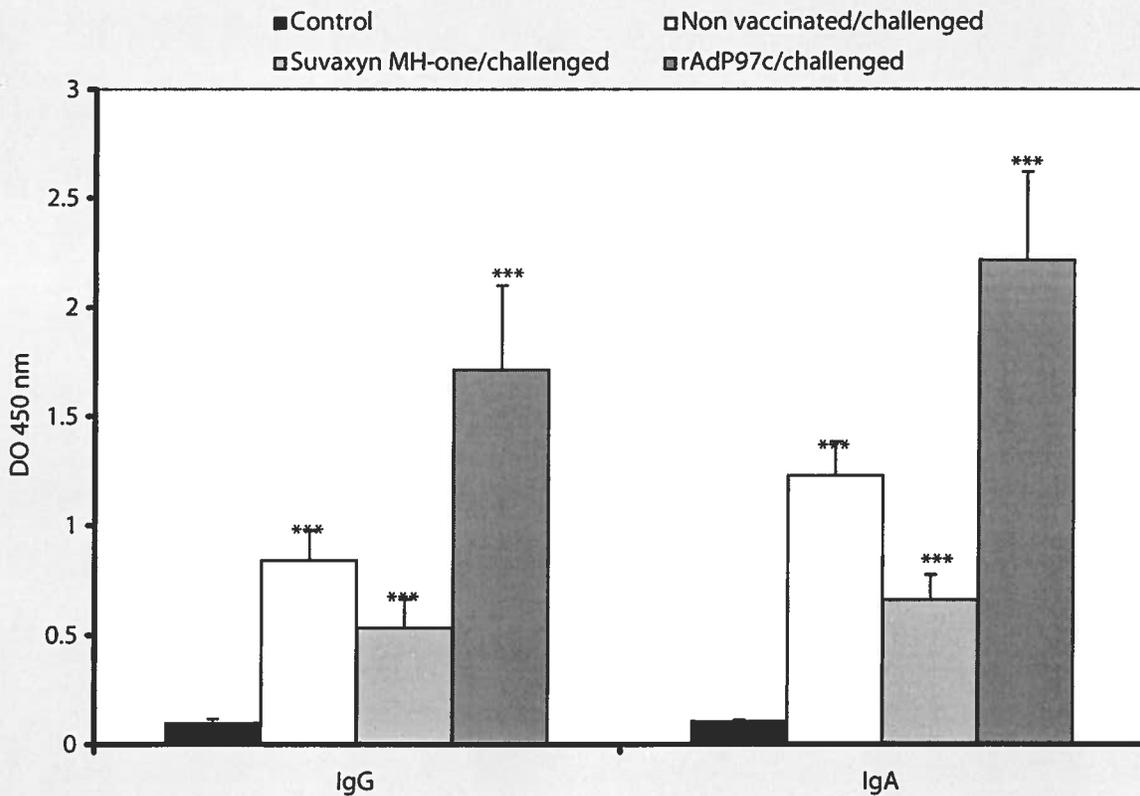


Figure 3: Anti-P97c IgG and IgA antibodies level in the bronchoalveolar lavage fluids



Significant difference compared to control group (***) $P < 0.001$

Figure 4: Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) proliferation response

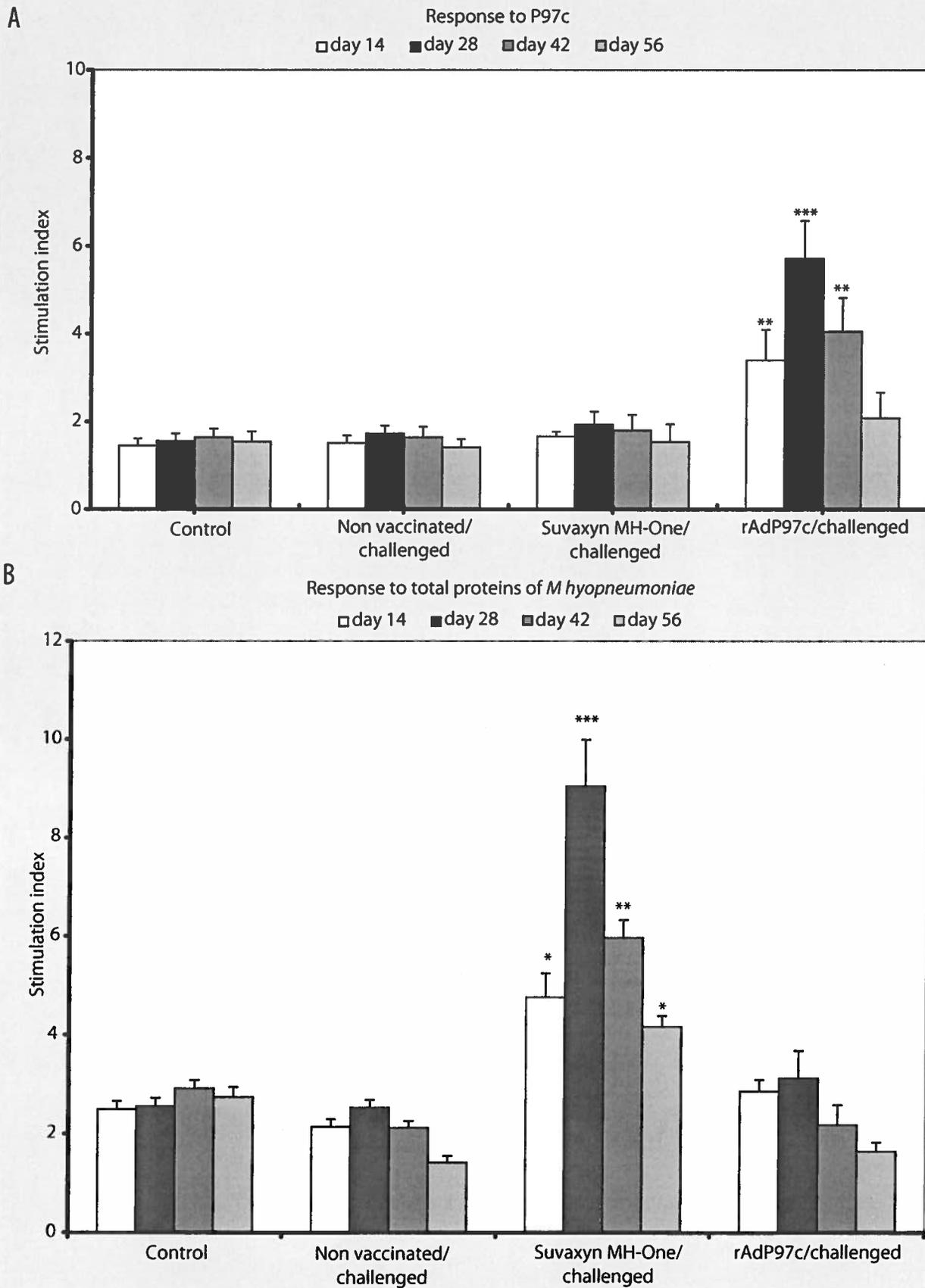
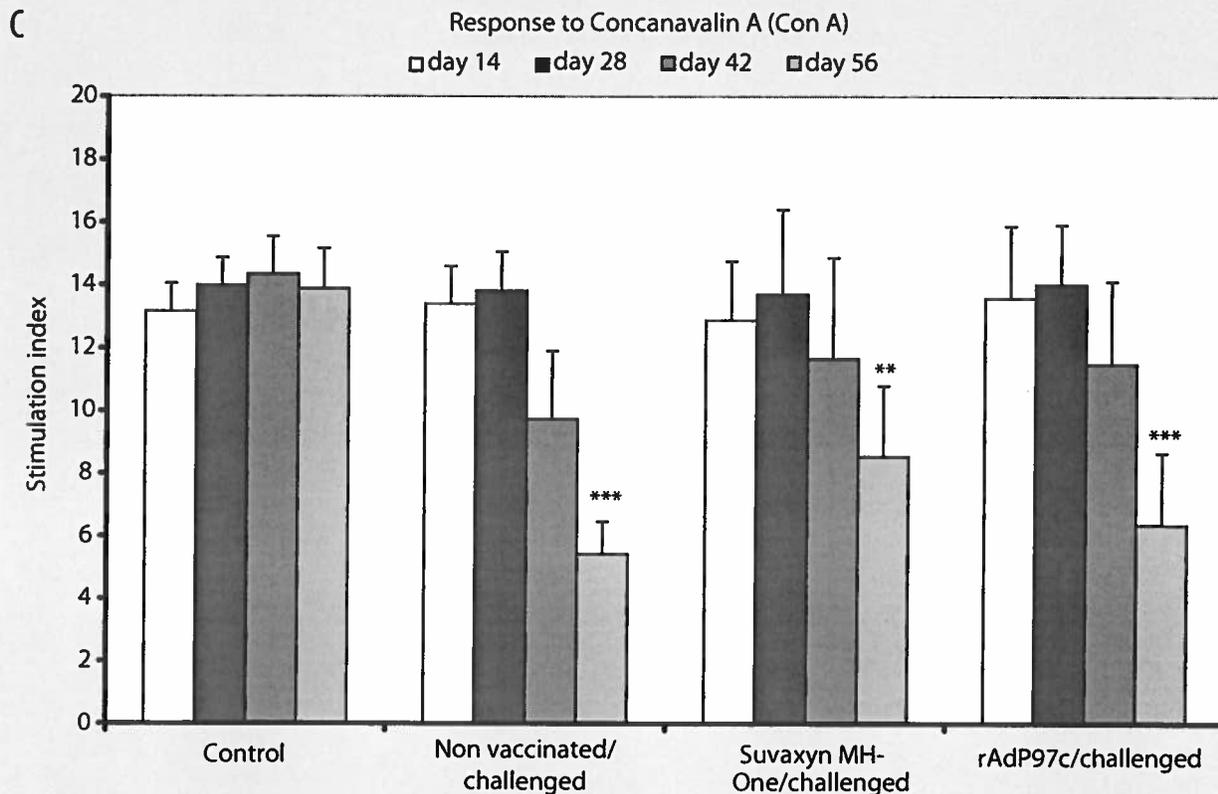


Figure 4 continued:



PBMCs stimulated with the P97c protein, *M hyopneumoniae* cell lysate and Concanavalin A (ConA) in panel A, B and C, respectively.

that *M hyopneumoniae* infection substantially reduces the number of lymphocytes.⁵ In this study, we have observed a reduction of macrophages in BAL fluids of pigs infected by the pathogen (data not shown).

Despite the fact that the vaccination with the rAdP97c vector induced the desired immune responses to P97c, it did not confer an efficient protection such as the Suvaxyn[®] MH-one against *M hyopneumoniae* challenge. Contrary to this commercial vaccine, the vaccination with rAdP97c did not significantly improve the growth performance (ADG) in challenged pigs. In addition, although the percentage of macroscopic lung lesions in the rAdP97c-vaccinated animals (16.7%) was significantly reduced compared to those of non vaccinated/challenged animals (47.2%), it was significantly higher compared to those of Suvaxyn[®] MH-one -vaccinated/challenged animals (1.4%). In conclusion, these results indicate that the vaccination with the P97 antigen only induces a partial protection effect and therefore, other antigens should also be considered and included in rAd vaccine vector for the development of an efficient sub-

unit vaccine against the enzootic pneumonia caused by *M hyopneumoniae*.

Acknowledgements

We are grateful to Dr E. L. Thacker (College of Veterinary Medicine, Iowa State University, USA) for providing the *M hyopneumoniae* 232 strain. We are grateful to Dr Johanne Elsener (Wyeth Animal Health, Canada) for providing the Suvaxyn[®] MH-one vaccine. We thank Mrs Cynthia M. Guilbert for critically reviewing the manuscript. We thank Dr K. Cheikh Saad Bouh for providing the P97 gene; and Mrs Audrey Fortin for technical assistance. This study was supported by the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) and BioSolution Inc.

References

1. Haesebrouck, F., F. Pasmans, K. Chiers, D. Maes, R. Ducatelle, and A. Decostere. 2004. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? *Vet. Microbiol.* 100:255–268.
2. Minion, F. C., C. Adams, and T. Hsu. 2000. R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. *Infect Immun.* 68:3056–3060.

3. Muneta, Y, Y. Minagawa, Y. Shimoji Y, Y. Ogawa, H. Hikono, Y. Mori. 2008. Immune Response of Gnotobiotic Piglets against *Mycoplasma hyopneumoniae*. J Vet Med Sci. 70:1065–1070.
4. Okamba, F. R., E. Moreau, K. Cheikh Saad Bouh, C. A. Gagnon, B. Massie, M. Arella. 2007. Immune responses induced by replication-defective adenovirus expressing the C-terminal portion of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. Clin Vaccine Immunol. 14:767–774.
5. Sarradell, J., M. Andrada, A. S. Ramirez, A. Fernandez, J. C. Gomez-Villamandos, A. Jover, H. Lorenzo, P. Herraiz, and F. Rodriguez. 2003. A morphologic and immunohistochemical study of the bronchus-associated lymphoid tissue of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet Pathol 40:395–404.
6. Shimoji, Y., E. Oishi, Y. Muneta, H. Nosaka, and 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.
7. Sorensen, V., S. V. Jorsal, and J. Mousing. 2006. Diseases of the respiratory system. p. 149–177. In A. D. Leman, B. Straw, W. Mengeling, S. D’Allaire, and D. Taylor (ed.), Diseases of swine, 9th ed. Iowa State University Press, Ames.
8. Tatsis, N., and H. C. Ertl. 2004. Adenovirus as vectors. Mol. Ther. 10:616–629.
9. Thacker, E. L., B. J. Thacker, M. Kuhn, P. A. Hawkins, and W. R. Waters. 2000. 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.
10. Thacker, E. L., Thacker, B. J., Boettcher, T. B., and H. Jayappa. Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation, and protection induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. Swine Health Prod. 1998; 6:107–112.
11. Wizemann, T. M., J. E. Adamou, and S. Langermann. 1999. Adhesins as targets for vaccine development. Emerg Infect Dis. 5:395–403.
12. Zhang, Q., T. F. Young, and R. F. Ross. 1995. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. Infect Immun. 63:1013–1019



- ANNEXE C -

« Participations tions aux congrés »

1. **Okamba F. R.**, N. Music, J.J. Jia, M. Arella, C.A Gagnon (2009). Protective efficacy of vaccination against mycoplasmal pneumonia of swine using a replication-defective adenovirus as a vector. Canadian Swine Health Broad. Saskatoon, SK, Canada.
2. **Okamba F. R.**, E. Moreau, K. Cheikh Saad Bouh, C.A Gagnon, B. Massie and M. Arella (2008). Immune Responses Induced by Replication-Defective Adenovirus expressing the C-terminal portion of *Mycoplasma hyopneumoniae*-P97 Adhesin. 1st Annual Symposium of CRIP (Centre de recherche en infectiologie porcine). St-Hyacinthe, Quebec, Canada.
3. **Okamba F.R.**, E. Moreau M. Arella (2005). Adénovirus recombinant non répliquatif exprimant la P97 de *Mycoplasma hyopneumoniae*: une alternative vaccinale contre la pneumonie enzootique porcine. 7^{ème} congrès Armand-Frappier. Auberge du Lac-à-l'eau-claire, Québec, Canada.
4. **Okamba F.R.**, A. Kheyar, M. Arella, S. Dea (2005). Construction of a recombinant adenovirus expressing the P97 C-terminal portion of *Mycoplasma hyopneumoniae*; immunization of mice by intramuscular and intranasal routes. 55th Annual Conference of the Canadian Society of Microbiologists (CSM). Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canada, Abstract : B20.
5. **Okamba F.R.**, A. Kheyar, M. Arella. S. Dea (2004). Humoral and cellular immune responses after intramuscular and intranasal immunisation with the Replication-Defective Adenovirus Expressing the C-terminal portion of *Mycoplasma hyopneumoniae*-P97 Adhesin. 85th Conference of Research Workers in animal Diseases (CRWAD). Chicago, Illinois, USA, Abstract : 154.

