

2 m 11, 3377.6

Université de Montréal

Étude des interactions entre *Streptococcus suis* et des neutrophiles porcins

Par
Geneviève Chabot-Roy

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires
option microbiologie

Décembre 2005

Geneviève Chabot-Roy, 2005



SF
607
U54
2006
V. 012

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude des interactions entre *Streptococcus suis* et des neutrophiles porcins

Présenté par :
Geneviève Chabot-Roy

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Monique Doré
Présidente-rapporteuse

Marcelo Gottschalk
Directeur de recherche

Mariela Segura
Co directrice de recherche

Philip Willson
Co directeur de recherche

John M. Fairbrother
Membre du jury

RÉSUMÉ

Streptococcus suis sérotype 2 est un pathogène du porc important responsable de plusieurs maladies dont la méningite. Cette bactérie est aussi reconnue comme étant un agent de zoonoses. Les connaissances sur les facteurs de virulence et la pathogenèse de l'infection demeurent limitées. Le seul facteur de virulence reconnu est la capsule de polysaccharides qui a des propriétés antiphagocytaires. Les neutrophiles semblent jouer un rôle essentiel dans la pathogenèse de l'infection puisque des infiltrats de neutrophiles et de cellules mononucléaires sont fréquemment observés dans les lésions provoquées par la bactérie. De plus, la participation des neutrophiles dans l'immunité innée contre l'infection causée par *S. suis* apparaît comme étant une étape critique de la pathogenèse de la méningite. Peu d'informations sont disponibles sur les interactions entre *S. suis* et les neutrophiles. Le but de cette étude était donc d'étudier certaines interactions, soit la cytotoxicité, l'effet bactéricide et la phagocytose, entre *S. suis* sérotype 2 et des neutrophiles porcins. Les résultats ont montré que la suilysine est toxique pour les neutrophiles et pourrait aider *S. suis* à échapper à l'immunité innée. Aussi, la suilysine semble avoir un effet sur le complément, ce qui réduit l'opsonisation de *S. suis* et l'effet bactéricide par les neutrophiles. Nos résultats confirment que la capsule de *S. suis* protège la bactérie de la phagocytose et de l'effet bactéricide des neutrophiles. Nous démontrons que *S. suis* sérotype 2 doit être opsonisé par des IgG spécifiques pour être tué par les neutrophiles, suggérant qu'une réponse humorale pourrait aider à éliminer la bactérie.

Mots clés : *S. suis*, neutrophiles, cytotoxicité, effet bactéricide, phagocytose, capsule polysaccharidique, suilysine, anticorps, complément

SUMMARY

Streptococcus suis serotype 2 is an important swine pathogen responsible for diverse infections, including meningitis. This microorganism is also recognized as an important zoonotic agent. Virulence factors and the pathogenesis of infection are not well known. The only critical virulence factor described to date is the capsular polysaccharide, which confers antiphagocytic properties. Neutrophils seem to play an important role in the pathogenesis of the infection since infiltration by neutrophils and mononuclear cells is frequently observed in lesions caused by *S. suis*. Neutrophil participation to the innate immunity to *S. suis* infections may be a critical step in the pathogenesis of meningitis. To date, few data are available concerning *S. suis* interactions with neutrophils. The objective of this work was to study the interactions, such as cytotoxicity, bactericidal activity and phagocytosis, between *S. suis* serotype 2 and porcine neutrophils. Results showed that suilysin is toxic for neutrophils and this could help *S. suis* to evade the innate immunity. Moreover, suilysin seems to have an effect on complement, by decreasing the opsonisation of *S. suis* and the bactericidal effect of neutrophils. Our results confirm that the capsule polysaccharide protects *S. suis* against killing and phagocytosis by neutrophils. We showed that only the presence of specific IgG against *S. suis* serotype 2 promoted killing by neutrophils, indicating that the induction of a strong humoral response might enhance the clearance of this pathogen.

Key words: *S. suis*, neutrophils, cytotoxicity, bactericidal effect, phagocytosis, capsular polysaccharide, suilysin, antibodies, complement

TABLE DES MATIÈRES

Identification du jury	ii
Résumé	iii
Summary	iv
Table des matières	v
Liste des figures.....	vii
Liste des sigles et des abréviations.....	viii
Remerciements.....	x
I Introduction.....	1
II Recension de la littérature.....	5
1. <i>S. suis</i>.....	6
1.1 Aspect général de <i>S. suis</i>	6
1.2 Description et classification.....	6
1.3 Distribution géographique.....	7
1.4 Infection de <i>S. suis</i> et transmission.....	8
1.4.1 Chez le porc.....	8
1.4.2 Chez les humains.....	9
1.5 Facteurs de virulence de <i>S. suis</i>	11
1.5.1 Capsule de polysaccharides.....	11
1.5.2 Les protéines MRF et EF.....	12
1.5.3 Hémolysine (suilysine).....	13
1.5.4 Adhésines.....	14
1.5.4.1 Protéine liant les IgG.....	15
1.5.4.2 Protéine liant l'albumine.....	15
1.5.4.3 Protéine liant le fibrinogène et la fibronectine	16
1.5.4.4 Autres adhésines	16
1.5.5 Autres facteurs de virulence.....	17
1.6 Pathogénie de la méningite causée par <i>S. suis</i> sérotype 2.....	18
1.6.1 Voie d'entrée.....	19
1.6.2 Interactions de <i>S. suis</i> avec les cellules épithéliales.....	20
1.6.3 Interactions de <i>S. suis</i> avec les leucocytes.....	21
1.6.3.1 Phagocytose.....	22
1.6.3.2 Inflammation.....	23
1.6.4 Interactions de <i>S. suis</i> avec la BHM.....	24
2. Neutrophiles.....	25
2.1 Aspect général des neutrophiles.....	25

2.1.1	Description.....	25
2.1.2	Molécules chimioattractantes.....	26
2.1.3	Extravasation/ diapédèse.....	28
2.1.4	Granules des neutrophiles.....	29
2.2	Phagocytose par les neutrophiles.....	31
2.2.1	Phagocytose en général.....	31
2.2.1.1	Activation des mécanismes phagocytaires.....	31
2.2.1.2	Récepteurs impliqués dans la phagocytose	31
2.2.1.3	Internalisation et élimination des bactéries.....	32
2.2.1.4	Résistance à la phagocytose.....	33
2.2.2	Phagocytose des streptocoques.....	35
2.2.3	Étude de la phagocytose par les neutrophiles (méthodes).....	36
2.3	Neutrophiles et méningites.....	38
2.3.1	Rôle des neutrophiles dans les méningites en général.....	38
2.3.2	Rôle des neutrophiles dans les méningites causées par <i>S. suis</i>	39
III	Matériel, méthodes et résultats.....	40
	Article : Phagocytosis and killing of <i>Streptococcus suis</i> by porcine neutrophils.....	41
IV	Discussion.....	77
V	Conclusion.....	87
VI	Bibliographie.....	89

LISTE DES FIGURES

Figure. 1. (A) Kinetics of <i>S. suis</i> (10^8 CFU/ml) cytotoxicity for neutrophils. (B) Effect of <i>S. suis</i> concentration on cytotoxicity for neutrophils at 240 min.....	70
Figure. 2 Effect of serum and antibodies on the capacity of neutrophils to kill different <i>S. suis</i> strains after 90 min of incubation.....	71
Figure. 3. Effect of serum and antibodies on the capacity of differentiating monocytes to kill different <i>S. suis</i> strains after 180 min of incubation.....	72
Figure. 4. Effect of suliyisin on killing of <i>S. suis</i> by neutrophils after 90 min of incubation	73
Figure. 5. Effect of cytokines on killing of <i>S. suis</i> (strain 31533) by neutrophils after 90 min of incubation.....	74
Figure. 6. Phagocytosis of GFP ⁺ <i>S. suis</i> (pSL5.28) by neutrophils after 30 min exposure with 10^7 CFU/ml.....	75
Figure. 7. TEM micrographs showing phagocytosis of <i>S. suis</i> by neutrophils at a concentration of 10^7 CFU/ml after 30 min of incubation	76

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique
ARN : acide ribonucléique
 β H/C : β hémolysine/cytolysine
BHM : barrière hémato-méningée
BMEC : brain microvascular endothelial cells
BPI : protéines de perméabilité bactéricide
C : complément
CD : cluster of differentiation
CFU: colony-forming unit
CPS : capsule polysaccharidique
CR : complement receptor
CSF : cerebrospinal fluid
DPP IV : dipeptidyl peptidase IV
EF : extracellular factor
ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay
FACs: fluorescence activated cell sorter
FBPS : fibrinogen, fibronectin binding protein
Fc : fragment, crystalline
FITC : fluorescein isothiocyanate
FMLP : Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
Gal : galactose
GAS : group A *Streptococcus*
GBS : group B *Streptococcus*
G-CSF : granulocyte colony stimulating factors
GFP : green fluorescent protein
GM-CSF : granulocyte-monocyte colony stimulating factors
ICAM : intercellular adhesion molecule
IFN- γ : interféron gamma
Ig : immunoglobuline

IL : interleukine
IV: intraveineux
LDH: lactate déshydrogénase
LPS : lipopolysaccharide
MCP-1 : monocyte chemotactic protein-1
MPO : peroxyde myéloperoxydases
MRP : muramidase-released protein
NOS : nitric oxide synthase
OD: optical density
PAF : platelet-activating factor
PBS: phosphate buffered saline
PFGE : pulsed field gel electrophoresis
PGLYRP : protéines reconnaissant le peptidoglycane
PMN : polymorphonucléaires (neutrophiles)
PSGL-1 : P-selectin ligand glycoprotein-1
RAPD : random amplified polymorphic DNA
ROS : reactive oxygen intermediates
Sly: suilysine
SNC : système nerveux central
TEM: transmission electron microscopy
THB: Todd-Hewitt broth
TLR : toll-like receptor
TNF- α : tumor necrosis factor alpha

REMERCIEMENTS

J'aimerais exprimer ma reconnaissance et ma gratitude envers les personnes qui ont contribué à ce projet :

- 📄 Dr Marcelo Gottschalk, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir donné l'opportunité de poursuivre ce projet. Je le remercie pour sa confiance, ses connaissances, son soutien financier ainsi que sa grande disponibilité tout au long de ce projet.
- 📄 Dre Mariela Segura, pour sa contribution, ses conseils avisés, son soutien constant et sa passion contagieuse pour la science.
- 📄 Dr Philip Willson ainsi que Yuriy Popowych, pour l'accueil dans leur laboratoire.
- 📄 Sonia Lacouture pour sa collaboration technique essentielle et ses conseils judicieux.
- 📄 Tous les membres du laboratoire pour leur aide généreuse, leur soutien et leur amitié.
- 📄 Ma famille et mes amis pour leurs encouragements, leur soutien moral et leur appui continu.

I- INTRODUCTION

Streptococcus suis est un des pathogènes les plus importants de l'industrie porcine mondiale. *S. suis* cause une grande variété d'infections chez les porcs, comme la méningite, la septicémie, l'arthrite, l'endocardite, et la pneumonie (Higgins and M 2005). Cette bactérie est aussi reconnue comme étant un agent de zoonoses. On dénombre 33 sérotypes de *S. suis* dont le sérotype 2 est considéré comme le plus virulent et le plus prévalent (Higgins and M 2005; Hill *et al.* 2005).

Les connaissances sur les facteurs de virulence demeurent limitées et concernent surtout le sérotype 2. Puisque les mutants non capsulés sont non virulents et sont rapidement éliminés de la circulation sanguine chez les modèles murins et porcins, la capsule polysaccharidique (CPS) est le seul facteur de virulence démontré (Charland *et al.* 1998) (Smith *et al.* 1999). *S. suis* produit aussi une hémolysine, nommée suilysine (Sly), qui contribue à la virulence de la bactérie mais qui n'est pas un facteur critique. Cette toxine qui fait partie de la famille des toxines activées au thiol est cytotoxique pour les cellules épithéliales, les cellules endothéliales et les macrophages (Norton *et al.* 1999; Charland *et al.* 2000; Lalonde *et al.* 2000; Segura *et al.* 2002; Benga *et al.* 2004; Vanier *et al.* 2004). Par contre, des mutants Sly- demeurent virulents chez le porc (Allen *et al.* 2001; Lun *et al.* 2003). D'autres facteurs de virulence ont été proposés, soit la muramidase-released protein (MRP), l'extracellular factor (EF) ainsi que différentes adhésines et enzymes, malgré que leur rôle dans la virulence de *S. suis* n'a pas encore été prouvé.

La plupart des souches européennes et asiatiques virulentes de *S. suis* sérotype 2 sont MRP+, EF+ et Sly+ alors que celles nord américaines sont MRP+/-, EF- et Sly- (Gottschalk *et al.* 1998; Segers *et al.* 1998). Il a d'ailleurs été proposé que les souches Européennes ont un potentiel de virulence plus élevé que les souches nord américaines (Gottschalk and Segura 2000; Berthelot-Herault *et al.* 2005; Higgins and M 2005).

La compréhension de la pathogénèse de l'infection causée par *S. suis* est restreinte et les mécanismes utilisés par la bactérie pour voyager dans la circulation sanguine pour atteindre le système nerveux central (SNC) ne sont pas connus (Gottschalk and Segura 2000). Une première hypothèse suggère que *S. suis* serait phagocyté par les monocytes et survivrait intra cellulièrement pour voyager dans la circulation sanguine (théorie du « cheval de Troie »). Par contre, un faible nombre de monocytes contiennent des bactéries intracellulaires, indiquant que *S. suis* pourrait aussi voyager de façon extracellulaire

(Williams and Blakemore 1990). De plus, différents rapports utilisant des mutants non capsulés indiquent que seulement les bactéries encapsulées résistent à la phagocytose des monocytes et macrophages murins et porcins. En fait, il a récemment été démontré que la capsule peut « down réguler » les cascades signalétiques impliqués dans le processus de phagocytose des macrophages (Segura *et al.* 2004). La théorie du « cheval de Troie modifiée » supposant que *S. suis* voyage attaché de façon extracellulaire (et non phagocytées) aux monocytes a aussi été proposée (Segura and Gottschalk 2002). Par ailleurs, les expériences de phagocytose réalisées à l'aide de diverses techniques comme des colorants vitaux, la cytométrie en flux et la protection aux antibiotiques proposent des résultats contradictoires (Busque *et al.* 1998; Charland *et al.* 1998; Segura *et al.* 1998; Smith *et al.* 1999; Lun *et al.* 2003).

Pour provoquer des méningites et des septicémies, *S. suis* doit survivre dans la circulation sanguine. Les recherches sur *S. suis* concernent donc principalement les interactions avec les monocytes/macrophages, mais très peu d'information est disponible à propos des neutrophiles. Ces leucocytes, qui sont présents en grande quantité et qui sont les premières cellules recrutées aux sites d'infection, composent la première ligne de défense de l'immunité innée. Les neutrophiles sont facilement activés et ont une grande capacité de destruction des microorganismes (Witko-Sarsat *et al.* 2000) (Burg and Pillinger 2001) (Segal 2005). Les neutrophiles semblent jouer un rôle important dans l'immunité innée contre *S. suis* puisqu'ils sont détectés au début de l'infection, que le nombre augmente après infection par *S. suis* et qu'ils sont prédominants dans les lésions causées par ce pathogène (Sanford 1987; Vecht *et al.* 1989; Sprenger *et al.* 1996; Salles *et al.* 2002).

Puisqu'en condition normale les neutrophiles sont des cellules non adhérentes, les tests de phagocytose doivent être réalisés en suspension, ce qui rend les manipulations difficiles. En effet, peu de méthodes quantitatives sont disponibles pour distinguer les bactéries extracellulaires de celles adhérentes et intracellulaires (Hampton and Winterbourn 1999). De plus, les tests de phagocytose et les tests bactéricides sont souvent confondus, ce qui mène à des analyses erronées des résultats. Les études de phagocytose analysent l'ingestion des bactéries par les leucocytes (suivie ou non de la mort de ces mêmes bactéries) alors que les études d'effet bactéricide évaluent directement la mort des bactéries. Dans le but de comprendre les interactions entre les souches de *S. suis*

Européenne (Sly+) et Nord Américaine (Sly-) et les neutrophiles porcins, des tests de cytotoxicité ainsi que des tests bactéricides et de phagocytoses ont été réalisés avec différentes méthodes et diverses conditions d'opsonisation. Les résultats d'effet bactéricide ont été comparés avec ceux de tests semblables effectués avec des macrophages dérivés de monocytes.

II- RECENSION DE LA LITTÉRATURE

1 *Streptococcus suis*

1.1 Aspect général de *S. suis*

Les premières infections décrites causées par *Streptococcus suis* remontent aux années 50 alors que Jansen et Van Dorsenn ont décrit des cas de méningo-encéphalite chez des porcelets âgés de un à six mois causés par des streptocoques hémolytiques (Jansen and van Dorssen 1951; Field *et al.* 1954). En 1987, les études de chimiotaxonomie et de génétique faites par Kilpper-Bälz et Schleifer ont mis en évidence la désignation officielle d'une nouvelle espèce bactérienne, soit *Streptococcus suis* (Kilpper-Balz and Schleifer 1987). Depuis, cette bactérie est connue comme un problème mondial majeur dans l'industrie porcine due à ses multiples infections.

L'isolement de *S. suis* a été effectué chez une grande variété d'espèces, notamment chez le porc et l'humain (Keymer *et al.* 1983; Devriese and Haesebrouck 1992; Higgins *et al.* 1997; Halaby *et al.* 2000). Le réservoir principal de la bactérie est le système respiratoire supérieur, particulièrement les cavités nasales, et le tractus génital et alimentaire des porcs (Higgins and Gottschalk 1999). *S. suis* est reconnu comme étant un agent responsable de méningites, de septicémies, d'arthrites, de péricardites, de pneumonies, d'endocardites et de polysérosites (Perch *et al.* 1983; Sihvonen *et al.* 1988; Touil *et al.* 1988; Higgins and Gottschalk 2001). Les observations de lésions typiques et l'isolement de la bactérie peuvent confirmer l'infection (Higgins and Gottschalk 1999). Un traitement rapide aux antibiotiques et aux anti-inflammatoires aide à réduire la progression de la maladie (Durand *et al.* 2001). Toutefois, les mesures préventives comme l'administration de vaccins et les traitements prophylactiques par antimicrobiens s'avèrent inefficaces (Staats *et al.* 1997).

1.2 Description et classification

Streptococcus suis est un coque à Gram positif, catalase négatif et de type anaérobie facultatif (Staats *et al.* 1997). Il est non motile, ovoïde et on le retrouve seul, en paires, ou

en courtes chaînettes. Toutes les souches sont α -hémolytiques sur géloses au sang de mouton (Kilpper-Balz and Schleifer 1987).

En 1963, de Moor a originalement classifié les souches de *S. suis* dans les nouveaux groupes de Lancefield R, S, RS, et T (Demoor 1963). En 1966, Elliott a découvert que les souches classées dans le groupe S étaient similaires au *Streptococcus* PM qui cause des méningites chez le porcelet. Il a donc désigné cette espèce *Streptococcus suis* sérotype 1 (Elliott 1966), nom qui a été utilisé pour la première fois. Par la suite, la souche classée dans le groupe R a été isolée et nommée *Streptococcus suis* sérotype 2. Cette dernière a la particularité d'infecter des porcs de tous âges contrairement au sérotype 1 qui n'affecte que les porcelets (Windsor and Elliott 1975) et le groupe RS a été associé au sérotype 1/2. Quelques années plus tard, la souche classée dans le groupe T a été définie comme étant le sérotype 15 (Gottschalk *et al.* 1989). Jusqu'à tout récemment, 35 sérotypes de *S. suis* basés sur les antigènes capsulaires étaient répertoriés, soit les sérotypes 1 à 34 et le sérotype 1/2 (Gottschalk *et al.* 1989; Gottschalk *et al.* 1991a; Higgins *et al.* 1995). Il a cependant été démontré par analyse des séquences de l'ARN ribosomal 16S et du gène chaperonine 60 que les sérotypes 32 et 34 appartiennent à l'espèce *Streptococcus orisratti* (Hill *et al.* 2005). Plusieurs techniques de sérotypage ont été développées pour le diagnostic, mais celle usuellement utilisée est la technique de coagglutination (Higgins and Gottschalk 1990).

1.3 Distribution géographique

La majorité des souches de *S. suis* isolés de porcs font partie des sérotypes de 1 à 8 (Chatellier *et al.* 1999; Higgins and Gottschalk 1999). Le sérotype 2 est considéré comme le plus virulent et le plus retrouvé chez les animaux ayant cette infection à travers le monde. Cependant, le tropisme et la virulence des sérotypes peuvent être différents selon les régions et ont aussi tendance à changer avec le temps. En effet, depuis les seize dernières années, la fréquence de *S. suis* sérotype 2 est passée de 32% à 16% au Canada (Higgins and Gottschalk 2001). En France, 70% des *S. suis* isolés de cas cliniques sont de sérotype 2 (Berthelot-Herault *et al.* 2000). En Espagne, le sérotype 9 est le plus important avec 64,9% suivi par le sérotype 2 avec 14,8% (Vela *et al.* 2003). Le sérotype 9 est aussi le plus important en Belgique et en Allemagne (Wisselink *et al.* 2000). En Scandinavie, le

sérotype 7 a prédominé durant longtemps mais le sérotype 2 est devenu supérieur durant les dernières années (Higgins and Gottschalk 1999). De façon semblable, au Danemark, 29% des cas de *S. suis* sont dus au sérotype 2 et 17% au sérotype 7 (Aarestrup *et al.* 1998). Les sérotypes 18, 19 et 21 sont pour leur part généralement retrouvés chez les animaux sains (Gottschalk *et al.* 1989).

1.4 Infection de *S. suis* et transmission

1.4.1 Chez le porc

L'habitat naturel de *S. suis* est le système respiratoire supérieur, particulièrement les cavités nasales, ainsi que le tractus urogénital et alimentaire des porcs (Devriese *et al.* 1994; Higgins and Gottschalk 1999; Cloutier *et al.* 2003). *S. suis* cause une grande variété d'infections chez le porc comme la méningite, la septicémie, l'arthrite, l'endocardite, la polysérite, l'avortement et la pneumonie (Demoor 1963; Clifton-Hadley 1983) (Higgins *et al.* 1989; Gottschalk *et al.* 2001). *S. suis* est considéré comme le pathogène primaire de la méningite puisqu'il est le seul microorganisme à être isolé au cerveau lors de cette infection (Reams *et al.* 1996). Malgré tout, les porcs peuvent être porteurs asymptomatiques, et ce, pour plus d'un sérotype et plus d'une souche (Reams *et al.* 1996; Gottschalk *et al.* 2001; Cloutier *et al.* 2003). Toutefois, une seule de ces souches peut être responsable des signes cliniques (Cloutier *et al.* 2003).

Les infections à *S. suis* touchent surtout les élevages de porcs à forte densité d'animaux. Le pourcentage d'animaux porteurs peut varier de 0% à 100% et il n'y a pas de différence significative du nombre de porteurs entre les mâles et femelles et entre les différents groupes d'âges (Clifton-Hadley 1984; Dupas *et al.* 1992). Aussi, il a été proposé qu'à partir du moment où un porc est infecté, il devient un porteur à vie (Robertson and Blackmore 1989b). L'introduction d'animaux porteurs asymptomatiques au sein d'un troupeau est la source de propagation de la bactérie (Touil *et al.* 1988). Suite au contact avec *S. suis*, les porcs peuvent développer une infection ou demeurer porteurs dans les amygdales, les voies respiratoires ou génitales (Clifton-Hadley *et al.* 1986; Dupas *et al.* 1992). Des manifestations cliniques peuvent apparaître éventuellement chez les porcs porteurs lorsqu'ils sont en condition de stress par exemple, lors du sevrage, du voyageant

des animaux ou dû à une surpopulation des troupeaux (Clifton-Hadley 1984; Dee *et al.* 1993)

Il a été observé que les truies sont fortement colonisées par *S. suis* au dans leur tractus vaginal (Cloutier *et al.* 2003). Les porcelets nés de ces truies sont exposés à la bactérie au moment de la naissance (Robertson and Blackmore 1989b; Robertson *et al.* 1991; Amass *et al.* 1997) et ils sont plus susceptibles de développer une infection. La contamination peut donc se faire par transmission verticale mais aussi par transmission horizontale, soit de la truie au porcelet lors du sevrage ou entre les porcelets. En effet, la bactérie est isolée de la salive, de la peau et des sécrétions nasales (Clifton-Hadley *et al.* 1986; Torremorell *et al.* 1998; Higgins and Gottschalk 1999; Berthelot-Herault *et al.* 2001). La transmission en aérosols sans contacts directs entre les porcs a aussi été confirmée pour le sérotype 2 (Berthelot-Herault *et al.* 2001). Une étude a démontré que l'isolation de *S. suis* des cavités nasales est un indicateur de transmission active (Cloutier *et al.* 2003). Les infections touchent particulièrement les porcelets sevrés, soit âgés de 5 à 10 semaines, et le premier signe clinique constaté est une élévation de la température (Higgins and Gottschalk 1999). Cette susceptibilité est causée par le déclin de l'immunité maternelle durant cette période (Lapointe *et al.* 2002; Cloutier *et al.* 2003). Le diagnostic d'une infection causée par *S. suis* est confirmé par l'isolement de la bactérie dans les tissus et les fluides et par la reconnaissance des lésions microscopiques. Les signes cliniques les plus récurrents sont des signes d'atteinte neurologique tels que l'incoordination, l'incapacité à se tenir debout, le pédallement ou des convulsions (Clifton-Hadley 1984; Reams *et al.* 1994; Lapointe *et al.* 2002).

1.4.2 Chez les humains

Malgré que *S. suis* soit considéré comme un pathogène porcin, il peut infecter plusieurs espèces dont les humains. *S. suis* est donc un agent de zoonose. Les premiers cas de méningite causés par *S. suis* chez les humains ont été diagnostiqués dans les années 60 au Danemark par Perch *et al.* (Perch *et al.* 1968). Depuis, plusieurs cas ont été rapportés mondialement. À Hong Kong, *S. suis* est la cause la plus commune de méningite (Chau *et al.* 1983). Au cours de l'été 2005, une flambée épidémique de *S. suis* a d'ailleurs été

rapportée dans la province de Sichuan. 206 cas d'infection ont été recensés chez l'homme, dont 38 mortels. Les symptômes rapportés incluaient de fortes fièvres, des nausées et vomissements, suivi de méningites, d'hémorragies subcutanées, de choc toxique et de coma dans les cas sévères. Le contact rapproché avec des porcs malades ou morts serait la principale source de contamination et aucune preuve de transmission inter-humaine n'a pu être trouvée (Organization 2005) (Normile 2005).

Malgré l'importance de l'industrie porcine au Canada, le premier cas d'infection humaine par *S. suis* n'y a été rapporté qu'en 1982 (Sanford and Tilker 1982) et qu'en 1996 au Québec (Michaud *et al.* 1996). Cependant, les cas de *S. suis* sont sous diagnostiqués puisque plusieurs laboratoires ne connaissent pas la bactérie ou la confondent avec d'autres genres de streptocoque ou avec des entérocoques (Gottschalk 2004).

Les humains infectés sont habituellement des adultes qui ont des contacts directs avec les porcs ou leurs sous-produits, par exemple : les inspecteurs de viande, les fermiers, les producteurs porcins, les bouchers (Robertson and Blackmore 1989a; Michaud *et al.* 1996; Tarradas *et al.* 2001). La voie d'entrée se fait habituellement par l'infection d'une lésion cutanée (Dupas *et al.* 1992) mais elle peut aussi être reliée à l'ingestion de viande de porc crue ou de sang de porc (Fongcom *et al.* 2001). Les manifestations cliniques de *S. suis* chez l'homme peuvent se traduire par une méningite, la septicémie, l'endocardite, la bactériémie et le choc toxique (Dupas *et al.* 1992; Higgins and Gottschalk 1999; Pedroli *et al.* 2003; Gottschalk 2004; Suankratay *et al.* 2004). Les méningites causées par cette bactérie ont la particularité de créer des troubles de l'ouïe pouvant aller jusqu'à la surdité (Arends and Zanen 1988; Suankratay *et al.* 2004).

Le sérotype 2 est le plus associé aux infections humaines (Arends and Zanen 1988) (Durand *et al.* 2001) mais les sérotypes 4 et 14 sont aussi parfois retrouvés avec ces infections (Gottschalk and Segura 2000; Watkins *et al.* 2001). Des analyses d'ADN utilisant le RAPD et le PFGE sont employées pour comparer les génotypes entre les isolats de *S. suis* provenant des humains et des porcs. Ces résultats sont très homogènes et les souches d'origine humaines sont classées dans le même groupe de souches que les souches isolées chez le porc (Chatellier *et al.* 1999; Berthelot-Herault *et al.* 2002).

1.5 Facteurs de virulence de *Streptococcus suis*

Plusieurs composantes bactériennes ont été proposées comme facteurs de virulence potentiels chez *S. suis*. Par contre, la capsule est le seul facteur de virulence dont le rôle a été prouvé (Charland *et al.* 1998; Smith *et al.* 1999) et les connaissances se rapportant à ces facteurs concernent surtout le sérotype 2.

1.5.1 Capsule de polysaccharides (CPS)

Le rôle de la capsule dans la virulence bactérienne est de protéger les bactéries de la réponse inflammatoire de l'hôte et de l'activation du complément et des phagocytes. Les bactéries encapsulées sont donc responsables des infections invasives les plus sérieuses. Par contre, les mécanismes de protection par la capsule sont différents pour chaque espèce bactérienne par exemple en facilitant l'adhérence de la bactérie, en masquant ses facteurs antigéniques ou en inhibant l'effet bactéricide ou opsonique du sérum (Salyers and Whitt 2002).

L'association entre la virulence et la capsule de *S. suis* a été démontrée par la création d'un mutant non encapsulé de sérotype 2 (souche S735) à l'aide de mutagenèse utilisant un transposon (Charland *et al.* 1998). Ceci a été confirmé par la suite avec la création d'un mutant isogénique de la souche 10 dans lequel la synthèse de capsule est interrompue (Smith *et al.* 1999). Chez les modèles porcins et murins, la virulence du mutant S735 est significativement plus faible que chez la souche sauvage. La capsule est importante pour la survie de *S. suis* dans le sang et pour la dissémination puisque les mutants sans capsule sont rapidement éliminés de la circulation alors que la souche sauvage peut y demeurer plus de 48 heures (Charland *et al.* 1998). Aussi, d'autres études ont démontré que la capsule est un facteur anti-phagocytaire lorsqu'on compare la phagocytose de mutants non capsulés avec des souches sauvages par des macrophages (Charland *et al.* 1998; Segura *et al.* 1998; Smith *et al.* 1999). Il a été prouvé que ceci est dû à la réduction de l'activation des kinases impliquées dans les mécanismes signalétiques de la phagocytose par les souches capsulées (Segura *et al.* 2004). De plus, la capsule facilite l'adhésion de *S. suis* aux macrophages, ce qui permet la dissémination de la bactérie dans la circulation

(Segura and Gottschalk 2002). Malgré tout, plusieurs souches non virulentes sont capsulées, indiquant l'importance d'autres facteurs nécessaires à la virulence (Gottschalk and Segura 2000).

La capsule polysaccharidique de type 2 de *S. suis* a un poids moléculaire de 310 kDa et la majeure partie des déterminants génétiques impliqués dans sa synthèse sont contenus dans un fragment d'ADN de 16 Kb (Smith *et al.* 1999). Cette capsule est composée de cinq différents sucres : le rhamnose, le galactose, le glucose, le N-acétylglucosamine et l'acide N-acétylneuramidique ou acide sialique. L'acide sialique est un composant habituel des glycoprotéines des cellules eucaryotes (Salysers and Whitt 2002) et il est reconnu pour moduler l'activation de la cascade alternative du complément et empêcher la phagocytose. Malgré que ce sucre soit en partie responsable de l'adhésion de *S. suis* aux macrophages (Segura and Gottschalk 2002), il n'est pas critique pour la virulence de cette bactérie puisque des concentrations semblables d'acide sialique sont retrouvées autant chez les souches virulentes que non virulentes et que des taux identiques de phagocytose par des monocytes porcins sont observés malgré l'absence ou le blocage de celui-ci (Charland *et al.* 1996).

1.5.2 Les protéines MRP et EF

La protéine MRP, ou « muramidase-released-protein », est une protéine membranaire de 136 kDa. Elle est relâchée durant la croissance bactérienne et est retrouvée dans le surnageant de culture (Vecht *et al.* 1989). Le EF, ou « extracellular factor », est une protéine extracellulaire de 110 kDa (Vecht *et al.* 1991). Il existe des variants de ces protéines (MRP*, MRPs, EF*) qui ont des masses moléculaires différentes (Vecht *et al.* 1991; Vecht *et al.* 1996). Les fonctions de ces protéines dans l'infection causée par *S. suis* n'ont pas encore été découvertes. Les gènes codant ces protéines ont été clonés et caractérisés mais leur séquençage n'a pas apporté de précisions pour ce qui est de leurs fonctions (Smith *et al.* 1992; Smith *et al.* 1993). Toutefois, la séquence en acides aminés du MRP présente des similarités avec celle de la protéine liant la fibronectine de *Staphylococcus aureus* (Smith *et al.* 1992).

Les protéines MRP et EF ont tout d'abord été identifiées comme facteur de virulence potentiel de *S. suis* sérotype 2 puisque la plupart des souches causant la maladie produisent ces protéines (Vecht *et al.* 1989; Vecht *et al.* 1991; Staats *et al.* 1999). Par contre, les souches virulentes d'Amérique du Nord sont majoritairement MRP- et EF- (Gottschalk *et al.* 1998). Il a été suggéré que ces protéines ne contribuent pas à la pathogénicité en elle-même mais que leur synthèse est associée avec la pathogénicité puisque les mutants qui n'ont pas ces protéines demeurent virulents (Smith *et al.* 1996). Une autre explication suggérée est que la virulence de *S. suis* est multifactorielle et que ces facteurs de virulence sont redondants. Donc, en l'absence de MRP ou de EF, d'autres facteurs de virulence pourraient compenser pour ces protéines (Wisselink *et al.* 2001).

Les protéines MRP et EF sont des antigènes reconnus dans le sérum des porcs convalescents (Vecht *et al.* 1991). Un vaccin de type « émulsion eau dans huile » contenant MRP et EF est protecteur chez le porc contre l'infection par la bactérie *S. suis* sérotype 2 MRP+ EF+ (Wisselink *et al.* 2001) mais pourrait aussi réagir contre les autres souches ayant ces protéines, soit les sérotypes 1 à 22 (Berthelot-Herault *et al.* 2000; Wisselink *et al.* 2000). Par contre, ce vaccin serait inefficace en Amérique du Nord puisque les souches virulentes y sont MRP- EF-.

1.5.3 Hémolysine (suilysine)

L'activité des hémolysines est habituellement associée avec la virulence et la pathogénicité chez beaucoup de bactéries. En 1994, le groupe de Jacob *et al.* a identifié une hémolysine de 54 kDa chez la bactérie *S. suis* de sérotype 2. L'année suivante, le groupe de Gottschalk *et al.* a aussi décrit une hémolysine chez *S. suis* sérotype 2 mais celle-ci de 65 kDa. Il a été prouvé que ces deux protéines sont la même toxine et que la variation de leur poids moléculaire est due à la méthode de purification utilisée (Gottschalk *et al.* 1995). La suilysine fait partie de la famille des toxines activées au thiol ou toxines cytolytiques liant le cholestérol (Jacobs *et al.* 1994; Segers *et al.* 1998). Ces toxines sont inhibées par de petites quantités de cholestérol, forment des pores transmembranaires, sont sensibles aux agents oxydants et ont un mécanisme d'action à plusieurs cibles (Gottschalk *et al.* 1995). Le cholestérol membranaire des cellules eucaryotes est le site de liaison de la

toxine. Une fois liée, elle peut alors former de multiples pores transmembranaires de 7 nm sur la cellule (Gottschalk *et al.* 1995). La suilysine a aussi été identifiée chez les sérotypes 1 à 22 de *S. suis* (Feder *et al.* 1994; Jacobs *et al.* 1994; Jacobs *et al.* 1995).

Le gène *sly* codant pour la suilysine a été séquencé. La diversité génétique de *sly* est très limitée entre les différents isolats (King *et al.* 2001). Un rôle pour la suilysine dans la virulence a été suggéré puisque cette toxine est cytotoxique pour les macrophages (Segura and Gottschalk 2002), les cellules endothéliales (Charland *et al.* 2000; Vanier *et al.* 2004) et les cellules épithéliales (Norton *et al.* 1999; Lalonde *et al.* 2000). Les souches Hem+ sont très souvent associées à une forte virulence et ces souches ont aussi les protéines MRP et EF (Staats *et al.* 1999; King *et al.* 2001). Cependant, la toxine injectée intra-péritonéalement ne cause pas la mort chez les souris. Aussi, des études sur des mutants de *sly* ont démontré que la suilysine n'est pas requise pour le développement de l'infection chez le porc, mais peut aider à l'évolution de la maladie et jouer un rôle dans l'immunité innée par exemple, en induisant le relâchement de cytokines (Allen *et al.* 2001; Lun *et al.* 2003). Un vaccin contenant la suilysine purifiée est protecteur puisque les anticorps dirigés contre cette protéine suffisent à protéger les porcs et les souris contre une infection causée par *S. suis* (Jacobs *et al.* 1996). Par contre, puisque les souches Nord Américaines n'ont pas cette protéine, ce vaccin y serait inutile. En effet, comme pour les protéines MRP et EF, les souches européennes virulentes de *S. suis* sérotype 2 sont Hem+ (Jacobs *et al.* 1995) alors que celles de l'Amérique du Nord sont Hem- (Gottschalk *et al.* 1998; Segers *et al.* 1998). La suilysine ne doit donc pas être considérée comme un facteur de virulence universel (Berthelot-Herault *et al.* 2000; Tarradas *et al.* 2001).

1.5.4 Adhésines

L'adhésion est un des facteurs de virulence les plus importants puisqu'il permet l'attachement des bactéries pathogènes aux cellules de l'hôte. En effet, *S. suis* adhère mais n'envahit pas les cellules épithéliales. Les adhésines impliquées dans ces interactions sont partiellement masquées par la capsule et sont incluses dans la paroi cellulaire (Lalonde *et al.* 2000). Aussi, il a été démontré que *S. suis* est capable d'adhérer aux macrophages, ce qui aiderait à la dissémination de la bactérie (Segura and Gottschalk 2002) et qu'il peut

adhérer aux cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux porcins avant de les envahir afin de traverser la barrière hémato-méningée (BHM) pour accéder au système nerveux central (Vanier *et al.* 2004).

1.5.4.1 Protéine liant les IgG

Une protéine de *S. suis* sérotype 2 de 60 kDa liant les IgG a été purifiée et caractérisée. Cette protéine est un membre de la famille « heat shock protein 60 » et est présente chez tous les sérotypes de *S. suis* testés, incluant des souches virulentes et non virulentes (Serhir *et al.* 1995; Benkirane *et al.* 1997). Elle peut lier le fragment Fc des IgG de plusieurs espèces, les IgA humains et les IgY de volailles ainsi que la fibronectine humaine (Serhir *et al.* 1995; Benkirane *et al.* 1997). La protéine liant les IgG peut être associée à la surface de *S. suis* mais peut aussi être relâchée sous forme soluble durant la croissance de la bactérie. Son rôle dans la virulence est inconnu, mais il a été suggéré qu'elle contribue à l'évasion de *S. suis* du système immunitaire de l'hôte (Serhir *et al.* 1995). La liaison de IgG non immun à la surface de la bactérie pourrait masquer ses antigènes et donc limiter l'opsonisation de *S. suis*.

1.5.4.2 Protéine liant l'albumine

Une autre adhésine a été mise en évidence chez les souches virulentes et non virulentes de *S. suis* sérotype 2. Celle-ci est une protéine de 39 kDa identifiée comme une glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) qui lie différentes protéines de l'hôte dont l'albumine. L'addition d'albumine au milieu de culture augmente la virulence de *S. suis* lors de l'infection chez les souris suggérant que celle-ci joue un rôle dans le processus d'infection (Quessy *et al.* 1997). Des tests d'adhésion ont aussi été effectués sur des anneaux de la trachée de porcs et de bovins. Ceux-ci ont établi que la présence de la GAPDH purifiée diminue la liaison de *S. suis* et que les mutants pour cette protéine se lient d'une façon réduite à ces cellules (Brassard *et al.* 2001; 2004). Cette adhésine pourrait alors être impliquée dans les premières étapes de la colonisation de *S. suis* au niveau du tractus respiratoire supérieur. Il a aussi été démontré que *S. suis* est capable de lier le plasminogène à l'aide de cette adhésine, ce qui lui permet d'activer le plasminogène libre et

dégrader la fibronectine. Il a été proposé que cette activité protéinase pourrait aider *S. suis* à pénétrer les tissus infectés (Jobin *et al.* 2004).

1.5.4.3 Protéine liant le fibrinogène et la fibronectine

Une protéine de 64 kDa de *S. suis* liant le fibrinogène et la fibronectine a été isolée et caractérisée. Elle est donc nommée *S. suis* FBPS (fibrinogen, fibronectin binding protein) (de Greeff *et al.* 2002). Il est en effet rapporté que *S. suis* peut lier la fibronectine cellulaire et plasmatique purifiée (Esgleas *et al.* 2005). Par contre, la liaison au fibrinogène n'a pas été confirmée dans cette étude.

Il était admis que le gène *fbps* était présent chez tous les sérotypes et phénotypes, sauf pour les sérotypes 32 et 34 (de Greeff *et al.* 2002). Puisqu'il a été démontré que ces sérotypes 32 et 34 sont en fait *Streptococcus orisratti* (Hill *et al.* 2005), on peut conclure que le gène est présent chez la totalité des *S. suis*. L'expression de ces gènes n'a par contre pas été étudiée chez tous les sérotypes. Il a été démontré à l'aide d'un mutant isogénique que FBPS n'est pas requis pour la colonisation des amygdales mais pour celle des organes spécifiques impliqués dans la pathogénie de *S. suis*. FBPS est proposé comme étant un facteur de virulence potentiel pour *S. suis* (de Greeff *et al.* 2002).

1.5.4.4 Autres adhésines

Il a été découvert que *S. suis* a des propriétés d'hémagglutination envers les érythrocytes (Gottschalk *et al.* 1990) et que celles-ci peuvent être inhibées par des monosaccharides neutres. Il a été démontré que *S. suis* reconnaît le disaccharide Gala 1-4 Gal qui est présent sur les glycolipides neutres appartenant aux antigènes du groupe P dans le sang (Haataja *et al.* 1993). Cette adhésine a donc été nommée adhésine P et est classifiée en deux sous-types : Pn et Po selon la spécificité de liaison. Po lie le galactose alors que Pn lie le galactose et le N-acétylgalactosamine. Cette adhésine a par la suite été purifiée et il a été démontré que c'est une protéine de 18 kDa qui est beaucoup exprimée à travers les souches et les sérotypes. L'adhésine P est très immunogène et induit une activité bactéricide chez les souris. Cependant, les souches virulentes et non virulentes de *S. suis* possèdent cette adhésine. Il ne peut donc pas y avoir de corrélation entre l'activité

d'hémagglutination et le niveau de virulence chez *S. suis* (Tikkanen *et al.* 1995; Haataja *et al.* 1996; Tikkanen *et al.* 1996).

Il a aussi été établi que *S. suis* sérotype 2 peut lier le collagène de type I, III et V ainsi que le collagène de type IV mais seulement en présence de fibronectine suggérant que cette protéine pourrait agir comme pont entre le collagène et la bactérie. Les adhésines impliquées dans ces interactions seraient de nature protéique. Une inhibition croisée de l'adhésion est observée entre la fibronectine plasmatique et le collagène indiquant que les domaines liant ces protéines sont situés sur la même adhésine ou des adhésines adjacentes (Esgleas *et al.* 2005).

1.5.7 Autres facteurs de virulence

D'autres composants sont des facteurs de virulence potentiels pour *S. suis* sérotype 2. Par exemple, une activité superoxyde dismutase a été découverte chez cette bactérie (Langford *et al.* 1991). L'anion superoxyde est un facteur bactéricide retrouvé dans les phagolysosomes des macrophages et son inhibition pourrait donc être un facteur important pour la virulence de *S. suis*. Il n'y a cependant pas de corrélation observée entre l'activité de l'enzyme et la virulence de la bactérie. Sa production pourrait aider *S. suis* à survivre à la phagocytose des macrophages (Langford *et al.* 1991).

Une autre protéine, celle-ci de 44 kDa pourrait être impliquée dans la virulence. La fonction de cette protéine membranaire n'est cependant pas connue. Les souches mutantes n'ayant pas cette protéine sont non virulentes chez les souris. De plus, la présence d'anticorps contre cette protéine dans un antisérum est nécessaire à l'obtention d'une protection complète (Gottschalk *et al.* 1992).

Des fimbriaes sont détectés sur des souches de références de plusieurs sérotypes de *S. suis* dont le sérotype 2. Ces fimbriaes sont courts, minces et flexibles. Le rôle de ces fimbriaes comme facteur de virulence n'a toutefois pas été démontré (Jacques *et al.* 1990).

Quatre protéases majeures ont été caractérisées pour *S. suis* (Jobin and Grenier 2003). Premièrement, l'Arg-aminopeptidase a un poids moléculaire de 55 kDa et est retrouvée de façon extracellulaire ou associée à *S. suis*. Ensuite, une protéase avec une activité caséinase, qui fait partie de la classe des métalloprotéases. Enfin, la dipeptidyl peptidase IV (DPP IV), qui a une masse de 70 kDa et qui clive les protéines ayant un X-Pro ou un X-Ala à leur extrémité N-terminale, ce qui inclut plusieurs cytokines (Jobin *et al.* 2005). Ces trois protéases sont produites par le sérotype 2 ainsi que les sérotypes, 1, 1/2 et 3. Finalement, une quatrième protéase, celle-ci de type chymotrypsine, a été caractérisée. Elle appartient à la classe des sérines protéases et est seulement détectée chez les souches virulentes européennes de sérotype 2. Ces quatre protéases pourraient aider la bactérie pour sa nutrition, pour l'invasion et la destruction des tissus et pour neutraliser les systèmes de défenses de l'hôte (Jobin and Grenier 2003).

Il a récemment été découvert que *S. suis* possède une hyaluronate lyase qui est sécrétée et qui dégrade l'acide hyaluronique afin de prodiguer des nutriments à la bactérie ou encore pour aider la pénétration de *S. suis* dans les tissus de l'hôte (Allen *et al.* 2004). Il est rapporté que ce gène est présent chez toutes les souches mais que la protéase active est retrouvée chez seulement 30% des isolats, souvent associés avec des cas de pneumonies (King *et al.* 2004). L'absence d'activité enzymatique chez la majorité des isolats indique que cette protéine n'est probablement pas un facteur de virulence crucial.

Une nucléase a aussi récemment été décrite chez *S. suis* et pourrait être un facteur de virulence potentiel. Cette nucléase de 108 kDa, nommée SsnA, est sécrétée et a été isolée chez les sérotypes 1 à 9 (Fontaine *et al.* 2004). Elle est spécifique à l'ADN linéaire simple ou double brin et son activité requiert la présence de calcium et de magnésium. De plus, les bactéries produisant cette protéine sont isolées dans les organes, dans le cerveau et dans les articulations de l'animal (Fontaine *et al.* 2004).

1.6 Pathogénèse de la méningite causée par *S. suis* sérotype 2

La pathogénèse de *S. suis* n'est que peu comprise. Les études concernant cette bactérie sont majoritairement limitées au sérotype 2 et touchent surtout le développement

de la méningite. Aussi, les connaissances de la pathogénèse de cette bactérie sont limitées au porc.

Les animaux colonisés vont surtout être porteurs dans les amygdales. Certains vont être porteurs sains alors que d'autres vont développer une bactériémie, possiblement une septicémie et finalement, une méningite. Dans ce cas, la bactérie devra se diriger vers les nœuds lymphatiques mandibulaires et être disséminée grâce au système lymphatique (Euzéby 1999) ou encore voyager dans le sang afin d'atteindre le système nerveux central (Gottschalk and Segura 2000).

La pathogénèse de l'infection est influencée par le statut de l'immunité de l'hôte, par les facteurs environnementaux et les facteurs de virulence que possède la souche. La haute réponse inflammatoire qui résulte de l'invasion et de la multiplication des souches pathogènes dans les tissus porcins est une caractéristique des infections par *S. suis* et demande plus d'étude.

1.6.1 Voie d'entrée

La méningite, l'arthrite et la septicémie peuvent être reproduites expérimentalement chez les porcelets par inoculation intraveineuse, sub-durale et en vaporisant des cultures liquides de *S. suis* sérotype 1 et 2 au nez et à la gorge des animaux (Windsor and Elliott 1975; Clifton-Hadley 1984). L'inoculation sous-cutanée par le sérotype 7 a aussi été réalisée (Boetner *et al.* 1987). Une récente étude a démontré que la voie d'administration expérimentale qui mime le mieux une infection naturelle est une inoculation par voie intranasale précédée par une administration d'acide acétique puisque celui-ci est un irritant pour les hautes voies respiratoires (Pallares *et al.* 2003). *In vivo*, *S. suis* infecte les voies respiratoires de l'animal pour ensuite coloniser les amygdales. Chez l'humain, il a été démontré que les voies d'entrées les plus fréquentes sont les blessures ou les petites abrasions de la peau (Dupas *et al.* 1992).

1.6.2 Interactions de *S. suis* avec les cellules épithéliales

Il n'a pas encore été établi comment *S. suis* présent en petites quantités dans les muqueuses est capable de traverser la muqueuse épithéliale vers la circulation sanguine pour développer la méningite (Gottschalk and Segura 2000).

Il a été démontré que *S. suis* adhère aux cellules épithéliales humaines et porcines, ce qui est une étape importante dans la colonisation de l'hôte (Lalonde *et al.* 2000) Norton *et al.*, 1999). Une autre étude utilisant des sections de poumons porcins congelés et plusieurs souches de sérotype 2 a mis en évidence que tous les isolats provenant d'animaux malades adhéraient aux cellules alors que seulement 30% des isolats provenant de porteurs sains montraient une faible adhérence (Gottschalk *et al.* 1991b). Par contre, une étude n'a démontré que 25% d'adhésion aux cellules épithéliales porcines pour des souches isolées chez des porcs en Allemagne (Allgaier *et al.* 2001). L'adhésion est médiée par les composants de la paroi et est considérablement réduite avec la présence de la capsule (Wibawan and Lammler 1994; Salasia *et al.* 1995; Lalonde *et al.* 2000) pouvant expliquer les différences dans les résultats entre les diverses études. Il a aussi été démontré que les souches productrices de suilysine sont cytotoxiques pour les cellules épithéliales (Norton *et al.* 1999; Lalonde *et al.* 2000) et cette cytotoxicité est inhibée par la présence d'anticorps monoclonaux spécifiques à l'hémolysine. Il a été suggéré que les souches de *S. suis* productrices de suilysine peuvent utiliser l'invasion et la lyse cellulaire comme mécanisme pour faire une brèche dans l'épithélium. Par contre, cette invasion demeure controversée. En effet, elle a été constatée comme étant un événement rare dans une étude (Norton *et al.* 1999) alors qu'une autre étude n'a pas détecté d'invasion par *S. suis* de plusieurs lignées cellulaires d'origine humaine et de différentes espèces animales dont le porc (Lalonde *et al.* 2000). L'utilisation de méthodologies différentes pourrait expliquer cette divergence. Contrairement à ceci, il a été récemment découvert qu'une souche non capsulée et que des souches non sérotypables adhèrent fortement et envahissent les cellules épithéliales humaines (Benga *et al.* 2004). De plus, ces souches peuvent survivre dans les cellules épithéliales selon leur expression de la capsule et d'une arginine déaminase, nommée AdiS, mais ceci, indépendamment de leur cytotoxicité.

S. suis peut aussi entrer en contact avec les cellules épithéliales polarisées du plexus choroïde, qui composent de façon importante la barrière hémato-méningée (BHM). Puisque des lésions sont observées dans le plexus choroïde lors des méningites provoquées par *S. suis*, il a été proposé que *S. suis* utiliserait cette voie afin d'atteindre le cerveau (Williams and Blakemore 1990). Il a d'ailleurs été récemment établi que la présence de *S. suis* au côté apical de ces cellules induit une perte de résistance transépithéliale ainsi qu'une augmentation de l'écoulement paracellulaire de fluides (Tenenbaum *et al.* 2005). Par contre, la croissance de *S. suis* est inhibée lorsque ces cellules sont activées *in vitro* par des cytokines pro-inflammatoires (Adam *et al.* 2004) indiquant que ces cellules aident aux défenses de l'hôte contre ce pathogène.

1.6.3 Interactions de *S. suis* avec les leucocytes

Les interactions de *S. suis* avec les leucocytes jouent un rôle majeur dans l'élimination des microorganismes circulant dans le sang puisque une bactériémie persistante précède habituellement les méningites (Gottschalk and Segura 2000). Ceci est souligné par le fait que les neutrophiles sont les premiers leucocytes présents lors d'une infection due à *S. suis* et il y a par la suite un changement graduel des populations de cellules allant vers une présence de monocytes et de lymphocytes (Sprenger *et al.* 1996; Salles *et al.* 2002). Par contre, ces interactions pourraient participer à la pathogénèse de la méningite de *S. suis* en initiant l'inflammation ou en aidant à la dissémination de la bactérie dans l'organisme. En effet, il a été remarqué à l'aide de tests bactéricides effectués dans du sang de porc ou à l'aide d'infection de souris que les souches de *S. suis* virulentes peuvent survivre à la présence de leucocytes et ce, outre leur cytotoxicité (Agarwal *et al.* 1969; Charland *et al.* 1998; Lun *et al.* 2003). Plus spécifiquement, cet effet a aussi été remarqué avec des macrophages alvéolaires (Smith *et al.* 1999) et avec les neutrophiles (Quessy *et al.* 1994). D'ailleurs, le procédé par lequel *S. suis* voyage dans la circulation sanguine n'a pas encore été déterminé (Gottschalk and Segura 2000). Il a été proposé que *S. suis* utilise les monocytes comme véhicules pour se rendre au système nerveux central, soit la théorie du cheval de Troie (Williams and Blakemore 1990). Par ailleurs, la théorie du cheval de Troie modifiée, où les bactéries sont liées à la surface des cellules phagocytaires mais non

ingérées, a aussi été suggérée. Une troisième théorie soutient que *S. suis* voyage librement dans la circulation sanguine (Gottschalk and Segura 2000).

1.6.3.1 Phagocytose

Les études démontrent des résultats contradictoires par rapport à la phagocytose de *S. suis* par les leucocytes et celles-ci nécessitent plus d'approfondissements. Des recherches ont rapporté que les macrophages murins peuvent phagocyter *S. suis* en absence d'anticorps et de complément *in vitro* (Williams 1990). Cette étude soutient que cette phagocytose mène à la mort des souches non pathogènes alors que les souches virulentes survivent et se répliquent dans les macrophages. Par contre, dans cette étude, seulement un petit pourcentage (moins de 2%) de macrophages contient des bactéries lors d'une bactériémie due à *S. suis*. Ceci est soutenu par un autre étude qui indique un haut taux de phagocytose (plus de 60%) de *S. suis* par des neutrophiles porcins (Wibawan and Lammler 1994). De plus, une autre recherche effectuée avec la technique de cytométrie en flux rapporte un pourcentage élevé d'ingestion (plus de 65%) de *S. suis* par différents phagocytes porcins et humains (Busque *et al.* 1998) supportant la théorie du cheval de Troie.

Inversement, la plupart des études conduites durant la dernière décennie démontrent que les souches virulentes de *S. suis* ne sont que très peu phagocytées par les leucocytes dans des conditions non opsonisantes. Ceci a été démontré par la technique de comptes viables pour les macrophages murins (Segura *et al.* 1998), par diverses techniques de coloration pour les neutrophiles humains (Salasia *et al.* 1995), les macrophages murins (Brazeau *et al.* 1996) et les monocytes porcins (Charland *et al.* 1996) ainsi que par cytométrie en flux pour les neutrophiles et les monocytes porcins (Lun and Willson 2004).

L'accroissement de la phagocytose par l'addition de sérum contenant du complément est aussi controversé. Il a été rapporté que ce facteur n'aide que très peu la phagocytose pour les macrophages alvéolaires porcins (Smith *et al.* 1999) et les neutrophiles humains (Salasia *et al.* 1995) mais qu'il contribue grandement à la phagocytose d'un mutant non capsulé (Lun and Willson 2004). D'un autre côté, il est rapporté que l'ajout de sérum désactivé pour le complément aide significativement à la

phagocytose de *S. suis* par les macrophages murins (Brazeau *et al.* 1996) et les monocytes porcins (Charland *et al.* 1996) et que l'influence sur la phagocytose de *S. suis* serait due à d'autres composants du sérum. Ce point nécessite donc plus d'éclaircissement. L'apport des anticorps à la phagocytose de *S. suis* n'est que peu étudié, mais il a été rapporté que l'opsonisation de la bactérie avec un anticorps monoclonal dirigé contre la capsule augmente grandement la phagocytose de *S. suis* par des monocytes porcins (Charland *et al.* 1997).

Il a été rapporté que la capsule protège *S. suis* de la phagocytose alors que les mutants non encapsulés sont rapidement phagocytés et détruits. (Wibawan and Lammler 1994; Charland *et al.* 1998; Segura *et al.* 1998; Smith *et al.* 1999; Lun and Willson 2004). Par contre, il y a adhésion de *S. suis* encapsulé aux macrophages murins (Segura and Gottschalk 2002). De plus, la capsule de *S. suis* inhibe le processus de signalisation menant à la phagocytose chez ces cellules (Segura *et al.* 2004). *S. suis* encapsulé peut donc voyager dans la circulation et adhérer en grand nombre aux monocytes sans être phagocyté, appuyant la théorie du cheval de Troie modifiée (Gottschalk and Segura 2000). L'utilisation de techniques différentes pour chaque étude pourrait expliquer les variations dans les divers résultats.

1.6.3.2 Inflammation

Les interactions de *S. suis* avec les leucocytes sont importantes dans l'apparition de l'inflammation au cours de la pathogenèse de cette bactérie. En effet, une réponse inflammatoire aiguë qui résulte de l'invasion et de la multiplication des souches pathogènes dans les tissus porcins est caractéristique des infections causées par *S. suis* (Gottschalk and Segura 2000). Des études d'histopathologie ont pu démontrer la présence d'infiltrats de neutrophiles et de cellules mononucléaires dans les lésions, d'inflammation et de nécrose du cerveau et de la moelle épinière des porcs atteints de méningites dues à *S. suis* (Clifton-Hadley 1983; Sanford 1987) ainsi que des infiltrats de macrophages dans les pneumonies (Madsen *et al.* 2002). Il a été démontré que *S. suis* induit l'apparition de molécules d'adhésion (ICAM-1, CD11a/CD18, CD11c/CD18) sur les monocytes humains (Al-Numani *et al.* 2003) confirmant que *S. suis* contribue au recrutement des leucocytes

aux sites d'infection et au développement de l'inflammation. De plus, il a été rapporté que *S. suis* stimule les cellules à produire des cytokines pro inflammatoires. Il a été démontré qu'il incite à la production de TNF- α et de IL-6 par les macrophages murins (Segura *et al.* 1999) et à la production de TNF- α , IL-6, IL-1, IL-8 et MCP-1 par les monocytes humains (Segura *et al.* 2002). TNF- α est la première cytokine détectée mais son niveau diminue plus rapidement que les autres cytokines qui demeurent à un haut niveau. Cette production de cytokines est induite par l'activation des CD14 et TLR2 suite à leur contact avec la capsule polysaccharidique et la paroi de *S. suis* (Segura, observations non publiées). La suilysine quant à elle induit la production de TNF- α par les monocytes humains ainsi que la production de IL-6 par les macrophages alvéolaires et les monocytes porcins (Lun *et al.* 2003). Les cytokines TNF- α , IL-1 et IL-8 sont considérées comme essentielles à l'initiation de l'inflammation, au recrutement des leucocytes ainsi qu'à la perméabilité de la BHM (Segura *et al.* 1999; Gottschalk and Segura 2000). La surproduction de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoire suite à la présence de *S. suis* contribue donc à l'apparition des signes cliniques. Malgré tout, le prétraitement des porcelets par la cytokine IL-1 β avant l'inoculation de *S. suis* réduit la sévérité de l'infection et ce, due au renforcement de l'immunité innée et à l'activation des fonctions des neutrophiles (Shi *et al.* 1994) révélant que les cytokines aident aussi à l'élimination de la bactérie. Ceci signifie qu'une certaine concentration de cytokines est nécessaire à la défense de l'organisme contre *S. suis* mais que la surproduction de celles-ci peut induire des dommages et aider à la pathogenèse de la bactérie.

1.6.4 Interactions de *S. suis* avec la BHM

Puisque la capsule inhibe la phagocytose, *S. suis* peut circuler dans le sang et entrer en contact avec la barrière hémato-méningée (BHM) composée entre autre des cellules endothéliales des microvaisseaux (BMEC) (Charland *et al.* 2000). La BHM forme une barrière qui sépare le cerveau du compartiment intravasculaire et maintient l'homéostasie de l'environnement du système nerveux central (Huang and Jong 2001). Durant la méningite la perméabilité de la BHM augmente et ceci est du à la séparation des jonctions serrées intracellulaires pour augmenter la pinocytose (Tenenbaum *et al.* 2005). Le mécanisme que *S. suis* utilise pour traverser la BHM est inconnu.

Les souches capsulées et non capsulées adhèrent similairement aux BMEC humains (Charland *et al.* 2000). Puisque la souche non capsulée lie les cellules épithéliales à un niveau plus élevé (Lalonde *et al.* 2000), ceci suggère que le degré d'encapsulation de *S. suis* serait modulé selon l'étape d'infection. Il a donc été proposé que l'encapsulation est réduite durant la colonisation des cellules épithéliales pour permettre une plus grande exposition des adhésines et une meilleure adhérence. Une fois que *S. suis* est dans la circulation sanguine, l'encapsulation serait augmentée pour protéger les bactéries du système immunitaire (Charland *et al.* 2000). L'adhésion de *S. suis* aux BMEC humains induit la production de cytokines pro-inflammatoires dont IL-6, IL-8 et MCP-1 (Vadeboncoeur *et al.* 2003). Ces cytokines chimioattractantes provoquent la migration des neutrophiles et des monocytes et donc l'induction de l'inflammation au niveau de la BHM. Ceci fait augmenter le volume de CSF menant à une pression intra-crâniale et éventuellement à la méningite.

Il a récemment été démontré que *S. suis* sérotype 2 adhère et envahit des BMEC porcins. Aussi, il a été observé que les bactéries intracellulaires peuvent survivre 7 heures dans ces cellules (Vanier *et al.* 2004) indiquant une voie possible pour traverser la BHM et atteindre le cerveau. De plus, seulement les souches Hem+ sont toxiques pour les cellules de la BHM, soit des BMEC humains et des cellules du plexus choroïdes porcines, et cette toxicité est inhibée par l'addition d'anticorps anti-hémolysine (Charland *et al.* 2000; Tenenbaum *et al.* 2005). La pathogénie des souches Hem+ et Hem- pourrait donc être différente.

En résumé, malgré les informations apportées par les récentes découvertes à propos de *S. suis*, les facteurs de virulence ainsi que la pathogénèse de la méningite causée par cette bactérie demeurent méconnus. Les recherches doivent être poursuivies afin de prévenir les infections causées par *S. suis* autant chez les porcs que chez les humains.

2 Neutrophiles

2.1 Aspect général des neutrophiles

2.1.1 Description

Les neutrophiles sont des leucocytes dont le rôle est critique autant pour l'immunité innée qu'humorale. Ce sont les premières cellules effectrices à arriver aux sites d'infection en grand nombre afin de contrôler les microorganismes avant l'établissement d'une réponse spécifique. Leur rôle est multiple puisqu'ils peuvent phagocyter les particules étrangères et les détruire grâce aux enzymes contenues dans les différents granules. Ce sont d'ailleurs les leucocytes qui sont associés à cette fonction de façon la plus importante autant qualitativement que quantitativement (Wade and Mandell 1983). Les neutrophiles participent aussi au processus d'inflammation par la dégranulation et par la production de cytokines afin d'attirer les autres cellules du système immunitaire.

Les neutrophiles proviennent des cellules myéloïdes. Grâce à plusieurs facteurs de croissance, tels que les cytokines G-CSF, GM-CSF et IL-3, ces cellules vont passer par plusieurs étapes de maturation jusqu'à la formation de cellules matures nommées neutrophiles (Kuby *et al.* 2001). Ces cellules matures, qui ne sont ensuite plus capables de division, se retrouvent dans la circulation sanguine pendant 7 à 10 heures avant de migrer dans les tissus suite à une stimulation par des molécules chimioattractantes (Kuby *et al.* 2001). Si les neutrophiles ne sont pas stimulés, ils vont mourir par apoptose (Abbas *et al.* 2000). Une fois dans les tissus, les neutrophiles vont y accomplir leurs fonctions et y demeurer pour un maximum de 72 heures (Kuby *et al.* 2001).

Les neutrophiles sont désignés ainsi parce qu'ils contiennent 50 à 200 granules dans leur cytoplasme. En effet, ceux-ci peuvent être colorés autant par les réactifs acides que basiques (Kuby *et al.* 2001). Les neutrophiles sont aussi nommés polymorphonucléaires, ou PMN, dû à leur noyau qui est segmenté en lobes connectés. Cette conformation du noyau facilite la migration des neutrophiles entre les cellules (Wade and Mandell 1983).

2.1.2 Molécules chimioattractantes

Les molécules chimioattractantes sont générées aux sites d'inflammation et sont des éléments importants pour l'activation et la migration des neutrophiles. Lorsqu'il y a inflammation, les neutrophiles sont attirés par ces molécules. Ils arrivent donc rapidement

aux sites d'infection pour phagocyter les microbes et produire des substances tuant ces microbes.

La migration des neutrophiles vers les sites d'inflammation se produit en plusieurs étapes. Les neutrophiles non activés circulent continuellement dans le sang. Les neutrophiles sont alors en état dormant et interagissent transitoirement avec les molécules de l'endothélium sans suivre une direction précise. S'il y a inflammation, il y aura apparition de nouvelles molécules d'adhésion sur les des cellules endothéliales telles que la E-sélectine et la P-sélectine. Les neutrophiles vont alors lier les cellules endothéliales par la L-sélectine et PSGL-1 et se déplacer en roulant à la surface de l'endothélium (Abbas *et al.* 2000; Kuby *et al.* 2001; Witko-Sarsat *et al.* 2000; Burg and Pillinger 2001). Ce stade est donc nommé étape du « rolling ». C'est alors que les molécules chimioattractantes présentes peuvent activer les neutrophiles en liant ces leucocytes par des récepteurs couplés à une protéine G.

Les molécules chimioattractantes incluent des cytokines, alors nommées chimiokines. Plus particulièrement, IL-8 est spécifique aux neutrophiles et est leur chimioattractant majeur. En effet, il n'attire pas les monocytes et l'addition d'anticorps anti IL-8 inhibe complètement le recrutement des neutrophiles aux sites d'inflammation (Witko-Sarsat *et al.* 2000). IL-8 est produit par les cellules endothéliales mais c'est aussi la cytokine sécrétée le plus abondamment chez les neutrophiles. Il y a donc un mécanisme d'auto activation chez ce type de cellules. Certains composants du système du complément aussi sont chimiotactiques pour les neutrophiles tels que les fragments dérivés de C3. Par contre, c'est le fragment C5a qui a le plus d'effet sur ces leucocytes. Des peptides bactériens tels que le FMLP ou des métabolites cellulaires comme le leukotriene B₄ (une molécule lipidique générée par la dégradation de l'acide arachidonique), PAF (facteur activant les plaquettes) et les fibrinopeptides sont aussi chimiotactiques pour les PMN (Wade and Mandell 1983; Witko-Sarsat *et al.* 2000; Burg and Pillinger 2001; Kuby *et al.* 2001).

2.1.3 Extravasation / diapédèse

Les fonctions des neutrophiles nécessitent qu'ils migrent au travers de l'endothélium afin qu'ils puissent rejoindre les sites d'infections. Ce phénomène se nomme extravasation, diapédèse ou transmigration.

Après liaison avec les molécules chimioattractantes, les neutrophiles sont activés. Il y a alors un réarrangement du cytosquelette pour que ces leucocytes passent d'une forme ronde à une forme allongée et motile. Il y a aussi un changement de conformation des intégrines $\beta 2$ présentes à la surface des neutrophiles. Celles-ci, par la liaison des ICAM-1, permettent une adhésion ferme des neutrophiles aux cellules endothéliales (Witko-Sarsat *et al.* 2000; Burg and Pillinger 2001; Kuby *et al.* 2001). Après l'adhésion, les neutrophiles doivent se rendre au site d'infection extravasculaire par diapédèse en passant entre les cellules ou directement au travers de celles-ci.

Lorsque les neutrophiles traversent l'endothélium en s'infiltrant entre les cellules, ils doivent étendre leurs pseudopodes entre les cellules et défaire les jonctions adhésives situées entre celles-ci pour avoir assez d'espace pour migrer. Ce mécanisme est nommé diapédèse paracellulaire. Les neutrophiles utilisent donc l'élastase endogène pour induire la rétraction des cellules endothéliales de manière suffisante pour passer entre celles-ci. Ils vont ainsi pouvoir dégrader la VE-cadherine et la β -catenine des jonctions adhésives de façon réversible. Ce processus est très régulé et se produit sans induction de la dégranulation. (Witko-Sarsat *et al.* 2000; Kvietys and Sandig 2001). Aussi, les cellules endothéliales peuvent être induites à participer activement à la migration de ces leucocytes en se rétractant les unes des autres. Les neutrophiles peuvent ainsi induire la contraction des cellules pour former un GAP entre celles-ci pour pouvoir traverser l'endothélium. Cet espace est suffisant pour laisser passer les neutrophiles sans dommages (Kvietys and Sandig 2001).

Les neutrophiles peuvent aussi traverser directement les cellules en s'insérant au travers des pores qui transpercent le cytoplasme sans causer de dommages à l'endothélium. Ils insèrent donc leurs pseudopodes dans des calveolae ou dans des fenestraes. Les

calveolae sont des vésicules de transport qui font la connexion entre les deux côtés de la cellule. Ils forment donc un petit passage au travers de la cellule. Les fenestrae, dont l'ouverture est contrôlée par un diaphragme, ont un diamètre de 50 nm (Kvietys and Sandig 2001).

2.1.4 Granules des neutrophiles

Les molécules toxiques nécessaires à la destruction des microorganismes par les neutrophiles sont contenues dans des granules. Ceux-ci fusionnent avec le phagosome pour détruire les microorganismes internalisés ou alors fusionnent avec la membrane extracellulaire du neutrophile pour relâcher leur contenu lors de la dégranulation. Ce mécanisme est cependant non spécifique et le contenu des granules est aussi toxique pour les cellules hôtes. Le cytoplasme des neutrophiles contient des granules de quatre types qui sont formés lors du développement des neutrophiles (Witko-Sarsat *et al.* 2000).

Les granules azurophiles sont les premiers à être formés, soit durant l'étape promyélocyte. Ils contiennent en majorité les défensines, la myéloperoxydase (MPO), les protéinases 3, les azurocidines, les cathepsines G, les protéines de perméabilité bactéricide (BPI) ainsi que l'élastase (Chertov *et al.* 2000; Witko-Sarsat *et al.* 2000; Burg and Pillinger 2001). Ces granules sont en fait des lysosomes puisqu'ils font la fusion avec la vacuole phagocytaire pour éliminer les bactéries.

Les défensines peuvent détruire autant les bactéries à Gram négatif que positif. Ce sont de petits peptides cationiques très cytotoxiques, due à leur action de perméabilisation de la membrane.

Les BPI sont spécifiques aux bactéries à Gram négatif car elles se lient aux LPS et augmentent alors la perméabilité de la membrane externe. Elles sont cytotoxiques à de très petites quantités.

L'élastase est une protéinase à sérine qui dégrade les protéines de la membrane externe des bactéries à Gram négatif et une variété de protéines de la matrice extracellulaire (fibronectine, laminine, vitronectine, collagène de type IV).

La MPO catalyse la formation de plusieurs réactifs toxiques impliqués dans l'activité microbicide des neutrophiles (section 2.2.1.3; (Klebanoff 2005)).

La protéinase 3 amplifie la réponse inflammatoire car elle augmente le clivage et l'activation du TNF- α et de IL-1 β . Elle induit aussi la production de IL-8 par les cellules endothéliales (Chertov *et al.* 2000; Witko-Sarsat *et al.* 2000; Burg and Pillinger 2001).

Les azurocidines ont un grand spectre d'activité antimicrobienne, particulièrement chez les bactéries à Gram négatif. Ces molécules sont aussi reconnues comme étant des médiateurs de l'inflammation et comme étant chimioattractantes pour les monocytes (Watorek 2003).

La cathepsine G est aussi une protéinase à sérine. Elle dégrade les protéines plus lentement que l'élastase. Elle est aussi une molécule chimioattractante pour les monocytes et participe au recrutement de ceux-ci au site d'inflammation.

Les granules spécifiques sont formés plus tard dans la maturation des neutrophiles, soit durant l'étape nommée métamyélocyte. Ils contiennent le deux tiers du lysozyme du neutrophile, des collagénases, des lactoferrines et des gélatinases. Ces granules fusionnent aussi avec le phagosome pour détruire les bactéries avec leur contenu.

Le lysozyme coupe les liens de l'acide N-acétylmuramic, ce qui endommage la paroi bactérienne et mène à la mort de celle-ci par lyse cellulaire.

Les collagénases détruisent préférentiellement le collagène non dénaturé et doivent être activées par oxydation par le HOCl.

Les lactoferrines séquestrent le fer libre, empêchant les bactéries de l'atteindre. Ce peptide augmente aussi la perméabilité des bactéries au lysozyme.

Les gélatinases dégradent le collagène dénaturé et le collagène de type IV et V. Elles dégradent aussi certaines chimiokines comme IL-8 pour les rendre plus biologiquement actives (Smith 1994; Witko-Sarsat *et al.* 2000; Burg and Pillinger 2001).

Dans les neutrophiles matures, les granules gélatinases et sécrétoires sont finalement formés. Les granules gélatinases sont semblables pour leur contenu aux granules spécifiques mais ont la particularité d'être très concentrés en gélatinase. Les granules sécrétoires ont des molécules d'adhésion à la surface pour excréter facilement leur contenu hors de la cellule. Elles contiennent le cytochrome b_{558} (un composant de la NADPH oxydase) et des protéines du plasma prises par endocytose (Burg and Pillinger 2001).

La stimulation des neutrophiles induit la sécrétion extracellulaire du contenu des granules, ou dégranulation, selon l'ordre suivant : sécrétoire, gélatinase, spécifique et azurophile.

2.2. Phagocytose par les neutrophiles

2.2.1. Phagocytose en général

2.2.1.1. Activation des mécanismes phagocytaires

Comme mentionné précédemment, les neutrophiles sont activés par la présence de molécules chimioattractantes mais aussi par des hormones liées au stress et par les cytokines comme TNF- α , IL-1 et GM-CSF présentes aux zones d'inflammation (Smith 1994). De plus, les intégrines, qui lient les ICAMs lors de l'adhésion à l'endothélium, procurent aux neutrophiles un signal co-stimulateur qui accélère et complète l'activation des neutrophiles (Schnitzler *et al.* 1999). Leur pouvoir phagocytaire sera alors maximisé par l'apparition de certains récepteurs de surface et par leur activité microbicide qui sera enclenchée. Les neutrophiles sont donc prêts à remplir leurs fonctions, soit l'ingestion et la destruction des microorganismes envahisseurs, lorsqu'ils arrivent aux sites d'infection

2.2.1.2 Récepteurs impliqués dans la phagocytose

Les neutrophiles doivent d'abord reconnaître et lier les bactéries lors de la phagocytose. Celle-ci est habituellement initiée par la liaison et la coopération de plusieurs récepteurs simultanément. En effet, les neutrophiles sont dotés de récepteurs permettant de reconnaître directement les molécules à la surface des microbes. Par exemple, les PGLYRP (protéines reconnaissant le peptidoglycane) qui lient le peptidoglycane des bactéries à Gram positif et le LPS de bactéries à Gram négatif, les CD14 qui lient la membrane externe des bactéries et les récepteurs Toll-like, permettent aux neutrophiles de reconnaître les bactéries, même si la réponse immunitaire spécifique n'est pas encore développée (Kobayashi *et al.* 2003; Echchannaoui *et al.* 2005; Parker *et al.* 2005).

Malgré cette capacité, la liaison aux bactéries est grandement améliorée si les microorganismes sont opsonisés. Ceux-ci sont en effet alors plus facilement reconnus et ingérés avec plus d'avidité.

Les récepteurs Fc γ présents à la surface des neutrophiles reconnaissent la portion Fc des IgG lorsque les bactéries sont opsonisées par cette immunoglobuline. Les neutrophiles expriment constitutivement les récepteurs Fc γ RII et Fc γ RIII et peuvent exprimer les récepteurs Fc γ RI, qui ont une plus haute affinité de liaison s'ils sont en présence de IFN- γ (Smith 1994; Kobayashi *et al.* 2003; Lee *et al.* 2003).

Les neutrophiles peuvent aussi lier les bactéries opsonisées par les produits du complément. CR1 (CD35) peut lier les fragments C3b, iC3b et C4b. Les récepteur CR3 (CD11b/CD18) et CR4 (CD11c/CD18) peuvent lier quant à eux le fragment iC3b (Kobayashi *et al.* 2003; Lee *et al.* 2003). Les neutrophiles peuvent donc phagocytter les bactéries en absence d'anticorps, avant que la réponse spécifique prenne place.

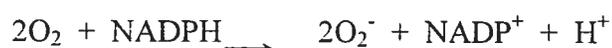
2.2.1.3 Internalisation et élimination des bactéries

L'attachement des pathogènes aux récepteurs induit une cascade signalétique différente dépendamment du récepteur impliqué, ce qui provoque un remodelage de la membrane du neutrophile. Lorsque les récepteurs Fc γ sont impliqués, il y a phosphorylation des tyrosines kinases et une cascade qui mène à une invagination de la membrane. Ensuite, il y a internalisation vigoureuse de la bactérie grâce à la formation de pseudopodes. Par contre, si les récepteurs du complément sont impliqués, la bactérie est internalisée dans le neutrophile en s'enfonçant à l'intérieur de celui-ci (Kwiatkowska and Sobota 1999; Witko-Sarsat *et al.* 2000; Lee *et al.* 2003). La bactérie se retrouve ainsi dans un phagosome à l'intérieur du neutrophile et celui-ci acquiert la machinerie nécessaire à la destruction du microorganisme. Les neutrophiles combinent des mécanismes oxygène dépendants et oxygène indépendants qui fournissent les molécules bactériostatiques et bactéricides essentielles à la digestion des bactéries.

L'activité oxygène indépendant implique l'acquisition d'une ATPase membranaire qui internalise des protons dans le phagosome, réduisant le pH de celui-ci à 5.5. Ce bas pH crée des conditions favorables à la dégradation des microorganismes. L'activité oxygène

indépendant comprend aussi la fusion des granules décrits précédemment au phagosome, formant un phagolysosome. Puisque l'espace de celui-ci est minime, la concentration d'enzymes y devient très élevée (Hampton *et al.* 1998; Lee *et al.* 2003).

Le mécanisme dépendant d'oxygène est aussi nommé flambée respiratoire. Après la formation du phagolysosome, il y a assemblage du système NADPH oxydase au niveau de la membrane. Ce complexe est formé de composants membranaires, dont le flavocytochrome b_{558} qui est le composant central, et cytosoliques qui s'associent par translocation dans la membrane. Le NADPH oxydase fait la réaction suivante :



Il transforme donc l'oxygène en anions superoxydes. Il aide aussi à l'augmentation du pH dans le phagolysosome (Lee *et al.* 2003; Segal 2005). Les O_2^- sont très rapidement convertis en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par l'enzyme superoxide dismutase. Ces deux composés ont une certaine efficacité bactériostatique mais ne sont pas assez réactifs pour être complètement bactéricides. Ils sont rapidement convertis en composés plus puissants, mais qui peuvent aussi créer des dommages aux cellules hôtes (Dahlgren and Karlsson 1999). En effet, la présence de fer peut transformer le peroxyde en HO^- et la myéloperoxydase (MPO) des granules azurophiles peut catalyser le peroxyde d'hydrogène en acide hypochloreux (HOCl) et d'autres produits réactifs comme la chlorine, des chloramines, des radicaux hydroxyles, et l'ozone. L'acide hypochloreux est l'oxydant le plus bactéricide des neutrophiles (Smith 1994; Hampton *et al.* 1998; Klebanoff 2005; Segal 2005).

La NO-synthétase produit des réactifs intermédiaires d'azotes (NOS), comme l'oxide nitrique (NO) qui peut réagir avec l'oxygène pour former un oxydant plus fort, soit la peroxynitrite ($OONO^-$). Celle-ci est toxique autant pour les microorganismes que pour l'hôte (Smith 1994; Witko-Sarsat *et al.* 2000).

2.2.1.4 Résistance aux mécanismes phagocytaires

La résistance à la phagocytose est un phénomène plus commun pour les macrophages puisque ceux-ci ont une durée de vie plus longue et que les neutrophiles ont

une meilleure capacité bactéricide (Kobayashi *et al.* 2003). Malgré tout, certaines bactéries sont résistantes aux mécanismes phagocytaires des neutrophiles grâce à leurs différents facteurs de virulence.

Par exemple, il a été rapporté que *Staphylococcus aureus*, le plus virulent des staphylocoques, est phagocyté par les neutrophiles mais n'est pas tué par ceux-ci. En effet, les neutrophiles isolés de souris infectées avec *S. aureus* contiennent des bactéries viables et infectieuses (Gresham *et al.* 2000). Cette résistance est due à la capsule (Cunnion *et al.* 2003) et au fait que *S. aureus* est résistant à la défensine contenue dans les granules azurophiles des neutrophiles (Collins *et al.* 2002; Mayer-Scholl *et al.* 2004). Ceci contribue à la persistance et la pathogénie de cette bactérie. Plus précisément, le locus *dlt* induit l'incorporation de D-alanine dans les acides téichoïques, baissant la charge négative nette de la surface de la bactérie. Ceci amène la répulsion de la défensine, qui est chargée positivement. La bactérie est donc phagocytée mais tuée avec une moins grande efficacité par les neutrophiles. Les mutants ne possédant pas ce facteur sont alors moins virulents chez la souris (Collins *et al.* 2002; Mayer-Scholl *et al.* 2004). Par ailleurs, la présence de complément et d'anticorps aide à la phagocytose et à la destruction de *S. aureus* par les neutrophiles (Allen 2003; Cunnion *et al.* 2003).

Yersinia enterocolitica quant à lui empêche son internalisation à l'aide d'un système de sécrétion de type III qui injecte les protéines effectrices dans le cytosol du neutrophile auquel la bactérie est attachée (Cornelis 2002). La protéine Yop H prévient l'accroissement de la concentration intracellulaire de Ca^{++} dans le neutrophile nécessaire à la phagocytose et à la dégranulation et la protéine Yop E dépolymérise l'actine du neutrophile. De plus, Yop J/P induit l'apoptose du neutrophile ciblé.

Le cas d'*Anaplasma phagocytophilum* est aussi intéressant puisque ce coque à Gram négatif est la seule bactérie à pouvoir coloniser et se répliquer à l'intérieur des neutrophiles (Carlyon and Fikrig 2003). La liaison et la phagocytose de *A. phagocytophilum* sont médiées par le PSGL-1 des neutrophiles (Herron *et al.* 2000). Une fois internalisé dans une vacuole, *A. phagocytophilum* prévient la fusion des lysosomes à la vacuole dans laquelle il

se trouve (Gokce *et al.* 1999). Aussi, cette bactérie inhibe la production des réactifs à oxygène en empêchant la transcription des composant du NADPH oxydase (Banerjee *et al.* 2000; Carlyon and Fikrig 2003) et en dégradant les composants déjà formés (Mott *et al.* 2002). Puisque *A. phagocytophilum* parvient à retarder l'apoptose des neutrophiles (Scaife *et al.* 2003) et à inhiber l'activité bactéricide, il peut se répliquer à l'intérieur des neutrophiles et y former des microcolonies (Carlyon and Fikrig 2003).

2.2.2 Phagocytose des streptocoques

Comme mentionné précédemment avec *S. suis* (section 1.6.3.2), les mécanismes phagocytaires des neutrophiles envers les streptocoques sont aussi très intéressants.

La bactérie *Streptococcus pyogenes* (*Streptococque* du groupe A, GAS) échappe aux réponses effectrices des neutrophiles par différents moyens. Tout d'abord, GAS détruit le composant C5 du complément par la protéine C5a peptidase, ce qui diminue le recrutement et l'activation des neutrophiles (DeMaster *et al.* 2002). Aussi, il a été démontré que la capsule de GAS est impliquée dans la résistance de cette bactérie à la phagocytose par les neutrophiles (Dale *et al.* 1996). De plus, GAS sécrète une protéine homologue à l'intégrine Mac-1 des leucocytes. Celle-ci se lie aux récepteurs Fc γ des neutrophiles, ce qui les rend anergiques. Ils sont alors incapables de produire des réactifs à oxygène et de phagocyter GAS (Lei *et al.* 2001). La protéine M de GAS est le facteur de virulence le plus important pour la résistance au système immunitaire. Il est connu que cette protéine diminue l'opsonisation de GAS en limitant l'attachement de C3b à sa surface (Lancefield 1962; Jacks-Weis *et al.* 1982) et qu'elle peut directement inhiber l'adhésion de la bactérie avec le CR3 des neutrophiles afin d'empêcher la phagocytose (DeMaster *et al.* 2002; Weineisen *et al.* 2004). Les Streptocoques du groupe A qui expriment la protéine M et qui sont tout de même phagocytés peuvent survivre dans les neutrophiles et demeurer infectieux (Medina *et al.* 2003; Staali *et al.* 2003). En effet, les protéines M inhibent la maturation du phagosome en empêchant la fusion des granules azurophiles à celui-ci (Bauer and Tapper 2004). Aussi, une fois phagocyté, GAS active le système de régulation I κ B-I κ B qui induit la transcription des gènes nécessaires à la survie dans le phagosome, soit des gènes qui

détoxifient les ROS, et des gènes impliqués dans la synthèse de la paroi cellulaire (Voyich *et al.* 2003; Voyich *et al.* 2004).

Chez les Streptocoques du groupe B (GBS), il est reconnu que la capsule contenant de l'acide sialique inhibe l'action du complément et par le fait même, la phagocytose par les neutrophiles (Edwards *et al.* 1982; Marques *et al.* 1992; Albanyan and Edwards 2000). Les neutrophiles ne peuvent phagocyter et détruire efficacement GBS que s'il est opsonisé par des anticorps spécifiques et par le composant C3 du complément (Baltimore *et al.* 1977; Hall *et al.* 1994; Albanyan and Edwards 2000). Néanmoins, il a été démontré que la pré-stimulation des neutrophiles par l'incubation de ceux-ci avec les cytokines TNF- α , G-CSF ou GM-CSF aide à induire la phagocytose et l'élimination de GBS (Campbell and Edwards 2000). D'autres facteurs de virulence sont importants chez GBS. La toxine β hémolysine/cytolysine (β H/C) est très cytotoxique pour les neutrophiles et induit l'apoptose de ceux-ci, contribuant à la survie de GBS dans la circulation sanguine. Elle participe aussi à la survie des GBS à l'intérieur des phagosomes des neutrophiles puisqu'elle minimise les effets des réactifs à oxygènes (Liu *et al.* 2004). La protéine de surface C5a-ase détruit le composant C5 du complément et réduit l'opsonisation de GBS. Celui-ci est alors moins phagocyté par les neutrophiles (Takahashi *et al.* 1995). Cette protéine est par contre très immunogène et des anticorps dirigés contre celle-ci aident à la destruction de tous les sérotypes capsulaires de GBS par les neutrophiles (Cheng *et al.* 2001).

2.2.3 Étude de la phagocytose par les neutrophiles (méthodes)

L'étude des fonctions des neutrophiles est essentielle puisque ce sont les premières cellules effectrices à arriver aux sites d'infections. Elle est cependant laborieuse car les neutrophiles sont des cellules primaires éphémères et les manipulations doivent être effectuées immédiatement après la récolte du sang. De plus, puisque ces cellules n'adhèrent pas aux surfaces, les méthodes d'étude sont limitées (Hampton and Winterbourn 1999).

Ainsi, beaucoup étudient la phagocytose par les neutrophiles en incubant les bactéries et les neutrophiles ensemble au temps désiré. Le nombre de bactéries ayant

survécu est ensuite déterminé à l'aide du compte des colonies produites par les bactéries viables. Ce test mesure en fait l'effet bactéricide des neutrophiles envers les bactéries autant de façon intracellulaire qu'extracellulaire. Cette méthode est efficace pour déterminer si une bactérie est résistante aux neutrophiles mais elle ne peut déterminer le nombre de bactéries ingérées et elle est souvent confondue avec la phagocytose.

Afin d'étudier la phagocytose par les neutrophiles, d'autres utilisent la méthode de protection aux antibiotiques où la bactérie et les neutrophiles sont incubés ensemble au temps désiré. Puisque les neutrophiles sont des cellules non adhérentes, un lavage différentiel (où une centrifugation à basse vitesse permet de séparer les neutrophiles, qui se retrouvent ainsi dans le culot, des bactéries, qui sont alors dans le surnageant) doit être effectué après le temps d'incubation pour éliminer les bactéries non ingérées. Des antibiotiques sont ensuite ajoutés afin d'éliminer les bactéries qui n'ont pas été phagocytés mais qui sont adhérentes à la surface des neutrophiles. Après avoir laissé agir l'antibiotique, ce dernier est enlevé par lavages et on procède à un compte des bactéries restantes, soit internalisées par les neutrophiles (Gresham *et al.* 2000; Medina *et al.* 2003). Une des difficultés de ce test réside dans le fait que les neutrophiles doivent être incubés avec les bactéries pour une période prolongée afin de laisser agir les antibiotiques. Puisque les neutrophiles ont une activité bactéricide rapide, une certaine quantité de bactéries phagocytées seront tuées et ne seront pas dénombrées lors des comptes bactériens. Le lavage différentiel, pour sa difficulté d'exécution, complique aussi cette méthode. Une nouvelle méthode, où les neutrophiles sont adhérents au fond de puits de culture cellulaire par du collagène, peut remédier à ce problème. De plus, l'adhésion effectuée dans cette méthode active les neutrophiles de façon semblable à ce qui se produit *in vivo* (Simons *et al.* 2005).

Les études de la phagocytose par les neutrophiles se font aussi à l'aide de la cytométrie en flux, une méthode rapide qui nécessite de petits volumes d'échantillon. Pour ce faire, les neutrophiles et les bactéries (préalablement colorées pour qu'elles soient fluorescentes) sont mis en contact et la phagocytose des bactéries est mesurée à différents temps. La surface des bactéries peut être teinte par des colorants fluorescents comme le

FITC (Valdivia and Falkow 1998) mais ceux-ci peuvent interférer avec des protéines de surface importantes pour la virulence des bactéries (Weingart *et al.* 1999). Une transformation des bactéries par le gène de la GFP peut éviter ce problème (Valdivia and Falkow 1998; Weingart *et al.* 1999) et des mutants semblables ont d'ailleurs déjà été créés avec *S. suis* (Lun and Willson 2004). La méthode de cytométrie en flux n'est cependant pas quantitative et elle ne permet pas de distinguer les bactéries adhérees (extracellulaires) de celles internalisées (intracellulaires) par les neutrophiles. Certains auteurs tentent de remédier à ceci avec le « quenching » qui cache la fluorescence des bactéries extracellulaires. Les colorants utilisés alors sont le cristal violet, qui peut par contre s'infiltrer dans les neutrophiles et masquer aussi la fluorescence des bactéries intracellulaires, et le bleu de trypan, qui ne masque la fluorescence des bactéries extracellulaires que partiellement dans certains cas (Nuutila and Lilius 2005).

De la même façon, la phagocytose peut être observée par microscopie à fluorescence ou électronique à transmission. Cette méthode n'est cependant pas quantitative et est utilisée pour valider des résultats (Hampton and Winterbourn 1999).

2.3 Neutrophiles et méningites

2.3.1 Rôle des neutrophiles dans les méningites en général

Afin de provoquer la méningite, les bactéries doivent pénétrer les méninges, et donc migrer au delà de la BHM. À ce niveau, les neutrophiles peuvent avoir différents effets. Ils peuvent aider à retarder ou encore annuler la méningite en tuant efficacement les bactéries avant qu'elles n'atteignent le système nerveux central. Il a en effet été rapporté qu'une forte concentration de neutrophiles contribue à l'élimination de *Streptococcus pneumoniae* et diminue les dommages au SNC provoqués par cette bactérie (Brandt *et al.* 2004). Les neutrophiles peuvent toutefois participer à la progression des méningites en facilitant la migration des bactéries au SNC. Par exemple, les bactéries *Listeria monocytogènes* et *Niesseria gonorrhoeae* infectent les neutrophiles et les utilisent comme véhicule pour aider leur dissémination au travers de la BHM (Drevets *et al.* 2001; Simons *et al.* 2005).

Les bactéries qui atteignent les fluides cérébro-spinaux peuvent s'y multiplier plus librement car la majeure partie des molécules du système immunitaire y sont exclues. (Leib and Tauber 1999). Les composants bactériens comme les LPS, les acides téichoïques ou les toxines stimulent le relâchement de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines par les cellules du système nerveux central. Cette production de chimiokines ainsi que les produits bactériens attirent les neutrophiles et induisent la migration de ceux-ci au SNC par extravasation (section 2.1.3; (Spanaus *et al.* 1997; Leib and Tauber 1999; Drevets and Leenen 2000) (Doran *et al.* 2003).

Une fois présents au SNC, les neutrophiles vont à leur tour relâcher des cytokines dans le CSF, ce qui va contribuer à la progression de l'inflammation. Aussi, les neutrophiles vont relâcher des réactifs à oxygènes par la dégranulation dans le but de détruire les microorganismes. Par contre, ce processus mène à l'altération des cellules et provoque des lésions au SNC, ce qui aggrave les symptômes de la méningite (Leib and Tauber 1999).

2.3.2 Rôle des neutrophiles dans les méningites causées par *S. suis*

Peu d'études ont été faites sur *Streptococcus suis* en relation avec les neutrophiles. Des infiltrats de neutrophiles au niveau du système nerveux central chez les porcs atteints de méningites causées par *S. suis* ont été observés (Clifton-Hadley 1983; Sanford 1987). Ces leucocytes sont donc impliqués dans la pathogenèse de la méningite causée par cette bactérie. Par cette infiltration au SNC induite par la présence de *S. suis*, ils pourraient contribuer à l'inflammation et à la progression de la méningite. Malgré que la phagocytose, qui est, comme déjà mentionné, controversé, il n'est pas à exclure que les neutrophiles pourraient aider *S. suis* à passer la BHM pour rejoindre le SNC par un mécanisme semblable à la théorie du cheval de Troie modifié proposé pour les macrophages (Gottschalk and Segura 2000). D'autre part, la pré activation des neutrophiles avant l'inoculation de *S. suis* réduit la sévérité de l'infection chez le porcelet (Shi *et al.* 1994) indiquant que les neutrophiles pourraient aider à éliminer les bactéries présentes. Beaucoup de questions demeurent donc non résolues en ce qui concerne l'implication des neutrophiles dans les méningites causées par *S. suis* chez le porc.

III- MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

Phagocytosis and killing of *Streptococcus suis* by porcine
neutrophils

Geneviève Chabot-Roy^a, Philip Willson^b, Mariela Segura^{ac}, Sonia Lacouture^a, Marcelo
Gottschalk^{ac*}

^a*Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc (GREMIP), Faculté de
médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Sicotte, St-Hyacinthe, Québec,
Canada, J2S 2M2*

^b*Vaccine and Infectious Disease Organization, University of Saskatchewan, 120
Veterinary Road, Saskatoon, Sask., Canada, S7N 5E3*

^c*Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine*

* Corresponding author : Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc
(GREMIP), Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte,
Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 2M2, Canada. Tel. : +1 450 773 8521, ext. 18374; fax : +1
450 778 8108. [REDACTED]

Abstract

Streptococcus suis serotype 2 is an important swine pathogen responsible for diverse infections, mainly meningitis. Virulence factors and the pathogenesis of infection are not well known. Neutrophils may play an important role in the pathogenesis of infection given that infiltration by neutrophils and mononuclear cells are frequently observed in lesions caused by *S. suis*. The objective of this work was to study the interactions between *S. suis* serotype 2 and porcine neutrophils. Results showed that suilysin is toxic to neutrophils and this could help *S. suis* evade innate immunity. Moreover, suilysin appears to affect complement-dependent killing by decreasing the opsonization of *S. suis* and the bactericidal capacity of neutrophils. Our results confirm that capsule polysaccharide protects *S. suis* against killing and phagocytosis by neutrophils. We showed that the presence of specific IgG against *S. suis* serotype 2 promoted killing by neutrophils, indicating that the induction of a strong humoral response is beneficial for clearance of this pathogen.

Keywords: *Streptococcus suis*, neutrophils, opsonic phagocytosis, killing, polysaccharide capsule, suilysin

1. Introduction

Streptococcus suis is one of the most important swine pathogens that causes significant economic losses worldwide. To date, 35 serotypes have been described, with type 2 as the most virulent and prevalent serotype [1]. Recently, it has been proposed that two serotypes (serotypes 32 and 34) be excluded from *S. suis* species and re-designated as *Streptococcus orisratti* [2]. *S. suis* is responsible for a wide range of diseases in pigs, including septicaemia, meningitis, toxic-shock syndrome, arthritis, endocarditis, and pneumonia [1]. *S. suis*, especially serotype 2, has also been described as an important zoonotic agent that afflicts people in close contact with infected pigs or pork-derived products [3, 4]. Indeed, recent cases of human disease in Sichuan Province, China were directly linked to a concurrent outbreak of *S. suis* infection in pigs. Symptoms reported in the latest outbreak in China include high fever, malaise, nausea and vomiting, followed by meningitis, subcutaneous haemorrhage, toxic shock and coma in severe cases [5, 6].

Virulence factors of *S. suis* are poorly understood. Since non-encapsulated mutants are non-virulent and rapidly cleared from the bloodstream in pig and mouse models of infection, the polysaccharide capsule (CPS) is the only known virulence factor described thus far [7, 8]. *S. suis* also produces a haemolysin (suilysin; Sly), which has been proposed to be a contributing but not critical virulence factor [9]. This thiol-activated toxin is toxic to epithelial cells, endothelial cells and macrophages [10-15]. However, isogenic suilysin-negative mutants have been shown to be virulent in pig models of infection [16, 17]. Other proposed virulence factors/markers include a muramidase-released protein (MRP) and an extracellular protein factor (EF), as well as different adhesins and enzymes, although their critical role in virulence has yet to be demonstrated [1, 9, 18, 19]. Interestingly, most European and Asian virulent *S. suis* serotype 2 isolates are MRP+, EF+ and Sly+ whereas those from North America are MRP+/-, EF- and Sly- [20, 21]. It has been proposed that European virulent isolates exhibit a higher virulence potential than those from North America [1, 9, 22].

Our understanding of the pathogenesis of *S. suis* infection remains limited, particularly concerning the mechanisms by which this bacterial species travel and disseminate in the bloodstream to reach the central nervous system [9]. An early “Trojan Horse” theory suggested that *S. suis* is taken up by monocytes, allowing the bacteria to survive and travel intracellularly in the circulation [23]. However, it has been shown that only a low number of monocytes contain intracellular bacteria [23], indicating that *S. suis* may also travel extracellularly. In fact, phagocytosis experiments using different techniques, such as vital staining, flow cytometry (with either FITC-labelled or green fluorescent protein (GFP)-transformed bacteria) and antibiotic protection assay, have indicated that *S. suis* is phagocytosed at levels that are either very high [24] or nearly undetectable [7, 8, 25, 26]. Different reports using non-encapsulated mutants have indicated that well encapsulated bacteria resist phagocytosis by murine and porcine monocytes and macrophages [9], thus providing evidence that refutes the likelihood of the “Trojan Horse” theory as a mechanism of bacterial dissemination. In fact, it was recently shown that CPS is able to down-modulate signalling pathways involved in the phagocytic process of macrophages [27]. Based on these observations, a “modified Trojan Horse” theory in which bacteria travel extracellularly while attached to, but not phagocytosed by, monocytes has been proposed [13].

To induce meningitis and septicaemia, *S. suis* must be able to survive in the bloodstream. Previous studies have focused mainly on the interactions between this bacterial species and monocytes/macrophages, but much less is known on the role of neutrophils in *S. suis* infection. These leukocytes, predominant in the bloodstream, are among the earliest cells recruited to sites of infection and provide the first line of host defense. Upon contact with pathogens, neutrophils are rapidly activated for destruction of invading microbes [28-30]. Neutrophils may play an important role in innate immunity against *S. suis* given that they are detected during the early stages of *S. suis* infection, are significantly increased in pigs infected with a virulent strain, and are usually predominant in lesions caused by this pathogen [31-34].

Since neutrophils are normally non-adherent cells, phagocytosis assays must be performed in suspension, which is a fastidious and difficult method. Indeed, few

quantitative phagocytosis assays are available to distinguish free extracellular bacteria from adherent and intracellular ones [35]. In addition, phagocytosis and bactericidal assays may confound each other, leading to misinterpretation of data. Phagocytosis assays are intended for studying the ingestion of bacteria by leukocytes (followed or not by bacterial death), whereas the bactericidal test directly evaluates bacterial killing regardless of the intracellular or extracellular location of bacteria. In this study, we wanted to further elucidate the interactions of European (Sly+) and North American (Sly-) strains of *S. suis* with neutrophils by performing bactericidal and phagocytosis assays using different methods and under different opsonization conditions. The bactericidal activity of neutrophils was compared to that of monocyte-derived macrophages with the aim of better understanding the relative contributions of these two types of phagocytes to *S. suis* pathogenesis.

2. Results

2.1. Suilysin-positive strains can damage neutrophils

To determine whether different strains of *S. suis* are cytotoxic to neutrophils, we performed LDH release measurements. As shown in Fig. 1, only the European strain 31533 and its non-encapsulated mutant B218 were found to be cytotoxic to neutrophils in a time-dependent manner. These strains are known to be suilysin positive. Moreover, in contrast to its parental strain 31533, the suilysin-negative mutant SX911 was not cytotoxic, even after 240 min of exposure at a concentration as high as 10^8 CFU/ml. Interestingly, some differences were observed at 180 min in the levels of cytotoxicity between strain 31533 and its non-encapsulated mutant B218. This is likely due to the fact that 31533 is encapsulated and was not killed by neutrophils, while the non-encapsulated mutant was killed during the assay (see below). At 180 min, the bacterial concentration of wild type 31533 strain (2×10^8 CFU/ml) was higher than that of B218 (1×10^7 CFU/ml). Strain B218 reached the same levels of bacterial concentration as the wild type 31533 strain, but only after a longer incubation time of 240 min (results not shown). Both North American strains (89-1591 and

its CPS-negative mutant M2), which are suilysin-negative, were also not toxic to neutrophils during the entire experimental period.

2.2. Effect of serum on the killing of *S. suis* by neutrophils

To determine whether neutrophils are able to kill *S. suis*, we measured the bactericidal activity of neutrophils against *S. suis* under different serum opsonization conditions. It should be noted that, based on the results described in Fig. 1, the bactericidal test was performed under non-cytotoxic conditions (see Materials and Methods). As shown in Fig. 2, the wild type European 31533 strain was resistant to killing by neutrophils even in the presence of complete serum, while its non-encapsulated mutant B218 was readily destroyed at all conditions. These results confirm the ability of the capsule to protect *S. suis* from phagocytosis, as demonstrated in previous studies [7, 8]. The suilysin-negative mutant SX911 strain was resistant to killing by neutrophils in the absence of opsonization or after opsonization with heat-inactivated serum. However, this strain was significantly more susceptible to killing by neutrophils ($P = 0.03$) following opsonization with complete normal serum. Similarly, the wild type Canadian 89-1591 strain, which normally does not produce suilysin, was also killed in the presence of complete serum ($P = 0.01$). As observed with mutant B218, the non-encapsulated mutant M2 was highly susceptible to killing by neutrophils under all conditions tested.

In general, results similar to those obtained with neutrophils were observed in the bactericidal assay of differentiating monocytes incubated with wild type strains or the suilysin-negative mutant (Fig. 3). However, monocytes showed lower levels of killing of both non-encapsulated mutants, especially the mutant B218, compared to neutrophils. Moreover, differentiating monocytes required a longer period of time to kill *S. suis* than did neutrophils.

To determine whether the suilysin of *S. suis* has an effect on complement-mediated opsonization as proposed above, we evaluated the bactericidal activity of neutrophils against *S. suis* with purified haemolysin. As shown in Fig. 2 and 4, neutrophils efficiently

killed the suilysin-negative mutant in the presence of complete serum. When purified suilysin was added at a non-toxic concentration, neutrophils were no longer able to kill the mutant strain as similarly observed with the wild type European 31533 strain (Fig. 4). Suilysin belongs to the family of cholesterol binding toxins [36] and the addition of cholesterol can inhibit its activity. Indeed, the presence of both suilysin and cholesterol rendered the SX911 mutant susceptible to killing by neutrophils ($P = 0.01$). Furthermore, the capacity of the wild type 31533 European strain to resist killing in the presence of complete serum was also significantly impaired in the presence of cholesterol ($P = 0.001$).

*2.3. Effect of antibodies on the killing of *S. suis* by neutrophils*

The roles of non-specific (control) and specific IgG antibodies in the killing of *S. suis* by neutrophils were studied using the bactericidal assay. For all strains, control IgG had no effect on the killing capacity of neutrophils (Fig. 2; $P > 0.05$ vs. complete serum). In contrast, specific IgG significantly increased neutrophil-mediated killing of the wild type European 31533 strain ($P = 0.008$; specific IgG compared to control IgG). Given that neutrophils efficiently killed the non-encapsulated mutants without opsonization, the addition of specific IgG did not significantly increase their bactericidal ability against these strains. Although the suilysin-negative strains (SX911 and 89-1591) were readily destroyed in the presence of complement, the killing capacity of neutrophils was significantly increased by the addition of specific IgG (Fig. 2; $P = 0.01$).

In general, specific antibodies had a similar effect on the bactericidal activity of differentiating monocytes to that observed with neutrophils for all strains except mutant B218. In fact, the presence of specific IgG further increased the bactericidal activity of differentiating monocytes against this non-encapsulated mutant (Fig. 3).

*2.4. Effect of cytokines on the killing of *S. suis* by neutrophils*

To determine whether different cytokines modulate the ability of neutrophils to kill *S. suis*, neutrophils were pre-stimulated with non-toxic concentrations of recombinant

porcine GM-CSF, IFN- γ , TNF- α , IL-8 or IL-1 β prior to the bactericidal assay. The virulent European 31533 strain opsonized with either inactivated or complete serum was used for these tests because it is highly resistant to neutrophil-mediated killing under these conditions (Fig. 2). Addition of GM-CSF and IL-8 significantly enhanced the bactericidal effect of neutrophils under both conditions of opsonization (Fig. 5; $P < 0.05$). Pre-treatment with TNF- α also significantly increased ($P = 0.03$) the bactericidal activity of neutrophils in the presence of inactivated or complete serum, and this increase occurred to a significantly greater extent with complete versus inactivated serum ($P = 0.01$; complete compared to inactivated serum). Finally, neither IL-1 β nor IFN- γ (at the highest non-toxic doses used) exerted any effect on the bactericidal activity of neutrophils against *S. suis* ($P > 0.05$).

2.5. Phagocytosis by neutrophils in suspension with an antibiotic protection assay did not produce valid results

To evaluate phagocytosis of *S. suis* by neutrophils, we used an antibiotic protection assay that is similar to those performed with monocytes and macrophages [25]. However, the test was performed in suspension because neutrophils are non-adherent cells. After 30 min, neutrophils were separated from free bacteria by differential centrifugation. In preliminary experiments testing cells and bacteria separately, we determined that centrifugation at 82 x g is optimal to pellet cells but not bacteria (data not shown). Next, extracellular bacteria were killed with penicillin G and gentamicin, as previously described for assays with other cells [13, 14, 25]. These antibiotics do not penetrate eukaryotic cells [37]. The number of internalized *S. suis* was approximately the same, 10^4 CFU/ml, for all strains regardless of whether or not they were opsonized with complete serum and/or antibodies. This was not due to a lack of efficacy of the antibiotics to kill extracellular bacteria because controls containing bacteria only were effectively killed using the same antibiotic doses. Although we suspected that this method was not sufficiently discriminative to evaluate phagocytosis, the results were somewhat unexpected because bactericidal assays indicated a higher rate of bacterial killing with non-encapsulated strains. To confirm this, we treated neutrophils with cytochalasin D, which blocks phagocytosis by inhibiting actin polymerisation [13, 14], before performing the phagocytosis assay. Similar

amounts of bacteria were recovered with or without cytochalasin D treatment, indicating that the bacteria recovered in our assay were externally located and not phagocytosed by the neutrophils (data not shown). It is possible that when mixed with neutrophils in suspension, bacteria were not efficiently killed by antibiotics and live bacteria were spun down along with the cells.

2.6. Phagocytosis by neutrophils using flow cytometry

In an alternate method to evaluate phagocytosis of *S. suis* by neutrophils, we performed flow cytometry using *S. suis* strains transformed with a GFP plasmid. As shown in Fig. 6A-B, no increases in GFP fluorescence were observed when the neutrophils were incubated alone or with a GFP-negative *S. suis* strain, confirming the absence of non-specific fluorescent signals in the flow cytometry assay. In contrast to results obtained with the bactericidal assay, flow cytometric analysis showed that low percentages of the well encapsulated wild type strains (31533 and 89-1591), as well as the suilysin-negative mutant SX911, had associated with neutrophils, even in the presence of specific IgG (Fig. 6C and E). In addition, no differences were observed in the percentages of associated bacteria between the suilysin-negative strains (SX911 and 89-1591) and the wild type suilysin-positive strain 31533 in the presence of complete serum (Fig. 6E). In general, higher percentages of non-encapsulated mutants were observed to associate with neutrophils compared to encapsulated strains (Fig. 6C-E).

2.7. Transmission electron microscopy

The internalization of *S. suis* by neutrophils was confirmed by transmission electron microscopy (TEM) as shown in Fig. 7. Strains 31533 and B218 were incubated with neutrophils for 30 min as described for the phagocytosis assay. When the wild type 31533 strain was opsonized with complete serum, we observed a few cells that contained 1 to 2 bacteria while most neutrophils were free of *S. suis* (Fig. 7A). When the same strain was opsonized with complete serum and specific IgG, almost all neutrophils were observed to contain *S. suis*, with an average of 4 bacteria per cell. Some neutrophils even contained

chains of streptococci (Fig. 7B). For the non-encapsulated B218 mutant opsonized with complete serum, similar high numbers of streptococci were observed intracellularly. Some of the ingested bacteria were less electron dense showing signs of degradation (Fig. 7C).

3. Discussion

Our understanding of the pathogenesis of *S. suis* infection remains very limited and one key unresolved question is what mechanisms are used by the bacteria to survive and travel in the bloodstream [9]. To cause septicaemia and meningitis, *S. suis* needs to evade innate immune defenses and maintain a high level of bacteraemia. Most published studies have been performed with mononuclear phagocytes, and an earlier theory proposed that *S. suis* is taken up by these cells, thereby enabling the bacteria to survive and disseminate intracellularly [23]. However, it has been suggested that CPS is an anti-phagocytic factor [7, 8]. Thus far, few studies have investigated *S. suis* interactions with neutrophils, the predominant phagocyte in the blood and the first leukocyte at the onset of disease [33]. Participation of neutrophils in the innate immune response to the early phase of *S. suis* infection may be a critical step in its pathogenesis. In the present work, we evaluated different types of interaction between *S. suis* and neutrophils.

We used a bactericidal assay to directly measure the ability of neutrophils to kill *S. suis*, as well as to evaluate the roles of CPS and suilysin in the resistance to killing. Preliminary results indicated that relatively low numbers of bacteria must be used ($\leq 10^4$ CFU; data not shown) to obtain reproducible results. In our hands, bactericidal assays that used higher concentrations of *S. suis*, as previously reported [38], produced extremely variable results due to overgrowth of bacteria (unpublished observations) and probably some toxic effects on the cells. Indeed, we demonstrated that the European strain 31533 expressing suilysin at high concentrations was highly toxic to neutrophils, whereas the suilysin-negative mutant SX911 and North American strain 1591 were not toxic. Based on these results, it is reasonable to suggest that suilysin might be responsible for the cytotoxicity of *S. suis*. Previous studies have reported that suilysin is toxic to other cells, such as epithelial cells, endothelial cells and macrophages [10-15]. Given that suilysin

possesses multiple mechanisms of action [39], a certain number of molecules may contribute to its cytotoxicity. Moreover, this toxic activity of suilysin may help explain why the European strain 31533, which has a better survival rate and attains higher bacterial concentrations (see below), caused maximal cytotoxicity at an earlier time than did its non-encapsulated mutant.

The bactericidal assays showed that CPS is able to protect the European virulent strain 31533 from neutrophil-mediated killing even after opsonization with complete serum, whereas both non-encapsulated mutants were efficiently killed under all conditions. Quessy *et al.* [40] also showed that an increase in capsular material thickness after *in vivo* bacterial growth is accompanied by increased resistance to killing by swine polymorphonuclear leukocytes. Since neutrophils are the predominant cell type in swine blood, the ability of CPS to effectively protect *S. suis* from killing by these phagocytes may explain, at least in part, its survival capacity in blood [17]. Interestingly, important differences were observed with the encapsulated wild type North American strain 89-1591, which survived well in the presence of inactivated serum, but was efficiently killed in the presence of complete serum. Although several phenotypic and genotypic differences exist between European and North American strains [41], the absence of suilysin in strain 89-1519 may explain, at least in part, its higher susceptibility to complement-dependent killing. In fact, the suilysin-negative mutant SX911 (derived from the European 31533 strain) showed similar results as the North American 89-1591 strain, which may indicate that this toxin actively interferes with the ability of neutrophils to kill *S. suis*. This was confirmed by further experiments which showed that neutralization of suilysin by cholesterol rendered the wild type European strain 31533 susceptible to neutrophil-mediated killing. Finally, addition of non-toxic concentrations of purified suilysin restored the resistance of mutant SX911 to killing by neutrophils. Different hypotheses may be postulated to explain the ability of suilysin to hinder opsonization with complete serum. It has been reported that pneumolysin (suilysin-related toxin produced by *Streptococcus pneumoniae*) activates complement and this reduces the amount of complement available for opsonization of the bacteria. Since neutrophils need an intact complement pathway and maximal opsonization to eliminate the pneumococci, the activity of pneumolysin limits the

bactericidal effect of neutrophils and thus the clearance of bacteria [42-44]. Furthermore, using pneumolysin-negative isogenic bacterial mutant strains and complement-deficient naïve mice, it has been shown that pneumolysin prevents complement deposition on *S. pneumoniae* [45, 46]. In addition, suilysin may use other mechanisms, aside from LDH-detected toxicity, to inhibit the ability of neutrophils to kill bacteria. For example, it has been shown that pneumolysin is able to cause apoptosis of dendritic cells by a caspase-independent mechanism [47] and to inhibit the respiratory burst, bactericidal activity, and migration of human polymorphonuclear leukocytes [48]. Group B *Streptococcus* (GBS) haemolysin also causes apoptosis of macrophages [49]. Finally, it might be hypothesized that suilysin interferes with phagocytosis and, indirectly, with killing, as suggested for GBS [50]. However, this theory is unlikely given that previous studies [7, 8, 25] and results from this study (see below) clearly showed that well encapsulated *S. suis* is not phagocytosed by leukocytes.

It has been suggested that European *S. suis* serotype 2 strains are more virulent than those from North America [9]. Recent studies demonstrated that a virulent French strain induced higher mortality and more clinical signs than the virulent North American strain 89-1591 when compared under the same conditions [22]. Based on our results, suilysin may play a role in the resistance to killing by leukocytes in the absence of antibodies. However, other factors may also contribute to the virulence of *S. suis* because (a) strain 89-1591 remains virulent and (b) suilysin mutant SX911 is able to induce disease in pigs [16, 17]. Indeed, it has been postulated that the virulence of *S. suis* is a complex multifactorial process [9].

At sites of inflammation, neutrophils are exposed to soluble factors, such as cytokines, which may induce their activation. It has been reported that injection of IL-1 β in pigs before infection with *S. suis* enhances the activity of neutrophils and improves the resistance of pigs to bacterial infection [51]. In fact, this cytokine is known to be a good adjuvant in boosting overall immune responses [52]. We evaluated the effect of different cytokines on the ability of neutrophils to kill *S. suis*. Our results showed that GM-CSF, TNF- α and IL-8 significantly enhanced the capacity of neutrophils to kill well encapsulated

S. suis. For TNF- α , it appears that unknown factors present in complete serum may potentiate its effect. These cytokines are known to promote the activity of neutrophils during bacterial infections [53-56]. The observed neutrophil activation may be due to increased bacterial phagocytosis and/or increased bactericidal capacity. Further studies are needed to elucidate the specific mechanisms by which cytokines contribute to neutrophil-mediated clearance of *S. suis*. Surprisingly, neither IFN- γ nor IL-1 β increased the bactericidal activity of neutrophils. Despite the ability of IFN- γ to increase clearance of certain bacteria, it is known that IFN- γ -primed responses are different among divergent bacterial species [57].

The contribution of antibodies to the killing of *S. suis* by leukocytes have not been previously reported. The opsonization of the encapsulated European strain 31533 with specific IgG significantly increased the killing activity of neutrophils but only in presence of complete serum. That IgG had no effect when combined with inactivated serum (unpublished observations) suggests an important role for complement and/or other factors present in complete but not heat-inactivated serum. This difference between complete and inactivated serum was not observed with the non-encapsulated strains because these bacteria were readily killed even in the absence of antibodies. Although the European suilysin-negative mutant SX911 and the North American strain 89-1591 were susceptible to killing by neutrophils after opsonization with complete serum, the extent of killing was significantly increased in the presence of specific IgG. These results support the concept that antibodies against *S. suis* are protective. Indeed, passive immunization of pigs with specific anti-*S. suis* IgG was shown to protect pigs from an experimental infection with a virulent *S. suis* serotype 2 strain [58]. Similar to neutrophils, monocyte-derived macrophages also showed a capacity to kill *S. suis* in the absence or presence of specific antibodies. However, and as expected, the bactericidal capacity of monocytes/macrophages was delayed and generally lower than that exhibited by polymorphonuclear cells. Hence, the importance of neutrophils in the control of acute *S. suis* infections may have been underestimated thus far.

Effective killing of bacteria by polymorphonuclear leukocytes is generally assumed to require internalization. In the case of *S. suis*, it has been reported that the CPS protects *S. suis* against phagocytosis and, as shown here and in other studies, against bactericidal activity of leukocytes [7, 8, 25, 26, 59-61]. In addition, Smith *et al.* [8] clearly demonstrated that observed differences in the killing assay between encapsulated wild type and non-encapsulated mutant strains can be attributed to the fact that the latter is more efficiently ingested by leukocytes, but once ingested both are killed with equivalent efficiency. However, the concept of *S. suis* phagocytosis is controversial due to conflicting results regarding the interactions of *S. suis* with leukocytes. Some studies showed low [25, 26, 59-62] or high [24] levels of phagocytosis of well encapsulated *S. suis* strains, even for the same strain. A major concern with phagocytosis assays is the need to distinguish between ingested (intracellular) bacteria from those externally adhered to neutrophils [63]. Most results have been obtained with macrophages or monocyte-derived macrophages. To study the phagocytosis of *S. suis* by neutrophils, we developed an antibiotic protection assay in suspension as previously used for other bacterial species [64-67]. However, these assays required washing with differential centrifugation to separate cells in the pellet from bacteria in the supernatant. Although some studies support the efficiency of this technique, it did not produce reproducible results in our hands because we could not prevent bacteria from collecting at the bottom of the tubes along with the neutrophils, as shown by our results obtained with cytochalasin D. Alternatively, we used a recently described flow cytometry technique that measures uptake of GFP-transformed *S. suis*. As expected, the non-encapsulated mutants associated with neutrophils at higher levels than did the encapsulated strains, confirming previous results with macrophages/monocytes obtained using the antibiotic protection assay or vital staining [7, 8, 25, 59-61] and those obtained by Lun *et al.* [26] using a technique similar to the one used in this study. However, our results differ substantially from those of Busque *et al.* [24], who reported more than 80% association of encapsulated strains with neutrophils. The main difference between our study and the one by Busque *et al.* is that the latter used FITC-labelled bacteria which could either interfere with surface components recognized by neutrophils or alter bacterial proteins, as previously reported for *Bordetella pertussis* [68].

Interestingly, differences in the extent of killing of suilysin-negative strains in the presence or absence of complete serum were not observed by flow cytometry (Fig. 2 and 6). These differences were more evident with the well encapsulated strains in the presence of specific antibodies and complete serum, suggesting that the level of phagocytosis did not increase despite the considerably higher level of killing. The explanation(s) for these disparate results is presently unclear, but we hypothesize that the bactericidal assay is more sensitive than the phagocytosis assay. In addition, in the presence of specific antibodies and/or complement, bacteria might be phagocytosed through different receptors (such as Fc receptors) that may result in a faster rate of killing. Bacteria phagocytosed in the presence of antibodies might have been rapidly killed within 30 min (the incubation time used in our phagocytosis assay) with a consequent loss of fluorescence, whereas non-encapsulated mutants might be ingested in the absence of antibodies using other receptors, hence extending the time needed to activate killing by neutrophils, and as a result remained viable at that incubation time [69-71]. TEM carried out after 30 min of incubation clearly showed an absence of encapsulated European *S. suis* strain 31533 inside neutrophils, whereas higher numbers of the same strain were found intracellularly only in the presence of complete serum and specific antibodies. Similarly, high numbers of the non-encapsulated mutant B218 were also found inside neutrophils. Thus, TEM confirms and validates the results obtained with the bactericidal assay.

In summary, the results of our study showed that neutrophils may play an important role in host defense against *S. suis* infection. However, particularly in the absence of inflammatory mediators such as cytokines, the European virulent strain is able to resist phagocytosis and killing by neutrophils and monocytes, thus allowing its dissemination in the bloodstream. Both CPS and suilysin of the virulent strain may contribute to this process. Alternatively, the North American strain is more susceptible to the bactericidal activity of leukocytes, a finding which may explain the lower level of virulence observed with strains of this phenotype. The lack of suilysin might be, at least in part, responsible for their higher susceptibility to killing by leukocytes. In addition, we clearly demonstrated the importance of complement (or other heat-sensitive factors) and, especially, specific antibodies in the bactericidal activity of leukocytes against *S. suis*. These results have important implications

for the development of an effective vaccine to protect pigs against *S. suis* infection. In this regard, the challenge is to develop a vaccine that induces high levels of protective antibodies [1].

4. Material and Methods

4.1. Bacterial strains, growth conditions and convalescent serum production

Five strains of *S. suis* capsular serotype 2 were used, including the virulent European suilysin-positive strain 31533, originally isolated from a case of porcine meningitis [72], as well as its two isogenic mutants obtained by allelic exchange, the suilysin-negative mutant SX911 [17] and the non-encapsulated mutant B218. The latter mutant corresponds to the previously described transposon-derived mutant 2A [7]. These mutants have been used for different adhesion, invasion and phagocytic studies [13, 14, 26, 73]. The virulent North-American suilysin-negative strain 89-1591 [1, 10, 14, 22] as well as its non-capsulated mutant M2 [60, 74] were also used in this study. Bacteria were grown overnight on sheep blood agar plates at 37°C and isolated colonies were used as inoculum for Todd-Hewitt broth (THB, Difco Laboratories, Detroit, MI), which was incubated for 8 h at 37°C with agitation. Working cultures were obtained by inoculating 10 µl of 10⁻³ dilutions of the cultures into 30 ml of THB and incubating the cultures for 16 h at 37°C with agitation. Stationary-phase bacteria were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.3 and were appropriately diluted in RPMI 1640 (Gibco, Burlington, VT). The number of CFU per millilitre in the final suspension was determined by plating samples onto Todd-Hewitt agar (THA, Difco).

Specific antibodies from convalescent serum were obtained from 5 week-old piglets infected intravenously (i.v.) with a total of 10⁸ CFU of strains 31533 or 89-1591. Animals were monitored for clinical signs and treated with penicillin to avoid death. After two weeks, animals were re-infected i.v. with the same bacterial concentration. After the second infection, animals were protected and showed no clinical signs. Levels of antibodies against the homologous strain were determined by ELISA as previously described [75, 76]. Three

weeks after the second challenge, animals presenting high antibodies titres were euthanized and bled. Sera were collected and kept frozen at -80°C until future use. Prior to the bactericidal and phagocytic assays, total IgG from convalescent serum was purified using a protein-A column (Pharmacia, Uppsala, Sweden). As control, IgG from a normal pig which did not show detectable antibodies against *S. suis* serotype 2 was purified and pre-absorbed with 10^9 CFU of *S. suis* for 1 h at 37°C with agitation to remove possible cross-reactions.

4.2. Isolation of porcine neutrophils and differentiating monocytes

Blood samples were collected from pigs that belonged to a high health status herd which was free of endemic disease caused by *S. suis*. None of the animals used in this study presented detectable levels of antibodies against *S. suis* serotype 2 as measured by ELISA as previously described [75]. Blood was collected into EDTA tubes (Vacutainers, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) by venous puncture and diluted 1:2 with phosphate-buffered saline (PBS). Cell populations were separated by Ficoll-Hypaque (Pharmacia) density gradient centrifugation as instructed by the manufacturer. The monocyte layer was collected, washed twice and distributed in 24-well tissue culture plates (Falcon; Becton Dickinson, Bedford, MA) at a final concentration of 5×10^6 cells/ml in RPMI 1640 medium supplemented with 10% of heat-inactivated fetal bovine serum (Gibco). Plates were incubated for 24 h at 37°C with 5% CO_2 to allow cell adhesion, resulting in differentiating monocytes [77]. Neutrophils were isolated by sedimentation in 6% dextran. Contaminating erythrocytes were removed by lysis with 0.83% ammonium chloride, and neutrophils were resuspended in RPMI 1640 medium supplemented with 10% of heat-inactivated porcine serum at a final concentration of 5×10^6 cells/ml. Purity of the neutrophil suspension was higher than 95% (contaminating cells were eosinophils), as determined by differential Giemsa staining.

4.3. Lactate dehydrogenase assay for cytotoxicity

The cytotoxic effect of bacteria on neutrophils was evaluated by measuring the release of lactate dehydrogenase (LDH) enzyme as previously described [14] with some

modifications. Briefly, 75 μ l of neutrophils were incubated with 75 μ l of bacteria in 96-well plates at different times and concentrations at 37°C with 5% CO₂ (see results). Noninfected neutrophils and bacteria alone were used as negative controls, whereas cells lysed with the lysis solution of the Promega CytoTox96 (Promega corporation, Madison, WI) were used as positive controls (100% toxicity). At the end of the incubation time, plates were centrifuged at 300 x g for 20 min to pellet the bacteria and the LDH concentration was measured in 50 μ l aliquot of supernatant using the Promega CytoTox96 kit as per the manufacturer's instructions. The percentage of cytotoxicity was calculated as follows: $[(\text{sample OD}_{420} - \text{OD}_{0\%}) / (\text{OD}_{100\%} - \text{OD}_{0\%})] \times 100$, where the sample OD₄₂₀ is the optical density at 420 nm of the sample, OD_{0%} is the optical density at 420 nm of noninfected cells, and OD_{100%} is the optical density at 420 nm of lysed cells.

4.4. Bactericidal assay

Bacteria were not opsonized (in RPMI) or pre-opsonized using one of the following conditions: a) 50% heat-inactivated normal porcine serum b) complete normal porcine serum; c) complete normal porcine serum with 25 μ g/ml of purified control IgG; or d) complete normal porcine serum with 25 μ g/ml of purified IgG from convalescent *S. suis* serotype 2 infected animals. Pre-opsonization was performed for 30 min at 37°C. The dose of IgG was determined to be the optimal concentration for opsonization studies (data not shown). In some experiments, 0.1 μ g/ml of purified suilysin (kindly provided by T. Jacobs, Intervet International, Boxmeer, The Netherlands) and/or 100 μ g/ml of cholesterol (Sigma, Oakville, Ontario, Canada) was also added. Neutrophils at a concentration of 5×10^6 cells/ml were mixed with 1×10^4 CFU/ml of different *S. suis* strains in microtubes, centrifuged for 5 sec to enhance contact, and then incubated 90 min at 37°C with 5% CO₂. Preliminary studies on the kinetics of *S. suis* killing by neutrophils showed that the level of killing was optimal at this incubation time (data not shown). It should be noted that under these conditions, bacteria were not toxic to neutrophils (Fig. 1). After incubation with neutrophils, cells were lysed with sterile water and viable bacterial counts were performed on THA plates with an Autoplate 4000 (Spiral biotech, Norwood, MA). Tubes with bacteria

alone were treated similarly and used as controls. Results are expressed as percentage of killed bacteria.

For comparative purposes, assays with differentiating monocytes were also performed in the same manner, but with 24-well plates (Falcon) rather than microtubes. Culture media in plates of previously isolated differentiating monocytes were removed and replaced with 1×10^4 CFU/ml of either non-opsonized or pre-opsonized *S. suis* (via similar conditions of opsonization as described above) and incubated for 180 min (optimal incubation time, data not shown) at 37°C with 5% CO₂. After incubation, cells were disrupted by scrapping the bottom of the well and repeated pipetting to liberate intracellular bacteria. Viable bacterial counts were performed with this cell lysate as described above.

4.5. Effect of cytokines on the bactericidal activity of neutrophils against S. suis

In selected experiments, bactericidal assays were performed as previously described, except neutrophils were pre-stimulated with different cytokines to determine their effect on the interactions between these leukocytes and *S. suis*. Prior to the assay, neutrophils were treated with recombinant porcine cytokines (R&D systems, Minneapolis, MN) for 30 min at 37°C with 5% CO₂ at the following doses: 100 ng/ml of TNF- α , 50 ng/ml of GM-CSF or IFN- γ , and 5 ng/ml of IL-8 or IL-1 β . These doses were shown to be optimal for activating neutrophils without exerting toxic effects on the cells or bacteria (data not shown).

4.6. Phagocytosis by antibiotic protection assay

Neutrophils at a concentration of 5×10^6 cells/ml were mixed with 10^7 CFU/ml of non-opsonized or pre-opsonized *S. suis* strains in microtubes, centrifuged for 5 sec to enhance contact, and then incubated for 30 min at 37°C with 5% CO₂. Extracellular bacteria were removed by two differential centrifugations with PBS at 82 x g, a speed which was determined to pellet cells but not bacteria (data not shown). After spinning, the same volume of cell culture medium containing 100 μ g/ml of gentamicin (Gibco) and 5 μ g/ml of penicillin G (Sigma) was added and further incubated for 1 h to kill extracellular adherent

bacteria. Samples were washed 3 times with PBS, resuspended in water and vortexed well to disrupt the cells and liberate intracellular bacteria. Dilutions of the cell lysate were plated onto THB agar to assess the number of CFU recovered. Tubes containing bacteria alone, cells alone or bacteria with antibiotics were used as controls for each experiment. In some experiments, 2 $\mu\text{g/ml}$ of cytochalasin D (Sigma) was added to the neutrophil suspension 30 min prior the assay to inhibit phagocytosis by blocking actin rearrangement [13, 14].

4.7. Phagocytosis by flow cytometry assay

For flow cytometry experiments, the same strains were transformed with the GFP plasmid pSL5.28 [26]. Briefly, *S. suis* strains were grown in THB with 1% of 2 M glycine (Sigma) and 1% of 3.4 mg/ml hyaluronidase (Sigma) to render them competent and then resuspended in 20% glycerol before freezing at -70°C . The plasmid pSL5.28 was inserted into bacteria by electroporation and the transformants were incubated for 60 min at 37°C and plated overnight onto THA supplemented with 200 $\mu\text{g/ml}$ spectinomycin. A single colony was used as inoculum for 10 ml in THB containing spectinomycin. Fluorescence was confirmed by examining 4 μl of the transformants suspension under an epifluorescence microscope (Axiovert 200 M, Carl Zeiss) using a FITC filter. Prior to phagocytosis test, GFP-*S. suis* were grown overnight on THA plate with 200 $\mu\text{g/ml}$ spectinomycin. One colony was used to inoculate THB containing spectinomycin for the working solution, which was incubated for 24 h at 30°C with agitation (180 rpm). Neutrophils at a concentration of 5×10^6 cells/ml were mixed in microtubes with 10^7 CFU/ml of non-opsonized or pre-opsonized GFP-*S. suis* strains diluted in RPMI, centrifuged for 5 sec to enhance contact, and then incubated for 30 min at 37°C with 5% CO_2 . Extracellular bacteria were removed by two washes and cells were resuspended in the same volume in 2% formaldehyde before flow cytometry analysis with FACSVantage SE (Becton Dickinson) and a standard FITC filter.

4.8 Electron microscopy studies

Transmission electron microscopy studies were performed as previously described [14] with some modifications. Neutrophils were mixed with 10^7 CFU/ml of *S. suis* strains 31533 or B218 pre-opsonized with complete serum or strain 31533 pre-opsonized with complete serum and 25 μ g/ml of purified specific IgG. Microtubes were centrifuged for 5 sec to enhance contact and then incubated for 30 min. Extracellular bacteria were removed by two washes with PBS (pH 7.3) and cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde and 0.1 M cacodylate for 90 min with gentle rotation. Cells were then concentrated in a pellet and overlaid with 4% agar in cacodylate. Samples were cut and washed with cacodylate buffer before post-fixating with 2% osmium tetroxyde. For dehydration, samples were serially washed with different concentrations of ethanol (0% to 70%). Samples were embedded in firm Spurr resin and then cut into thin sections with a diamond knife using a Leica Ultracut ultramicrotome. Sections were post-stained with uranyl acetate and lead citrate and then observed with a model 420 electron microscope (Phillips Electronics, Eindhoven, The Netherlands).

4.9 Statistical analysis

All data are expressed as means \pm standard deviations. Data were analyzed by a two-tailed, unpaired Student's *t* test. A *P* value of < 0.05 was considered significant. All experiments were repeated at least three times.

Acknowledgements

We thank D. Montpetit from the Centre de Recherche et Développement sur les Aliments (CRDA) for technical assistance with TEM and Y. Popowych from the Vaccine and Infectious Disease Organization (VIDO) for technical assistance with flow cytometry.

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) grant # 0680154280, by the Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche du Québec (FCAR-équipe) grant # 99-ER-0214, and by the Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine (NSERC grant # 225155).

8. References

- [1] Higgins R, Gottschalk M. Streptococcal Diseases. In Diseases of swine. 9e edition. Ames: Iowa State University; 2005, p. 769-83.
- [2] Hill JE, Gottschalk M, Brousseau R, Harel J, Hemmingsen SM, Goh SH. Biochemical analysis, cpn60 and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*. Vet Microbiol 2005;107:63-9.
- [3] Robertson ID, Blackmore DK. Occupational exposure to *Streptococcus suis* type 2. Epidemiol Infect 1989;103:157-64.
- [4] Tarradas C, Luque I, de Andres D, Abdel-Aziz Shahein YE, Pons P, Gonzalez F, et al. Epidemiological relationship of human and swine *Streptococcus suis* isolates. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2001;48:347-55.
- [5] World Health Organization Outbreak associated with *Streptococcus suis* in pigs in China. 2005 http://www.who.int/csr/don/2005_08_03/en/
- [6] Normile D. Infectious diseases. WHO probes deadliness of China's pig-borne disease. Science 2005;309:1308-9.
- [7] Charland N, Harel J, Kobisch M, Lacasse S, Gottschalk M. *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. Microbiology 1998;144 (Pt 2):325-32.

- [8] Smith HE, Damman M, van der Velde J, Wagenaar F, Wisselink HJ, Stockhofe-Zurwieden N, et al. Identification and characterization of the *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. *Infect Immun* 1999;67:1750-6.
- [9] Gottschalk M, Segura M. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet Microbiol* 2000;76:259-72.
- [10] Charland N, Nizet V, Rubens CE, Kim KS, Lacouture S, Gottschalk M. *Streptococcus suis* serotype 2 interactions with human brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun* 2000;68:637-43.
- [11] Lalonde M, Segura M, Lacouture S, Gottschalk M. Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines. *Microbiology* 2000;146 (Pt 8):1913-21.
- [12] Norton PM, Rolph C, Ward PN, Bentley RW, Leigh JA. Epithelial invasion and cell lysis by virulent strains of *Streptococcus suis* is enhanced by the presence of suilysin. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999;26:25-35.
- [13] Segura M, Gottschalk M. *Streptococcus suis* interactions with the murine macrophage cell line J774: adhesion and cytotoxicity. *Infect Immun* 2002;70:4312-22.
- [14] Vanier G, Segura M, Friedl P, Lacouture S, Gottschalk M. Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* 2004;72:1441-9.
- [15] Benga L, Goethe R, Rohde M, Valentin-Weigand P. Non-encapsulated strains reveal novel insights in invasion and survival of *Streptococcus suis* in epithelial cells. *Cell Microbiol* 2004;6:867-81.
- [16] Allen AG, Bolitho S, Lindsay H, Khan S, Bryant C, Norton P, et al. Generation and characterization of a defined mutant of *Streptococcus suis* lacking suilysin. *Infect Immun* 2001;69:2732-5.
- [17] Lun S, Perez-Casal J, Connor W, Willson PJ. Role of suilysin in pathogenesis of *Streptococcus suis* capsular serotype 2. *Microb Pathog* 2003;34:27-37.
- [18] Smith HE, Wisselink HJ, Stockhofe-Zurwieden N, Vecht U, Smits MM. Virulence markers of *Streptococcus suis* type 1 and 2. *Adv Exp Med Biol* 1997;418:651-5.

- [19] Winterhoff N, Goethe R, Gruening P, Rohde M, Kalisz H, Smith HE, et al. Identification and characterization of two temperature-induced surface-associated proteins of *Streptococcus suis* with high homologies to members of the Arginine Deiminase system of *Streptococcus pyogenes*. J Bacteriol 2002;184:6768-76.
- [20] Gottschalk M, Lebrun A, Wisselink H, Dubreuil JD, Smith H, Vecht U. Production of virulence-related proteins by Canadian strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. Can J Vet Res 1998;62:75-9.
- [21] Segers RP, Kenter T, de Haan LA, Jacobs AA. Characterisation of the gene encoding suilysin from *Streptococcus suis* and expression in field strains. FEMS Microbiol Lett 1998;167:255-61.
- [22] Berthelot-Herault F, Gottschalk M, Morvan H, Kobisch M. Dilemma of virulence of *Streptococcus suis*: Canadian isolate 89-1591 characterized as a virulent strain using a standardized experimental model in pigs. Can J Vet Res 2005;69:236-40.
- [23] Williams AE, Blakemore WF. Pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus suis* type 2. J Infect Dis 1990;162:474-81.
- [24] Busque P, Higgins R, Senechal S, Marchand R, Quessy S. Simultaneous flow cytometric measurement of *Streptococcus suis* phagocytosis by polymorphonuclear and mononuclear blood leukocytes. Vet Microbiol 1998;63:229-38.
- [25] Segura MA, Cleroux P, Gottschalk M. *Streptococcus suis* and group B *Streptococcus* differ in their interactions with murine macrophages. FEMS Immunol Med Microbiol 1998;21:189-95.
- [26] Lun S, Willson PJ. Expression of green fluorescent protein and its application in pathogenesis studies of serotype 2 *Streptococcus suis*. J Microbiol Methods 2004;56:401-12.
- [27] Segura M, Gottschalk M, Olivier M. Encapsulated *Streptococcus suis* inhibits activation of signaling pathways involved in phagocytosis. Infect Immun 2004;72:5322-30.
- [28] Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, L H-M. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. Lab Invest 2000;80:617-53.
- [29] Burg ND, Pillinger MH. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. Clin Immunol 2001;99:7-17.

- [30] Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 2005;23:197-223.
- [31] Salles MW, Perez-Casal J, Willson P, Middleton DM. Changes in the leucocyte subpopulations of the palatine tonsillar crypt epithelium of pigs in response to *Streptococcus suis* type 2 infection. *Vet Immunol Immunopathol* 2002;87:51-63.
- [32] Sanford SE. Gross and histopathological findings in unusual lesions caused by *Streptococcus suis* in pigs. II. Central nervous system lesions. *Can J Vet Res* 1987;51:486-9.
- [33] Sprenger H, Rosler A, Tonn P, Braune HJ, Huffmann G, Gemsa D. Chemokines in the cerebrospinal fluid of patients with meningitis. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;80:155-61.
- [34] Vecht U, Arends JP, van der Molen EJ, van Leengoed LA. Differences in virulence between two strains of *Streptococcus suis* type II after experimentally induced infection of newborn germ-free pigs. *Am J Vet Res* 1989;50:1037-43.
- [35] Hampton MB, Winterbourn CC. Methods for quantifying phagocytosis and bacterial killing by human neutrophils. *J Immunol Methods* 1999;232:15-22.
- [36] Jacobs AA, Loeffen PL, van den Berg AJ, Storm PK. Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*. *Infect Immun* 1994;62:1742-8.
- [37] Valenti-Weigand P, Benkel P, Rohde M, Chhatwal GS. Entry and intracellular survival of group B streptococci in J774 macrophages. *Infect Immun* 1996;64:2467-73.
- [38] Clifton-Hadley FA. Studies of *Streptococcus suis* type 2 infection in pigs. *Vet Res Commun* 1984;8:217-27.
- [39] Gottschalk MG, Lacouture S, Dubreuil JD. Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin. *Microbiology* 1995;141 (Pt 1):189-95.
- [40] Quessy S, Dubreuil JD, Jacques M, Malouin F, Higgins R. Increase of capsular material thickness following in vivo growth of virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains. *FEMS Microbiol Lett* 1994;115:19-26.
- [41] Chatellier S, Gottschalk M, Higgins R, Brousseau R, Harel J. Relatedness of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from different geographic origins as evaluated by molecular fingerprinting and phenotyping. *J Clin Microbiol* 1999;37:362-6.

- [42] Paton JC, Rowan-Kelly B, Ferrante A. Activation of human complement by the pneumococcal toxin pneumolysin. *Infect Immun* 1984;43:1085-7.
- [43] Rubins JB, Charboneau D, Fasching C, Berry AM, Paton JC, Alexander JE, et al. Distinct roles for pneumolysin's cytotoxic and complement activities in the pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:1339-46.
- [44] Alcantara RB, Preheim LC, Gentry-Nielsen MJ. Pneumolysin-induced complement depletion during experimental pneumococcal bacteremia. *Infect Immun* 2001;69:3569-75.
- [45] Ren B, Szalai AJ, Hollingshead SK, Briles DE. Effects of PspA and antibodies to PspA on activation and deposition of complement on the pneumococcal surface. *Infect Immun* 2004;72:114-22.
- [46] Yuste J, Botto M, Paton JC, Holden DW, Brown JS. Additive inhibition of complement deposition by pneumolysin and PspA facilitates *Streptococcus pneumoniae* septicemia. *J Immunol* 2005;175:1813-9.
- [47] Colino J, Snapper CM. Two distinct mechanisms for induction of dendritic cell apoptosis in response to intact *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol* 2003;171:2354-65.
- [48] Paton JC, Ferrante A. Inhibition of human polymorphonuclear leukocyte respiratory burst, bactericidal activity, and migration by pneumolysin. *Infect Immun* 1983;41:1212-6.
- [49] Ulett GC, Bohnsack JF, Armstrong J, Adderson EE. Beta-hemolysin-independent induction of apoptosis of macrophages infected with serotype III group B streptococcus. *J Infect Dis* 2003;188:1049-53.
- [50] Liu GY, Doran KS, Lawrence T, Turkson N, Puliti M, Tissi L, et al. Sword and shield: linked group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin and carotenoid pigment function to subvert host phagocyte defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:14491-6.
- [51] Shi J, Goodband RD, Chengappa MM, Nelssen JL, Tokach MD, McVey DS, et al. Influence of interleukin-1 on neutrophil function and resistance to *Streptococcus suis* in neonatal pigs. *J Leukoc Biol* 1994;56:88-94.

- [52] Cavaillon JM. Les Cytokines. Paris: Masson, 1996.
- [53] Campbell JR, Edwards MS. Cytokines enhance opsonophagocytosis of type III group B Streptococcus. J Perinatol 2000;20:225-30.
- [54] Kettritz R, Choi M, Rolle S, Wellner M, Luft FC. Integrins and cytokines activate nuclear transcription factor-kappaB in human neutrophils. J Biol Chem 2004;279:2657-65.
- [55] LeVine AM, Reed JA, Kurak KE, Cianciolo E, Whitsett JA. GM-CSF-deficient mice are susceptible to pulmonary group B streptococcal infection. J Clin Invest 1999;103:563-9.
- [56] Rainard P, Riollet C, Poutrel B, Paape MJ. Phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* by bovine neutrophils after priming by tumor necrosis factor-alpha and the des-arginine derivative of C5a. Am J Vet Res 2000;61:951-9.
- [57] Meda L, Gasperini S, Ceska M, Cassatella MA. Modulation of proinflammatory cytokine release from human polymorphonuclear leukocytes by gamma interferon. Cell Immunol 1994;157:448-61.
- [58] Andresen LO, Tegtmeier C. Passive immunization of pigs against experimental infection with *Streptococcus suis* serotype 2. Vet Microbiol 2001;81:331-44.
- [59] Brazeau C, Gottschalk M, Vincelette S, Martineau-Doize B. In vitro phagocytosis and survival of *Streptococcus suis* capsular type 2 inside murine macrophages. Microbiology 1996;142 (Pt 5):1231-7.
- [60] Salasia SI, Lammler C, Herrmann G. Properties of a *Streptococcus suis* isolate of serotype 2 and two capsular mutants. Vet Microbiol 1995;45:151-6.
- [61] Wibawan IW, Lammler C. Relation between encapsulation and various properties of *Streptococcus suis*. Zentralbl Veterinarmed B 1994;41:453-9.
- [62] Charland N, Kobisch M, Martineau-Doize B, Jacques M, Gottschalk M. Role of capsular sialic acid in virulence and resistance to phagocytosis of *Streptococcus suis* capsular type 2. FEMS Immunol Med Microbiol 1996;14:195-203.
- [63] Hed J. Methods for distinguishing ingested from adhering particles. Methods Enzymol 1986;132:198-204.

- [64] Medina E, Goldmann O, Toppel AW, Chhatwal GS. Survival of *Streptococcus pyogenes* within host phagocytic cells: a pathogenic mechanism for persistence and systemic invasion. *J Infect Dis* 2003;187:597-603.
- [65] Gresham HD, Lowrance JH, Caver TE, Wilson BS, Cheung AL, Lindberg FP. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J Immunol* 2000;164:3713-22.
- [66] Cruijssen TL, Van Leengoed LA, Dekker-Nooren TC, Schoevers EJ, Verheijden JH. Phagocytosis and killing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes isolated from pigs. *Infect Immun* 1992;60:4867-71.
- [67] Diarra MS, Petitclerc D, Deschenes E, Lessard N, Grondin G, Talbot BG, et al. Lactoferrin against *Staphylococcus aureus* Mastitis. Lactoferrin alone or in combination with penicillin G on bovine polymorphonuclear function and mammary epithelial cells colonisation by *Staphylococcus aureus*. *Vet Immunol Immunopathol* 2003;95:33-42.
- [68] Weingart CL, Broitman-Maduro G, Dean G, Newman S, Peppler M, Weiss AA. Fluorescent labels influence phagocytosis of *Bordetella pertussis* by human neutrophils. *Infect Immun* 1999;67:4264-7.
- [69] Pier GB, Coleman F, Grout M, Franklin M, Ohman DE. Role of alginate O acetylation in resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to opsonic phagocytosis. *Infect Immun* 2001;69:1895-901.
- [70] Rakita RM, Quan VC, Jacques-Palaz K, Singh KV, Arduino RC, Mee M, et al. Specific antibody promotes opsonization and PMN-mediated killing of phagocytosis-resistant *Enterococcus faecium*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000;28:291-9.
- [71] Peppoloni S, Mancianti S, Volpini G, Nuti S, Ruggiero P, Rappuoli R, et al. Antibody-dependent macrophage-mediated activity against *Helicobacter pylori* in the absence of complement. *Eur J Immunol* 2002;32:2721-5.
- [72] Kobisch M, Gottschalk M, Morvan P, Cariolet R, Bénévent G, JP J. Experimental infection of SPF piglets with *Streptococcus suis* serotype 2. *J Rech Porcine France* 1995;27:97-102.

- [73] Esgleas M, Lacouture S, Gottschalk M. *Streptococcus suis* serotype 2 binding to extracellular matrix proteins. FEMS Microbiol Lett 2005;244:33-40.
- [74] Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Dubreuil D. Production and characterization of two *Streptococcus suis* capsular type 2 mutants. Vet Microbiol 1992;30:59-71.
- [75] Lapointe L, D'Allaire S, Lebrun A, Lacouture S, Gottschalk M. Antibody response to an autogenous vaccine and serologic profile for *Streptococcus suis* capsular type 1/2. Can J Vet Res 2002;66:8-14.
- [76] del Campo Sepulveda EM, Altman E, Kobisch M, D'Allaire S, Gottschalk M. Detection of antibodies against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a purified capsular polysaccharide antigen-based indirect ELISA. Vet Microbiol 1996;52:113-25.
- [77] Basta S, Knoetig SM, Spagnuolo-Weaver M, Allan G, McCullough KC. Modulation of monocytic cell activity and virus susceptibility during differentiation into macrophages. J Immunol 1999;162:3961-9.

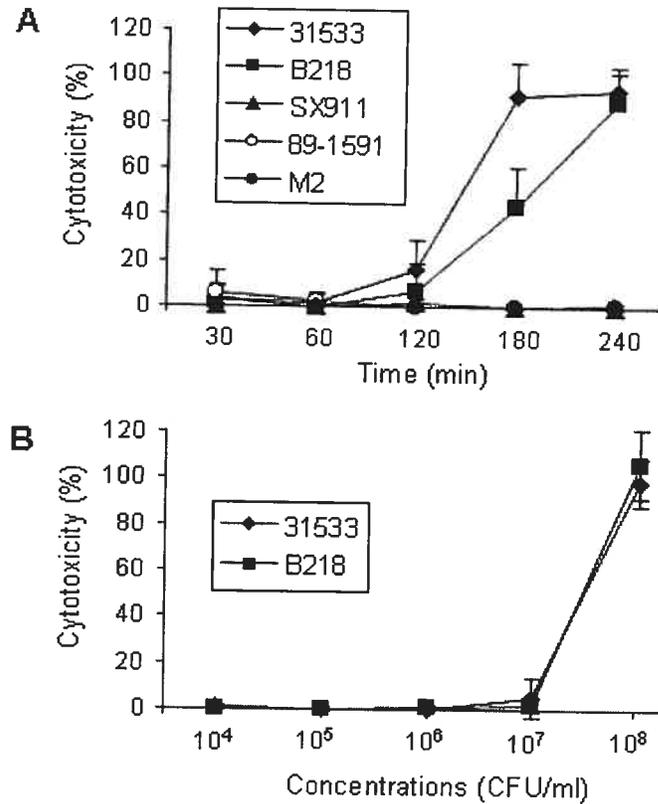


Fig. 1. (A) Kinetics of *S. suis* (10^8 CFU/ml) cytotoxicity to neutrophils. (B) Effect of *S. suis* concentration on cytotoxicity to neutrophils at 240 min of incubation. Cytotoxicity was evaluated by the LDH test. Data are expressed as percentage of cytotoxicity (\pm standard deviation) in infected samples compared to control samples with neutrophils alone.

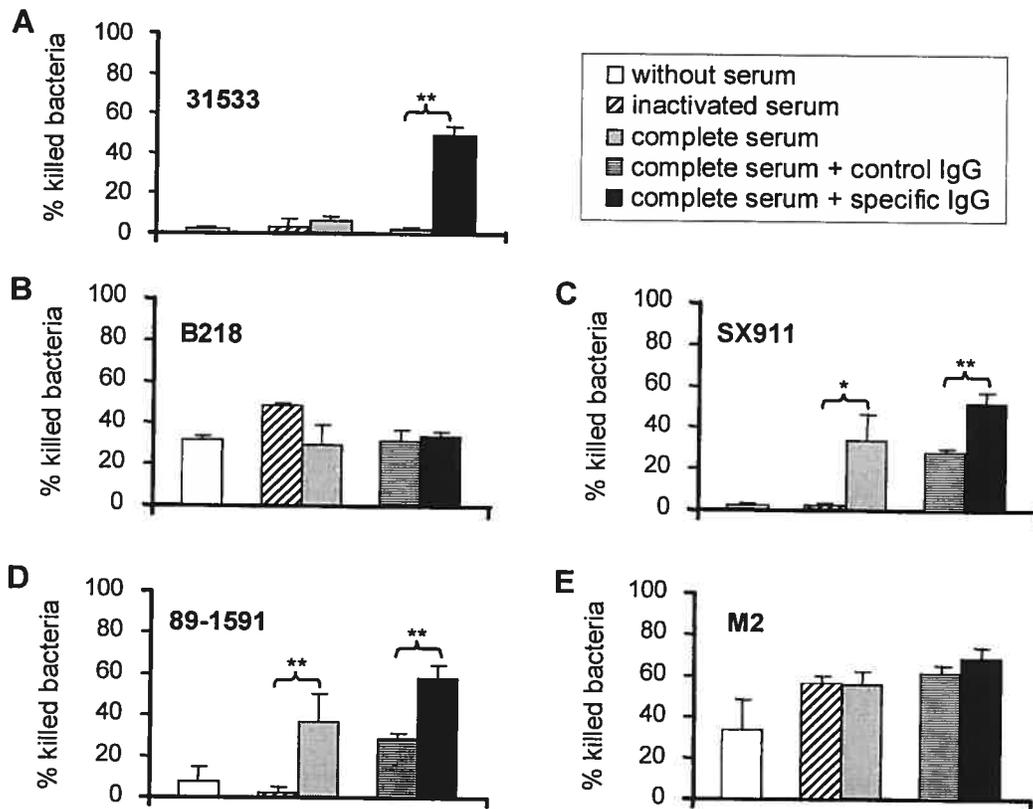


Fig. 2. Effect of serum and antibodies on the capacity of neutrophils to kill different *S. suis* strains after 90 min of incubation. Bacteria were either non-opsonized or pre-opsonized with 50% inactivated serum or complete serum in the absence or presence of 25 μ g of control or specific IgG. Control IgG were pre-absorbed with *S. suis* to remove possible cross-reactions. Data are expressed as mean percentage (\pm standard deviation) of killed bacteria and are representative of three independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

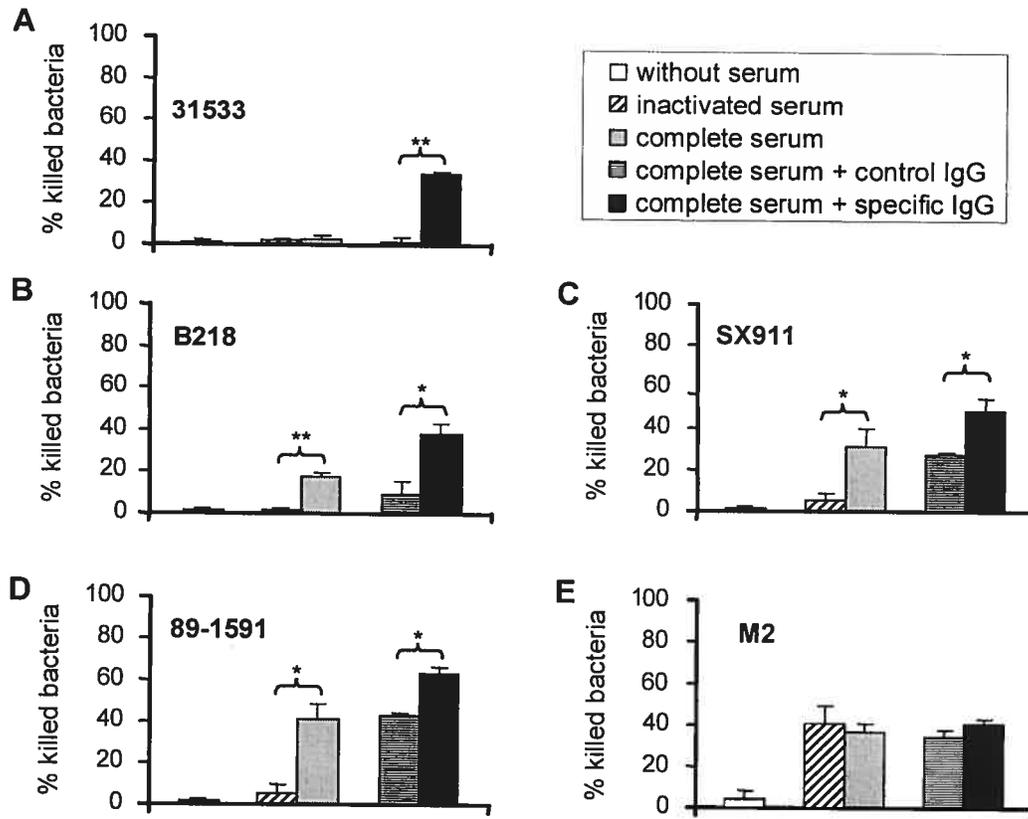


Fig. 3. Effect of serum and antibodies on the capacity of differentiating monocytes to kill different *S. suis* strains after 180 min of incubation. Bacteria were either non-opsonized or pre-opsonized with 50% inactivated serum or complete serum in the absence or presence of 25 μ g of control or specific IgG. Control IgG were pre-absorbed with *S. suis* to remove possible cross-reactions. Data are expressed as mean percentage (\pm standard deviation) of killed bacteria and are representative of three independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

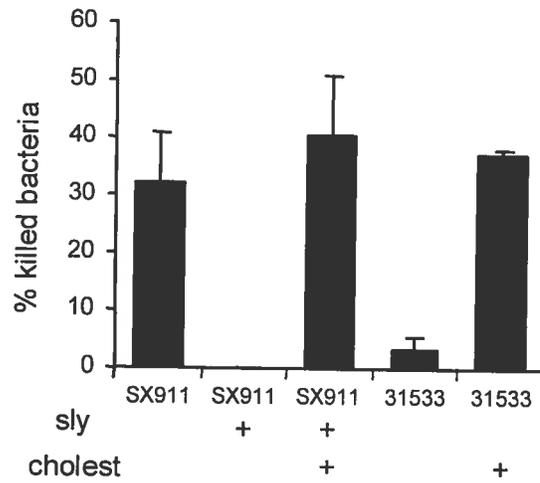


Fig. 4. Effect of suliyisin on killing of *S. suis* by neutrophils after 90 min of incubation. Bacteria were pre-incubated with 50% complete serum and 0.1 $\mu\text{g/ml}$ of suliyisin with or without 100 $\mu\text{g/ml}$ of cholesterol before infection. Data are expressed as mean percentage (\pm standard deviation) of killed bacteria and are representative of three independent experiments.

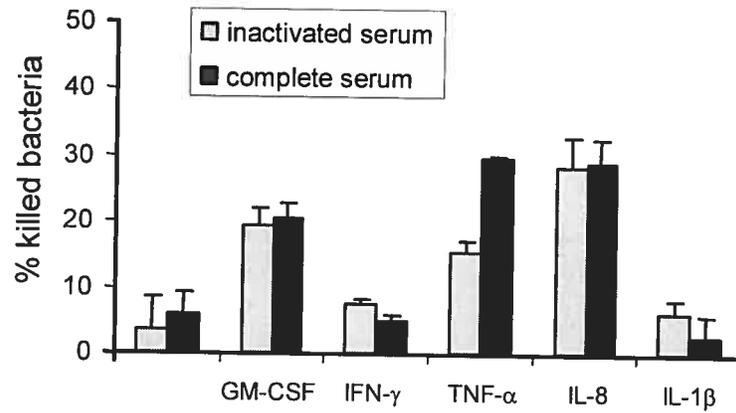


Fig. 5. Effect of cytokines on killing of *S. suis* (strain 31533) by neutrophils after 90 min of incubation. Bacteria were pre-opsonized with 50% inactivated or complete serum and neutrophils were pre-treated with recombinant porcine cytokines before infection. Data are expressed as mean percentage (\pm standard deviation) of killed bacteria and are representative of three independent experiments.

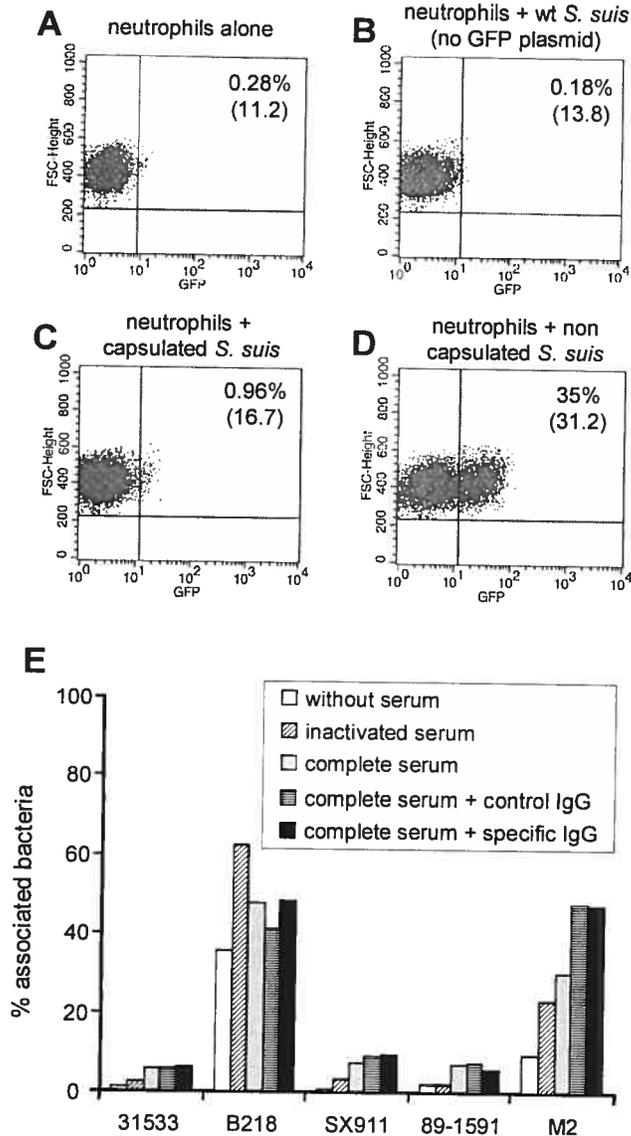


Fig. 6. Phagocytosis of GFP⁺ *S. suis* (pSL5.28) by neutrophils. Results were determined after 30 min exposure with 10⁷ CFU/ml. Dot plots represent the percentage of cells with associated bacteria. (A) neutrophils alone; (B) neutrophils incubated with GFP⁻ encapsulated *S. suis* opsonized with complete serum; (C) neutrophils incubated with GFP⁺ encapsulated *S. suis* opsonized with complete serum; and (D) neutrophils incubated with GFP⁺ non-encapsulated *S. suis* opsonized with complete serum. The percentage of cells associated with GFP⁺ bacteria is indicated in the upper right quadrant with numbers in brackets representing the level of mean fluorescence intensity. (E) Histogram represents the percentage of cells associated with GFP⁺ bacteria under different opsonization conditions. Data are representative of three independent experiments and at least 10,000 neutrophils were counted for each sample.

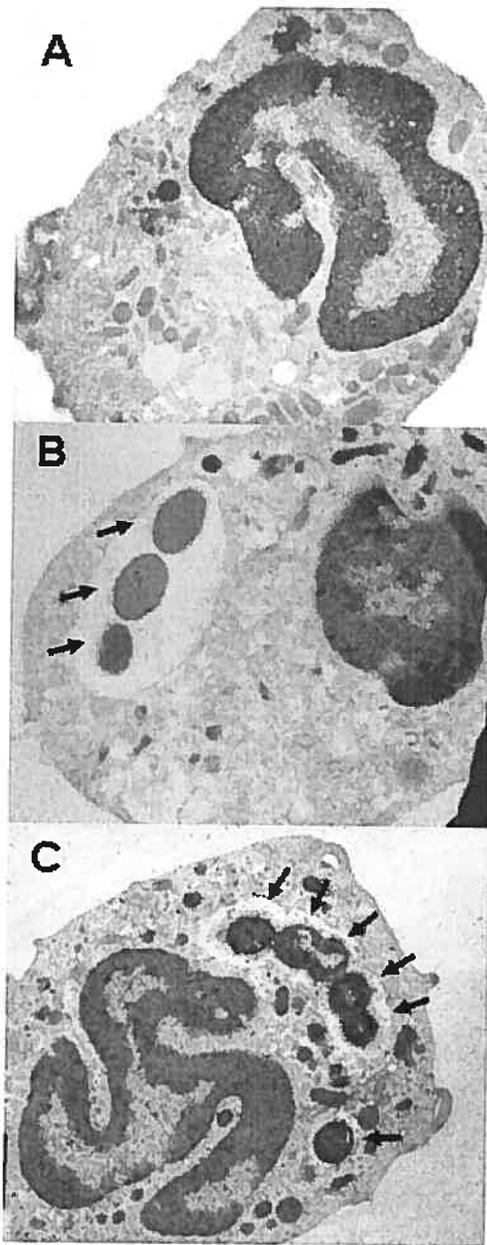


Fig. 7. TEM micrographs showing phagocytosis of *S. suis* by neutrophils at a concentration of 10^7 CFU/ml after 30 min of incubation. (A) Most neutrophils were free of *S. suis* when strain 31533 was opsonized with complete serum. (B) Neutrophils incubated with strain 31533 opsonized with complete serum and specific anti-*S. suis* IgG contained internalized bacteria (arrows). (C) Neutrophils incubated with strain B218 opsonized with complete serum contained high numbers of internalized bacteria (arrows).

IV- DISCUSSION

Les connaissances sur la pathogenèse de l'infection causée par *Streptococcus suis* demeurent limitées et le mécanisme par lequel la bactérie voyage dans le sang demeure inconnu (Gottschalk and Segura 2000). *S. suis* doit être présent en quantité assez importante pour contourner les mécanismes de l'immunité innée et pour causer la septicémie et la méningite. Plusieurs travaux ont été effectués avec des cellules mononucléaires et la plus récente théorie suggère que *S. suis* peut résister à la phagocytose de ces leucocytes et y adhérer en grande quantité (Segura and Gottschalk 2002). Malgré que les neutrophiles soient les premiers leucocytes à être présents aux sites d'infections (Sprenger *et al.* 1996), peu d'information sont disponibles sur les interactions de *S. suis* avec ces cellules. La participation des neutrophiles dans les premières phases de l'infection à *S. suis* pourrait contribuer à des étapes critiques de la pathogenèse de cette bactérie. Le but de cette étude était donc d'évaluer différents types d'interaction entre *S. suis* et les neutrophiles comme la cytotoxicité, l'effet bactéricide et la phagocytose sous diverses conditions d'opsonisation.

La cytotoxicité de *S. suis* envers les neutrophiles a tout d'abord été caractérisée à l'aide de tests mesurant le relâchement du LDH. Puisque seulement les souches exprimant la suilysine (souche virulente Européenne 31533 et son mutant non capsulé B218) étaient cytotoxiques envers les neutrophiles, il est raisonnable de conclure que la suilysine est responsable de la toxicité de *S. suis*. De plus, le fait que le mutant isogénique négatif pour la suilysine SX911 ainsi que la souche Nord Américaine 89-1591 et son mutant non capsulé M2 (qui ne produisent pas de suilysine) soient non toxiques à forte concentration appuie cette théorie et suggère que la suilysine est le seul facteur produit par *S. suis* qui est toxique pour les neutrophiles. Il est d'ailleurs connu que la cytotoxicité de *S. suis* pour plusieurs type de cellules comme les cellules épithéliales, les cellules endothéliales et les macrophages est due à l'action de cette toxine (Norton *et al.* 1999; Charland *et al.* 2000; Lalonde *et al.* 2000; Segura and Gottschalk 2002; Benga *et al.* 2004; Vanier *et al.* 2004). De façon intéressante, la souche Européenne 31533 a causé un maximum de toxicité plus rapidement que son mutant non capsulé. Ceci est dû au fait que la souche virulente n'est pas détruite alors que son mutant B218 est tué par les neutrophiles au cours du test et que, pour cette raison, la quantité de suilysine produite en est réduite. Ceci, en plus du fait

qu'une forte quantité de bactéries était nécessaire pour induire la cytotoxicité, souligne l'effet «dose dépendant» de cette toxine. Ce facteur de virulence pourrait donc aider *S. suis* à survivre dans le sang. Par contre, la plupart des souches virulentes Nord Américaines ne produisent pas de suilysine (Gottschalk *et al.* 1998; Segers *et al.* 1998) et ceci indique qu'il y a d'autres facteurs qui sont importants pour la survie de *S. suis* dans la circulation sanguine.

Pour étudier le rôle des neutrophiles porcins dans les infections causées par *S. suis*, leur habileté à tuer cette bactérie a été évaluée à l'aide de tests bactéricides quantitatifs. Ceux-ci ont d'abord été réalisés avec l'opsonisation des bactéries à l'aide de différents types de sérums pour caractériser l'apport du complément dans l'immunité innée contre *S. suis* chez un hôte non immun. Des résultats préliminaires ont démontré que de faibles concentrations de *S. suis* devaient être utilisées pour ce test afin d'obtenir des résultats reproductibles (résultats non publiés) car de trop hautes concentrations induisent un effet toxique sur les neutrophiles, comme décrit ci-haut, et engendrent une croissance qui dépasse probablement les capacités bactéricides des neutrophiles. Les résultats montrent que la souche virulente Européenne 31533 est résistante à l'effet bactéricide des neutrophiles alors que les mutants non capsulés B218 et M2 sont hautement susceptibles, et ce, même en absence totale de sérum. Ces résultats confirment que la capsule est efficace pour protéger *S. suis* de l'effet bactéricide des neutrophiles et que ce facteur de virulence aide à la survie de cette bactérie dans la circulation sanguine, comme déjà démontré à l'aide de tests similaires effectués dans du sang porcine complet (Agarwal *et al.* 1969; Quessy *et al.* 1994; Lun *et al.* 2003). Il a été prouvé que l'effet antiphagocytaire de la capsule est dû à la réduction de l'activation des kinases impliquées dans les mécanismes signalétiques de la phagocytose par les macrophages (Segura *et al.* 2004). Il se pourrait donc qu'un mécanisme analogue puisse survenir avec les neutrophiles. Il est aussi possible que la capsule masque des composants de la paroi cellulaire essentiels à la reconnaissance et à l'activation des mécanismes phagocytaires.

Les tests bactéricides démontrent aussi que l'opsonisation par le complément n'aide pas les neutrophiles à tuer la souche virulente 31533 mais, étonnamment, aide à détruire le mutant Sly- SX911 et la souche Nord Américaine 89-1591 (qui est aussi incapable de

produire la suilysine). Ceci est en accord avec les résultats rapportés par Salasia et al. (1995) qui avaient conduit des tests de phagocytose avec des neutrophiles et la souche 89-1591. Puisque le test bactéricide de la présente étude a été réalisé à des concentrations non toxiques, ce résultat suggère que la suilysine a un effet déteriorant sur le complément. Cet effet a déjà été démontré pour la pneumolysine de *Streptococcus pneumoniae*. Il a été rapporté que la pneumolysine active le complément et que ceci réduit la concentration de complément disponible pour l'opsonisation de la bactérie. Puisque les neutrophiles requièrent un système du complément intact afin qu'il y ait une opsonisation optimale pour détruire le pneumocoque, l'activité de la pneumolysine limite l'effet bactéricide des neutrophiles et la destruction de cette bactérie (Paton *et al.* 1984; Rubins *et al.* 1996) (Alcantara *et al.* 2001). D'après ces résultats, la suilysine de *S. suis* (dont la toxine la plus proche phylogéniquement est la pneumolysine (Segers *et al.* 1998)) semble avoir un effet comparable. L'addition préalable d'une quantité non toxique de suilysine purifiée dans le milieu lors des tests effectués avec le mutant SX911 est suffisante pour entraver l'effet bactéricide des neutrophiles. De plus, l'addition de cholestérol, qui inhibe l'activité de la suilysine (Jacobs *et al.* 1994), restaure l'effet bactéricide des neutrophiles. Ce dernier effet a aussi été démontré pour la souche produisant la suilysine (souche 31533) et lorsque le cholestérol est ajouté en parallèle avec la suilysine. De plus, la suilysine pourrait avoir un effet opprimant sur l'activité des phagocytes, comme l'apoptose, qui n'est pas mesurée par le test de LDH comme démontré avec d'autres toxines (Colino and Snapper 2003; Ulett *et al.* 2003). Par contre, aucune apoptose ni effet toxique sur les neutrophiles n'ont été observés par microscopie électronique à transmission à ces concentrations, suggérant un autre effet. Les résultats d'effets bactéricides par les neutrophiles suggèrent que la souche Nord Américaine 89-1591 devrait être moins résistante aux neutrophiles dans la circulation sanguine chez des animaux non immuns. Il a d'ailleurs été suggéré que les souches Européennes de *S. suis* sérotype 2 sont plus virulentes que celles Nord Américaines (Gottschalk and Segura 2000). Des études récentes ont démontré qu'une souche virulente Française induit des signes cliniques plus importants chez le porc que la souche Canadienne 89-1591 (Berthelot-Herault *et al.* 2005). Puisque cette souche est malgré tout virulente et que le mutant SX911 provoque la maladie chez le porc (Allen *et al.* 2001; Lun *et al.* 2003), d'autres facteurs doivent contribuer à la virulence de *S. suis*. Il a d'ailleurs été postulé que

la virulence de *S. suis* est un processus complexe et multifactoriel (Gottschalk and Segura 2000).

L'accroissement de la phagocytose de *S. suis* par l'addition de sérum contenant du complément est controversé. Brazeau et al. (1996) ainsi que Charland et al., (1996) avaient en effet démontré que la présence de complément n'augmente pas la phagocytose de souches virulentes de *S. suis* par des macrophages et des monocytes et ce, autant avec des souches possédant ou non la suilysine, comme dans la présente étude. Ils ont rapporté que l'influence sur la phagocytose de *S. suis* serait en fait due à d'autres composants du sérum. Malgré que les études bactéricides ne puissent démontrer une activité phagocytaire, cette hypothèse est en désaccord avec nos observations. Nos résultats illustrent au contraire que le complément est important pour l'effet bactéricide des monocytes contre *S. suis*, spécialement lorsque ces souches sont Sly-. Cette différence dans les résultats est probablement due au fait que nous utilisions des concentrations très faibles de bactéries, permettant d'observer les différences fines entre les conditions. Dans les études précédentes, il y avait dix fois plus de bactéries que de leucocytes. Il est possible qu'une trop forte concentration de bactéries ait masqué les différences qui auraient pu être observées entre les opsonisations.

La contribution des anticorps dans la destruction de *S. suis* par les neutrophiles a été évaluée par l'opsonisation des bactéries avec des IgG contrôles (non reliées à *S. suis*) et des IgG spécifiques aux souches de *S. suis* utilisés lors des tests bactéricides. L'opsonisation de la souche virulente 31533 avec des IgG spécifiques augmente l'activité bactéricide des neutrophiles seulement lorsqu'elle est faite en présence de sérum complet et non en présence de sérum désactivé (résultats non publiés). D'autres composants présents dans le sérum sont donc importants pour une opsonisation efficace de *S. suis*. Cet effet n'est pas dû à la présence d'anticorps *per se* puisque les IgG contrôles n'ont pas influencé l'effet bactéricide des neutrophiles. Puisque les souches non capsulées étaient déjà détruites en présence de sérum complet, l'addition d'IgG spécifiques n'a pas accru l'effet bactéricide des neutrophiles pour ces souches. Contrairement à ceci, les souches Sly- qui étaient aussi déjà susceptibles aux neutrophiles avec du sérum complet ont montré des taux de destruction supérieurs en présence d'IgG spécifique en comparaison avec les IgG contrôles.

Ces résultats sont en accord avec les observations de Charland *et al.* (Charland *et al.* 1997) qui ont rapporté que l'opsonisation de la bactérie avec un anticorps monoclonal dirigé contre la capsule augmente grandement la phagocytose de *S. suis* par des monocytes porcins et facilite l'élimination de *S. suis* dans la circulation sanguine des souris infectées. Cet anticorps monoclonal ne pouvait cependant qu'induire une protection partielle contre *S. suis*. Les IgG utilisés au cours de la présente expérience provenaient d'animaux convalescents infectés deux fois avec *S. suis*. Les anticorps utilisés étaient donc dirigés contre la bactérie entière, donc la capsule, mais aussi des composants de la paroi bactérienne. De plus amples études seraient donc nécessaires pour caractériser les anticorps utilisés au cours de cette étude. Nos résultats supportent aussi le fait que des anticorps contre *S. suis* pourraient être protecteurs comme rapporté par immunisation passive chez les porcs avec des IgG dirigés contre *S. suis* (Andresen and Tegtmeyer 2001).

Des résultats similaires ont été observés avec des monocytes en différenciation. L'importance des neutrophiles dans l'immunité innée contre *S. suis* est soulignée par le fait que le temps optimal pour l'effet bactéricide des monocytes est deux fois plus long comparé à celui des neutrophiles. Il est aussi en général plus faible. En effet, une cinétique de l'effet bactéricide a été effectuée pour les deux types de leucocytes (résultats non publiés). Celle-ci nous a révélé qu'à 30 minutes, la quantité de bactéries détruites par les neutrophiles n'était pas assez importante et constante pour produire des résultats reproductibles alors qu'à 180 minutes, la croissance des bactéries avait surpassé leur taux de destruction. Le temps choisi a donc été de 90 minutes, où le taux de destruction donnait des résultats reproductibles. Du côté des monocytes, le temps optimal de l'effet bactéricide se situait plutôt à 180 minutes. Comme suggéré par McCloskey (McCloskey and Salo 2000), ceci est probablement dû à la différence de récepteurs entre les deux types de cellules et par le fait que les neutrophiles génèrent une plus grande quantité de réactifs à oxygène alors que les cellules mononucléaires ont des capacités bactéricides limitées (Allen 2003). Il est donc probable que le rôle des neutrophiles dans les infections à *S. suis* ait été sous-estimé jusqu'à présent.

Aux sites d'inflammation, les neutrophiles sont exposés à des facteurs solubles, comme les cytokines, qui activent leurs fonctions. Il a été rapporté que l'injection d'IL-1 β chez les porcs avant une infection à *S. suis* augmente l'activité des neutrophiles et aide à la résistance bactérienne chez ces porcs (Shi *et al.* 1994). Nous avons donc tenté de caractériser ce phénomène avec une pré-stimulation des neutrophiles avec différentes cytokines avant les tests bactéricides sur la souche virulente 31533 en présence de sérum inactivé ou complet, puisque *S. suis* n'est que très peu détruit dans ces conditions. Les résultats démontrent que l'addition de GM-CSF, TNF- α et d'IL-8 accroît l'effet bactéricide des neutrophiles contre la souche virulente Européenne 31533. Ces cytokines sont reconnues pour promouvoir l'activité des neutrophiles, comme la phagocytose, l'effet bactéricide et l'expression des récepteurs, dans les infections bactériennes (Campbell and Edwards 2000; Rainard *et al.* 2000; Kettritz *et al.* 2004). Ces cytokines pro-inflammatoires pourraient être importantes pour l'immunité contre *S. suis* par les neutrophiles et des études plus approfondies sont nécessaires à l'éclaircissement de ce point. Étonnamment, les résultats démontrent aussi que IFN- γ et IL-1 β n'induisent pas l'activation des capacités bactéricides des neutrophiles contre *S. suis*. Malgré que IFN- γ peut aider à l'élimination bactérienne dans certains cas, il est reconnu que la réponse induite par IFN- γ est différente selon les espèces bactérienne (Meda *et al.* 1994) et ne semble pas aider dans le cas de *S. suis*. Cette cytokine est aussi reconnue comme étant un bon adjuvant qui active le système immunitaire (Cavaillon 1996). Nos résultats ne permettent pas d'observer une telle activation et ceci peut être dû au fait que les tests étaient conduits *in vitro* avec des leucocytes purifiés, ce qui éliminait l'interaction de ceux-ci avec d'autres types de cellules. Le même test a aussi été effectué avec la souche 89-1591 dans du sérum désactivé, puisque cette souche n'était pas tuée par les neutrophiles sous cette condition d'opsonisation. Contrairement à la souche 31533, les résultats démontrent une activation semblable pour toutes les cytokines, soit une destruction du nombre de bactéries d'environ 25% (résultats non publiés). La souche Canadienne 89-1591 a récemment été caractérisée comme étant virulente mais moins que des souches Européenne (Berthelot-Herault *et al.* 2005) expliquant pour quelle raison les neutrophiles, lorsque stimulés par des cytokines, sont plus aptes à détruire cette souche dans du sérum désactivé. Ce pourcentage n'est cependant pas constant lors de la stimulation avec la cytokine IFN- γ et laisse présager que la stimulation

des neutrophiles n'est pas optimale dans ce cas. Donc comme mentionné avec la souche 31533, cette cytokine ne semble pas aider l'élimination de *S. suis* par les neutrophiles de façon *in vitro*.

La phagocytose de *S. suis* demeure un sujet débattu puisque plusieurs rapports démontrent différents résultats avec les leucocytes. Certaines études démontrent de faible taux de phagocytose (Brazeau *et al.* 1996; Charland *et al.* 1996; Segura *et al.* 1998; Lun and Willson 2004) alors qu'un autre rapporte de forts pourcentages (Busque *et al.* 1998) des souches de *S. suis* capsulé. Ces études ont par contre été conduites avec des techniques différentes ce qui pourrait expliquer les résultats contradictoires. De plus, la plupart des informations rapportées concernent les monocytes et les macrophages et peu d'informations sont disponibles à propos de la phagocytose par les neutrophiles, considérant les difficultés associées au travail avec ce type de cellules. Les neutrophiles sont des leucocytes fragiles qui doivent être isolés du sang frais la même journée où les expériences sont effectuées. Ce sont aussi des cellules non adhérentes. Les tests standardisés pour les monocytes ou les macrophages ne peuvent donc pas être utilisés. Afin de caractériser la phagocytose de *S. suis* par des neutrophiles porcins, nous avons tenté de développer un test de protection aux antibiotiques en suspension qui, détruit les bactéries extracellulaires et peut être quantitatif pour les bactéries internalisées comme proposé par d'autres études (Crujisen *et al.* 1992; Gresham *et al.* 2000; Diarra *et al.* 2003; Medina *et al.* 2003). Ce test permet donc de compter seulement les bactéries internalisées par le leucocyte. Par contre, après le temps d'incubation laissé pour la phagocytose, ce test nécessite des lavages avec des centrifugations différentielles, où les neutrophiles, présents dans le culot, sont séparés des bactéries qui se retrouvent alors dans le surnageant. Malgré que quelques études supportent l'efficacité de cette technique (Medina *et al.* 2003; Crujisen *et al.* 1992; Gresham *et al.* 2000; Diarra *et al.* 2003), nos résultats suggèrent que les bactéries sont amenées au fond du tube lors de la centrifugation avec les cellules. En effet, le nombre de bactéries «phagocytées» est le même pour toutes les souches de *S. suis* et à toutes les conditions et ce, malgré l'addition de cytochalacine D qui empêche la phagocytose en inhibant la polymérisation de l'actine (Segura and Gottschalk 2002; Vanier *et al.* 2004).

Nous avons aussi tenté de caractériser la phagocytose de *S. suis* par la cytométrie en flux en utilisant des bactéries transformées avec un plamide renfermant le gène de la GFP. Comme anticipé, les mutants non capsulés lors de cette étude sont bien associés aux neutrophiles alors que les souches capsulées ne sont que peu associées, renforçant le rôle antiphagocytaire de la capsule de *S. suis*. Ce résultat est en accord avec le travail effectué par Lun (Lun and Willson 2004) qui a utilisé la même méthode. Par contre, dans une autre étude utilisant la cytométrie en flux, il est rapporté que plusieurs souches de *S. suis* sont fortement associés (plus de 80% d'association) à des neutrophiles (Busque *et al.* 1998). Au cours de cette étude, les bactéries avaient été colorées au FITC avant le test de phagocytose. La coloration des bactéries en surface peut interférer avec des composants reconnus par les neutrophiles ou encore pourraient altérer des protéines importantes pour la virulence des bactéries, comme rapporté pour *Bordetella pertussis* (Weingart *et al.* 1999). Ceci pourrait expliquer les différences entre les deux études. Une différence significative entre les résultats des tests bactéricides et ceux de phagocytose est observée pour les souches capsulées. Lors des tests bactéricides, le nombre de bactéries capsulées tuées était plus élevé après opsonisation alors que la quantité de *S. suis* capsulé associé aux neutrophiles par cytométrie en flux est semblable avec toutes les opsonisations, malgré l'ajout d'IgG spécifiques. Cette observation suggère que les tests bactéricides sont plus sensibles et supérieurs pour caractériser les interactions entre les neutrophiles et les bactéries. Nous ne pouvons expliquer de tels résultats mais nous pouvons émettre l'hypothèse que, lorsque *S. suis* est opsonisé par des IgG spécifiques, la phagocytose est initiée par une liaison à des récepteurs différents, comme les récepteurs Fc γ , ce qui pourrait mener à une phagocytose et une destruction plus rapide des bactéries menant à une réduction de la fluorescence. Puisque les mutants non capsulés n'ont pas à être opsonisés par des anticorps spécifiques pour être phagocytés, il est possible que leur internalisation soit médiée par des récepteurs différents et qu'elle soit plus lente, expliquant pourquoi la fluorescence est visible dans ce cas.

L'internalisation de *S. suis* par les neutrophiles a été confirmée par microscopie électronique à transmission. La souche virulente 31533 opsonisée seulement avec du sérum complet était phagocytée par peu de neutrophiles alors que avec la même souche opsonisée avec des IgG spécifiques, presque tout les neutrophiles contenaient plusieurs

bactéries. La même situation est observée avec le mutant non capsulé. Ces constatations sont en accord avec les résultats des tests bactéricides et démontrent encore une fois que ceux-ci sont probablement plus représentatifs de ce qui arrive réellement que les tests de phagocytose développés dans cette étude. Plus de recherche seraient nécessaires à l'établissement d'une méthode bien standardisée. Par exemple, Simons *et al* (Simons *et al.* 2005) ont récemment démontré qu'il était possible de faire adhérer des neutrophiles à du collagène. Il serait donc intéressant de réévaluer la phagocytose de *S. suis* avec cette méthode.

V- CONCLUSIONS

Les résultats obtenus dans la présente étude démontrent que les neutrophiles semblent jouer un rôle important dans la défense immune contre les infections causées par *S. suis*. Par contre, spécialement en absence de médiateurs de l'inflammation, la souche virulente Européenne peut résister à la phagocytose et à l'effet bactéricide des neutrophiles et des monocytes, ce qui pourrait contribuer à sa dissémination dans la circulation sanguine. La capsule de polysaccharides et la suilysine semblent contribuer à ce processus. Par ailleurs autre côté, la souche Nord Américaine est plus sensible aux effets bactéricides des leucocytes, ce qui pourrait expliquer la plus faible virulence de cette souche. L'absence de suilysine est, du moins en partie, responsable d'une telle susceptibilité. De plus, l'importance du complément (ou de d'autres facteurs sensibles à la chaleur présents dans le sérum) et, spécialement, des anticorps spécifiques dans l'effet bactéricide des leucocytes a clairement été démontrée. La vaccination des animaux, en induisant une production élevée d'anticorps spécifiques, pourrait donc être importante pour la protection des porcs contre l'infection causée par *S. suis*.

VI- BIBLIOGRAPHIE

Aarestrup, F. M., S. E. Jorsal and N. E. Jensen (1998). Serological characterization and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolates from diagnostic samples in Denmark during 1995 and 1996. *Vet Microbiol* **60**(1): 59-66.

Abbas, A. K., A. H. Lichtman and J. S. Pober (2000). Cellular and molecular immunology. Philadelphia Toronto, W.B. Saunders.

Adam, R. A., T. Tenenbaum, P. Valentin-Weigand, M. Laryea, B. Schwahn, S. Angelow, H. J. Galla, W. Daubener and H. Schroten (2004). Porcine choroid plexus epithelial cells induce *Streptococcus suis* bacteriostasis in vitro. *Infect Immun* **72**(5): 3084-7.

Agarwal, K. K., S. D. Elliott and P. J. Lachmann (1969). Streptococcal infection in young pigs. 3. The immunity of adult pigs investigated by the bactericidal test. *J Hyg (Lond)* **67**(3): 491-503.

Al-Numani, D., M. Segura, M. Dore and M. Gottschalk (2003). Up-regulation of ICAM-1, CD11a/CD18 and CD11c/CD18 on human THP-1 monocytes stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2. *Clin Exp Immunol* **133**(1): 67-77.

Albanyan, E. A. and M. S. Edwards (2000). Lectin site interaction with capsular polysaccharide mediates nonimmune phagocytosis of type III group B streptococci. *Infect Immun* **68**(10): 5794-802.

Alcantara, R. B., L. C. Preheim and M. J. Gentry-Nielsen (2001). Pneumolysin-induced complement depletion during experimental pneumococcal bacteremia. *Infect Immun* **69**(6): 3569-75.

Allen, A. G., S. Bolitho, H. Lindsay, S. Khan, C. Bryant, P. Norton, P. Ward, J. Leigh, J. Morgan, H. Riches, S. Easty and D. Maskell (2001). Generation and characterization of a defined mutant of *Streptococcus suis* lacking suilysin. *Infect Immun* **69**(4): 2732-5.

Allen, A. G., H. Lindsay, D. Seilly, S. Bolitho, S. E. Peters and D. J. Maskell (2004). Identification and characterisation of hyaluronate lyase from *Streptococcus suis*. *Microb Pathog* **36**(6): 327-35.

Allen, L. A. (2003). Mechanisms of pathogenesis: evasion of killing by polymorphonuclear leukocytes. *Microbes Infect* **5**(14): 1329-35.

Allgaier, A., R. Goethe, H. J. Wisselink, H. E. Smith and P. Valentin-Weigand (2001). Relatedness of *Streptococcus suis* isolates of various serotypes and clinical backgrounds as evaluated by macrorestriction analysis and expression of potential virulence traits. *J Clin Microbiol* **39**(2): 445-53.

- Amass, S. F., P. SanMiguel and L. K. Clark** (1997). Demonstration of vertical transmission of *Streptococcus suis* in swine by genomic fingerprinting. *J Clin Microbiol* **35**(6): 1595-6.
- Andresen, L. O. and C. Tegtmeier** (2001). Passive immunization of pigs against experimental infection with *Streptococcus suis* serotype 2. *Vet Microbiol* **81**(4): 331-44.
- Arends, J. P. and H. C. Zanen** (1988). Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *Rev Infect Dis* **10**(1): 131-7.
- Baltimore, R. S., D. L. Kasper, C. J. Baker and D. K. Goroff** (1977). Antigenic specificity of opsonophagocytic antibodies in rabbit anti-sera to group B streptococci. *J Immunol* **118**(2): 673-8.
- Banerjee, R., J. Anguita, D. Roos and E. Fikrig** (2000). Cutting edge: infection by the agent of human granulocytic ehrlichiosis prevents the respiratory burst by down-regulating gp91phox. *J Immunol* **164**(8): 3946-9.
- Bauer, S. and H. Tapper** (2004). Membrane retrieval in neutrophils during phagocytosis: inhibition by M protein-expressing *S. pyogenes* bacteria. *J Leukoc Biol* **76**(6): 1142-50.
- Benga, L., R. Goethe, M. Rohde and P. Valentin-Weigand** (2004). Non-encapsulated strains reveal novel insights in invasion and survival of *Streptococcus suis* in epithelial cells. *Cell Microbiol* **6**(9): 867-81.
- Benkirane, R., M. G. Gottschalk and J. D. Dubreuil** (1997). Identification of a *Streptococcus suis* 60-kDa heat-shock protein using western blotting. *FEMS Microbiol Lett* **153**(2): 379-85.
- Berthelot-Herault, F., H. Morvan, A. M. Keribin, M. Gottschalk and M. Kobisch** (2000). Production of muraminidase-released protein (MRP), extracellular factor (EF) and suilysin by field isolates of *Streptococcus suis* capsular types 2, 1/2, 9, 7 and 3 isolated from swine in France. *Vet Res* **31**(5): 473-9.
- Berthelot-Herault, F., M. Gottschalk, A. Labbe, R. Cariolet and M. Kobisch** (2001). Experimental airborne transmission of *Streptococcus suis* capsular type 2 in pigs. *Vet Microbiol* **82**(1): 69-80.
- Berthelot-Herault, F., C. Marois, M. Gottschalk and M. Kobisch** (2002). Genetic diversity of *Streptococcus suis* strains isolated from pigs and humans as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* **40**(2): 615-9.

Berthelot-Herault, F., M. Gottschalk, H. Morvan and M. Kobisch (2005). Dilemma of virulence of *Streptococcus suis*: Canadian isolate 89-1591 characterized as a virulent strain using a standardized experimental model in pigs. *Can J Vet Res* **69**(3): 236-40.

Boetner, A. G., M. Binder and V. Bille-Hansen (1987). *Streptococcus suis* infections in Danish pigs and experimental infection with *Streptococcus suis* serotype 7. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B]* **95**(4): 233-9.

Brandt, C. T., J. D. Lundgren, S. P. Lund, N. Frimodt-Moller, T. Christensen, T. Benfield, F. Espersen, D. M. Hougaard and C. Ostergaard (2004). Attenuation of the bacterial load in blood by pretreatment with granulocyte-colony-stimulating factor protects rats from fatal outcome and brain damage during *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *Infect Immun* **72**(8): 4647-53.

Brassard, J., M. Gottschalk and S. Quessy (2001). Decrease of the adhesion of *Streptococcus suis* serotype 2 mutants to embryonic bovine tracheal cells and porcine tracheal rings. *Can J Vet Res* **65**(3): 156-60.

Brassard, J., M. Gottschalk and S. Quessy (2004). Cloning and purification of the *Streptococcus suis* serotype 2 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its involvement as an adhesin. *Vet Microbiol* **102**(1-2): 87-94.

Brazeau, C., M. Gottschalk, S. Vincelette and B. Martineau-Doize (1996). In vitro phagocytosis and survival of *Streptococcus suis* capsular type 2 inside murine macrophages. *Microbiology* **142** (Pt 5): 1231-7.

Burg, N. D. and M. H. Pillinger (2001). The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clin Immunol* **99**(1): 7-17.

Busque, P., R. Higgins, S. Senechal, R. Marchand and S. Quessy (1998). Simultaneous flow cytometric measurement of *Streptococcus suis* phagocytosis by polymorphonuclear and mononuclear blood leukocytes. *Vet Microbiol* **63**(2-4): 229-38.

Campbell, J. R. and M. S. Edwards (2000). Cytokines enhance opsonophagocytosis of type III group B Streptococcus. *J Perinatol* **20**(4): 225-30.

Carlyon, J. A. and E. Fikrig (2003). Invasion and survival strategies of *Anaplasma phagocytophilum*. *Cell Microbiol* **5**(11): 743-54.

Cavaillon, J. M. (1996). Les Cytokines. Paris, Masson.

Charland, N., M. Kobisch, B. Martineau-Doize, M. Jacques and M. Gottschalk (1996). Role of capsular sialic acid in virulence and resistance to phagocytosis of *Streptococcus suis* capsular type 2. *FEMS Immunol Med Microbiol* **14**(4): 195-203.

Charland, N., M. Jacques, S. Lacouture and M. Gottschalk (1997). Characterization and protective activity of a monoclonal antibody against a capsular epitope shared by *Streptococcus suis* serotypes 1, 2 and 1/2. *Microbiology* **143** (Pt 11): 3607-14.

Charland, N., J. Harel, M. Kobisch, S. Lacasse and M. Gottschalk (1998). *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology* **144** (Pt 2): 325-32.

Charland, N., V. Nizet, C. E. Rubens, K. S. Kim, S. Lacouture and M. Gottschalk (2000). *Streptococcus suis* serotype 2 interactions with human brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun* **68**(2): 637-43.

Chatellier, S., M. Gottschalk, R. Higgins, R. Brousseau and J. Harel (1999). Relatedness of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from different geographic origins as evaluated by molecular fingerprinting and phenotyping. *J Clin Microbiol* **37**(2): 362-6.

Chau, P. Y., C. Y. Huang and R. Kay (1983). *Streptococcus suis* meningitis. An important underdiagnosed disease in Hong Kong. *Med J Aust* **1**(9): 414-6, 7.

Cheng, Q., B. Carlson, S. Pillai, R. Eby, L. Edwards, S. B. Olmsted and P. Cleary (2001). Antibody against surface-bound C5a peptidase is opsonic and initiates macrophage killing of group B streptococci. *Infect Immun* **69**(4): 2302-8.

Chertov, O., D. Yang, O. M. Howard and J. J. Oppenheim (2000). Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses. *Immunol Rev* **177**: 68-78.

Clifton-Hadley, F. A. (1983). *Streptococcus suis* type 2 infections. *Br Vet J* **139**(1): 1-5.

Clifton-Hadley, F. A. (1984). Studies of *Streptococcus suis* type 2 infection in pigs. *Vet Res Commun* **8**(3): 217-27.

Clifton-Hadley, F. A., T. J. Alexander and M. R. Enright (1986). Monitoring herds for *Streptococcus suis* type 2: chance contamination of slaughter pigs. *Vet Rec* **118**(10): 274.

Cloutier, G., S. D'Allaire, G. Martinez, C. Surprenant, S. Lacouture and M. Gottschalk (2003). Epidemiology of *Streptococcus suis* serotype 5 infection in a pig herd with and without clinical disease. *Vet Microbiol* **97**(1-2): 135-51.

Colino, J. and C. M. Snapper (2003). Two distinct mechanisms for induction of dendritic cell apoptosis in response to intact *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol* **171**(5): 2354-65.

Collins, L. V., S. A. Kristian, C. Weidenmaier, M. Faigle, K. P. Van Kessel, J. A. Van Strijp, F. Gotz, B. Neumeister and A. Peschel (2002). *Staphylococcus aureus* strains lacking D-alanine modifications of teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice. *J Infect Dis* **186**(2): 214-9.

Cornelis, G. R. (2002). Yersinia type III secretion: send in the effectors. *J Cell Biol* **158**(3): 401-8.

Crujisen, T. L., L. A. Van Leengoed, T. C. Dekker-Nooren, E. J. Schoevers and J. H. Verheijden (1992). Phagocytosis and killing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes isolated from pigs. *Infect Immun* **60**(11): 4867-71.

Cunnion, K. M., H. M. Zhang and M. M. Frank (2003). Availability of complement bound to *Staphylococcus aureus* to interact with membrane complement receptors influences efficiency of phagocytosis. *Infect Immun* **71**(2): 656-62.

Dahlgren, C. and A. Karlsson (1999). Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Methods* **232**(1-2): 3-14.

Dale, J. B., R. G. Washburn, M. B. Marques and M. R. Wessels (1996). Hyaluronate capsule and surface M protein in resistance to opsonization of group A streptococci. *Infect Immun* **64**(5): 1495-501.

de Greeff, A., H. Buys, R. Verhaar, J. Dijkstra, L. van Alphen and H. E. Smith (2002). Contribution of fibronectin-binding protein to pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* **70**(3): 1319-25.

Dee, S. A., A. R. Carlson, N. L. Winkelman and M. M. Corey (1993). Effect of management practices on the *Streptococcus suis* carrier rate in nursery swine. *J Am Vet Med Assoc* **203**(2): 295-9.

DeMaster, E., N. Schnitzler, Q. Cheng and P. Cleary (2002). M(+) group a streptococci are phagocytized and killed in whole blood by C5a-activated polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* **70**(1): 350-9.

Demoor, C. E. (1963). Septicaemic Infections in Pigs, Caused by Haemolytic Streptococci of New Lancefield Groups Designated R, S, and T. *Antonie Van Leeuwenhoek* **29**: 272-80.

- Devriese, L. A. and F. Haesebrouck** (1992). *Streptococcus suis* infections in horses and cats. *Vet Rec* **130**(17): 380.
- Devriese, L. A., J. Hommeez, B. Pot and F. Haesebrouck** (1994). Identification and composition of the streptococcal and enterococcal flora of tonsils, intestines and faeces of pigs. *J Appl Bacteriol* **77**(1): 31-6.
- Diarra, M. S., D. Petitclerc, E. Deschenes, N. Lessard, G. Grondin, B. G. Talbot and P. Lacasse** (2003). Lactoferrin against *Staphylococcus aureus* Mastitis. Lactoferrin alone or in combination with penicillin G on bovine polymorphonuclear function and mammary epithelial cells colonisation by *Staphylococcus aureus*. *Vet Immunol Immunopathol* **95**(1-2): 33-42.
- Doran, K. S., G. Y. Liu and V. Nizet** (2003). Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin activates neutrophil signaling pathways in brain endothelium and contributes to development of meningitis. *J Clin Invest* **112**(5): 736-44.
- Drevets, D. A. and P. J. Leenen** (2000). Leukocyte-facilitated entry of intracellular pathogens into the central nervous system. *Microbes Infect* **2**(13): 1609-18.
- Drevets, D. A., T. A. Jelinek and N. E. Freitag** (2001). *Listeria monocytogenes*-infected phagocytes can initiate central nervous system infection in mice. *Infect Immun* **69**(3): 1344-50.
- Dupas, D., M. Vignon and C. Geraut** (1992). *Streptococcus suis* meningitis. A severe noncompensated occupational disease. *J Occup Med* **34**(11): 1102-5.
- Durand, F., C. L. Perino, C. Recule, J. P. Brion, M. Kobish, F. Guerber and J. Croize** (2001). Bacteriological diagnosis of *Streptococcus suis* meningitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **20**(7): 519-21.
- Echchannaoui, H., K. Frei, M. Letiembre, R. M. Strieter, Y. Adachi and R. Landmann** (2005). CD14 deficiency leads to increased MIP-2 production, CXCR2 expression, neutrophil transmigration, and early death in pneumococcal infection. *J Leukoc Biol* **78**(3): 705-15.
- Edwards, M. S., D. L. Kasper, H. J. Jennings, C. J. Baker and A. Nicholson-Weller** (1982). Capsular sialic acid prevents activation of the alternative complement pathway by type III, group B streptococci. *J Immunol* **128**(3): 1278-83.
- Elliott, S. D.** (1966). Streptococcal infection in young pigs. I. An immunochemical study of the causative agent (PM streptococcus). *J Hyg (Lond)* **64**(2): 205-12.

- Esgleas, M., S. Lacouture and M. Gottschalk** (2005). *Streptococcus suis* serotype 2 binding to extracellular matrix proteins. *FEMS Microbiol Lett* **244**(1): 33-40.
- Euzéby, J. P.** (1999). *Streptococcus suis*: une brève revue. *Revue Méd Vét* **150**: 981-8.
- Feder, I., M. M. Chengappa, B. Fenwick, M. Rider and J. Staats** (1994). Partial characterization of *Streptococcus suis* type 2 hemolysin. *J Clin Microbiol* **32**(5): 1256-60.
- Field, H. I., D. Buntain and J. T. Done** (1954). Studies on piglet mortality. I. Streptococcal meningitis and arthritis. *Vet Rec* **66**: 453-5.
- Fongcom, A., S. Pruksakorn, R. Mongkol, P. Tharavichitkul and N. Yoonim** (2001). *Streptococcus suis* infection in northern Thailand. *J Med Assoc Thai* **84**(10): 1502-8.
- Fontaine, M. C., J. Perez-Casal and P. J. Willson** (2004). Investigation of a novel DNase of *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* **72**(2): 774-81.
- Gokce, H. I., G. Ross and Z. Woldehiwet** (1999). Inhibition of phagosome-lysosome fusion in ovine polymorphonuclear leucocytes by *Ehrlichia (Cytoecetes) phagocytophila*. *J Comp Pathol* **120**(4): 369-81.
- Gottschalk, M., R. Higgins, M. Jacques, K. R. Mittal and J. Henrichsen** (1989). Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol* **27**(12): 2633-6.
- Gottschalk, M., A. Lebrun, M. Jacques and R. Higgins** (1990). Hemagglutination properties of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol* **28**(9): 2156-8.
- Gottschalk, M., R. Higgins, M. Jacques, M. Beaudoin and J. Henrichsen** (1991a). Isolation and characterization of *Streptococcus suis* capsular types 9-22. *J Vet Diagn Invest* **3**(1): 60-5.
- Gottschalk, M., S. Petitbois, R. Higgins and M. Jacques** (1991b). Adherence of *Streptococcus suis* capsular type 2 to porcine lung sections. *Can J Vet Res* **55**(3): 302-4.
- Gottschalk, M., R. Higgins, M. Jacques and D. Dubreuil** (1992). Production and characterization of two *Streptococcus suis* capsular type 2 mutants. *Vet Microbiol* **30**(1): 59-71.
- Gottschalk, M., A. Lebrun, H. Wisselink, J. D. Dubreuil, H. Smith and U. Vecht** (1998). Production of virulence-related proteins by Canadian strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. *Can J Vet Res* **62**(1): 75-9.

Gottschalk, M. and M. Segura (2000). The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet Microbiol* **76**(3): 259-72.

Gottschalk, M., M. Kobisch and F. Berthelot-Herault (2001). L'infection à *Streptococcus suis* chez le porc: revue général. *Journées Rech Porcine en France* **33**: 269-76.

Gottschalk, M. (2004). Porcine *Streptococcus suis* strains as potential sources of infection in humans: an underdiagnosed problem in North America? *J Swine Health Prod* **12**(4): 197-9.

Gottschalk, M. G., S. Lacouture and J. D. Dubreuil (1995). Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin. *Microbiology* **141** (Pt 1): 189-95.

Gresham, H. D., J. H. Lowrance, T. E. Caver, B. S. Wilson, A. L. Cheung and F. P. Lindberg (2000). Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J Immunol* **164**(7): 3713-22.

Haataja, S., K. Tikkanen, J. Liukkonen, C. Francois-Gerard and J. Finne (1993). Characterization of a novel bacterial adhesion specificity of *Streptococcus suis* recognizing blood group P receptor oligosaccharides. *J Biol Chem* **268**(6): 4311-7.

Haataja, S., K. Tikkanen, J. Hytonen and J. Finne (1996). The Gal alpha 1-4 Gal-binding adhesin of *Streptococcus suis*, a gram-positive meningitis-associated bacterium. *Adv Exp Med Biol* **408**: 25-34.

Halaby, T., E. Hoitsma, R. Hupperts, L. Spanjaard, M. Luirink and J. Jacobs (2000). *Streptococcus suis* meningitis, a poacher's risk. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19**(12): 943-5.

Hall, M. A., M. E. Hickman, C. J. Baker and M. S. Edwards (1994). Complement and antibody in neutrophil-mediated killing of type V group B streptococcus. *J Infect Dis* **170**(1): 88-93.

Hampton, M. B., A. J. Kettle and C. C. Winterbourn (1998). Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* **92**(9): 3007-17.

Hampton, M. B. and C. C. Winterbourn (1999). Methods for quantifying phagocytosis and bacterial killing by human neutrophils. *J Immunol Methods* **232**(1-2): 15-22.

Herron, M. J., C. M. Nelson, J. Larson, K. R. Snapp, G. S. Kansas and J. L. Goodman (2000). Intracellular parasitism by the human granulocytic ehrlichiosis bacterium through the P-selectin ligand, PSGL-1. *Science* **288**(5471): 1653-6.

- Higgins, R., M. Gottschalk and M. Beaudoin** (1989). *Streptococcus suis* infection in swine. A sixteen month study. *Can J Vet Res* **54**: 170-3.
- Higgins, R. and M. Gottschalk** (1990). An update on *Streptococcus suis* identification. *J Vet Diagn Invest* **2**(3): 249-52.
- Higgins, R., M. Gottschalk, M. Boudreau, A. Lebrun and J. Henrichsen** (1995). Description of six new capsular types (29-34) of *Streptococcus suis*. *J Vet Diagn Invest* **7**(3): 405-6.
- Higgins, R., A. Lagace, S. Messier and L. Julien** (1997). Isolation of *Streptococcus suis* from a young wild boar. *Can Vet J* **38**(2): 114.
- Higgins, R. and M. Gottschalk** (1999). Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in 1998. *Can Vet J* **40**(4): 277.
- Higgins, R. and M. Gottschalk** (2001). Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in 2000. *Can Vet J* **42**(3): 223.
- Higgins, R. and G. M** (2005). Streptococcal Diseases. *In Diseases of swine*. Straw B E, D'Allaire S, Mengeling W L and T. D. J. Ames, Iowa State University: 769-83.
- Hill, J. E., M. Gottschalk, R. Brousseau, J. Harel, S. M. Hemmingsen and S. H. Goh** (2005). Biochemical analysis, cpn60 and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*. *Vet Microbiol* **107**(1-2): 63-9.
- Huang, S. H. and A. Y. Jong** (2001). Cellular mechanisms of microbial proteins contributing to invasion of the blood-brain barrier. *Cell Microbiol* **3**(5): 277-87.
- Jacks-Weis, J., Y. Kim and P. P. Cleary** (1982). Restricted deposition of C3 on M+ group A streptococci: correlation with resistance to phagocytosis. *J Immunol* **128**(4): 1897-902.
- Jacobs, A. A., P. L. Loeffen, A. J. van den Berg and P. K. Storm** (1994). Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*. *Infect Immun* **62**(5): 1742-8.
- Jacobs, A. A., A. J. van den Berg, J. C. Baars, B. Nielsen and L. W. Johannsen** (1995). Production of suilysin, the thiol-activated haemolysin of *Streptococcus suis*, by field isolates from diseased pigs. *Vet Rec* **137**(12): 295-6.

Jacobs, A. A., A. J. van den Berg and P. L. Loeffen (1996). Protection of experimentally infected pigs by suliyisin, the thiol-activated haemolysin of *Streptococcus suis*. *Vet Rec* **139**(10): 225-8.

Jacques, M., M. Gottschalk, B. Foiry and R. Higgins (1990). Ultrastructural study of surface components of *Streptococcus suis*. *J Bacteriol* **172**(6): 2833-8.

Jansen, J. and C. A. van Dorssen (1951). Meningitis en encephalitis bij varkens door streptococcen. *Tijdschr Diergeneesk* **76**: 815-32.

Jobin, M. C. and D. Grenier (2003). Identification and characterization of four proteases produced by *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiol Lett* **220**(1): 113-9.

Jobin, M. C., J. Brassard, S. Quessy, M. Gottschalk and D. Grenier (2004). Acquisition of host plasmin activity by the Swine pathogen *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* **72**(1): 606-10.

Jobin, M. C., G. Martinez, J. Motard, M. Gottschalk and D. Grenier (2005). Cloning, purification, and enzymatic properties of dipeptidyl peptidase IV from the swine pathogen *Streptococcus suis*. *J Bacteriol* **187**(2): 795-9.

Kettritz, R., M. Choi, S. Rolle, M. Wellner and F. C. Luft (2004). Integrins and cytokines activate nuclear transcription factor-kappaB in human neutrophils. *J Biol Chem* **279**(4): 2657-65.

Keymer, I. F., S. E. Heath and J. G. Wood (1983). *Streptococcus suis* type II infection in a raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) family Canidae. *Vet Rec* **113**(26-27): 624.

Kilpper-Balz, R. and K. H. Schleifer (1987). *Streptococcus suis* sp. nov., nom. rev. *J Syst Bacteriol* **37**: 160-2.

King, S. J., P. J. Heath, I. Luque, C. Tarradas, C. G. Dowson and A. M. Whatmore (2001). Distribution and genetic diversity of suliyisin in *Streptococcus suis* isolated from different diseases of pigs and characterization of the genetic basis of suliyisin absence. *Infect Immun* **69**(12): 7572-82.

King, S. J., A. G. Allen, D. J. Maskell, C. G. Dowson and A. M. Whatmore (2004). Distribution, genetic diversity, and variable expression of the gene encoding hyaluronate lyase within the *Streptococcus suis* population. *J Bacteriol* **186**(14): 4740-7.

Klebanoff, S. J. (2005). Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* **77**(5): 598-625.

- Kobayashi, S. D., J. M. Voyich and F. R. DeLeo** (2003). Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. *Microbes Infect* **5**(14): 1337-44.
- Kuby, J., R. A. Goldsby, T. J. Kindt and B. A. Osborne** (2001). Immunologie: le cours de Janis Kuby: avec questions de révision. Paris, Dunod.
- Kvietys, P. R. and M. Sandig** (2001). Neutrophil diapedesis: paracellular or transcellular? *News Physiol Sci* **16**: 15-9.
- Kwiatkowska, K. and A. Sobota** (1999). Signaling pathways in phagocytosis. *Bioessays* **21**(5): 422-31.
- Lalonde, M., M. Segura, S. Lacouture and M. Gottschalk** (2000). Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines. *Microbiology* **146** (Pt 8): 1913-21.
- Lancefield, R. C.** (1962). Current knowledge of type-specific M antigens of group A streptococci. *J Immunol* **89**: 307-13.
- Langford, P., A. E. Williams and J. S. Kroll** (1991). Superoxide dismutases of pathogenic and non-pathogenic *Streptococcus suis* type 2 isolates. *FEMS Microbiol Lett* **61**(2-3): 347-50.
- Lapointe, L., S. D'Allaire, A. Lebrun, S. Lacouture and M. Gottschalk** (2002). Antibody response to an autogenous vaccine and serologic profile for *Streptococcus suis* capsular type 1/2. *Can J Vet Res* **66**(1): 8-14.
- Lee, W. L., R. E. Harrison and S. Grinstein** (2003). Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect* **5**(14): 1299-306.
- Lei, B., F. R. DeLeo, N. P. Hoe, M. R. Graham, S. M. Mackie, R. L. Cole, M. Liu, H. R. Hill, D. E. Low, M. J. Federle, J. R. Scott and J. M. Musser** (2001). Evasion of human innate and acquired immunity by a bacterial homolog of CD11b that inhibits opsonophagocytosis. *Nat Med* **7**(12): 1298-305.
- Leib, S. L. and M. G. Tauber** (1999). Pathogenesis of bacterial meningitis. *Infect Dis Clin North Am* **13**(3): 527-48, v-vi.
- Liu, G. Y., K. S. Doran, T. Lawrence, N. Turkson, M. Puliti, L. Tissi and V. Nizet** (2004). Sword and shield: linked group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin and carotenoid pigment function to subvert host phagocyte defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(40): 14491-6.

Lun, S., J. Perez-Casal, W. Connor and P. J. Willson (2003). Role of suilysin in pathogenesis of *Streptococcus suis* capsular serotype 2. *Microb Pathog* **34**(1): 27-37.

Lun, S. and P. J. Willson (2004). Expression of green fluorescent protein and its application in pathogenesis studies of serotype 2 *Streptococcus suis*. *J Microbiol Methods* **56**(3): 401-12.

Madsen, L. W., H. Bak, B. Nielsen, H. E. Jensen, B. Aalbaek and H. J. Riising (2002). Bacterial colonization and invasion in pigs experimentally exposed to *Streptococcus suis* serotype 2 in aerosol. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **49**(5): 211-5.

Marques, M. B., D. L. Kasper, M. K. Pangburn and M. R. Wessels (1992). Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B streptococci. *Infect Immun* **60**(10): 3986-93.

Mayer-Scholl, A., P. Averhoff and A. Zychlinsky (2004). How do neutrophils and pathogens interact? *Curr Opin Microbiol* **7**(1): 62-6.

McCloskey, P. S. and R. J. Salo (2000). Flow cytometric analysis of group B streptococci phagocytosis and oxidative burst in human neutrophils and monocytes. *FEMS Immunol Med Microbiol* **27**(1): 59-65.

Meda, L., S. Gasperini, M. Ceska and M. A. Cassatella (1994). Modulation of proinflammatory cytokine release from human polymorphonuclear leukocytes by gamma interferon. *Cell Immunol* **157**(2): 448-61.

Medina, E., M. Rohde and G. S. Chhatwal (2003). Intracellular survival of *Streptococcus pyogenes* in polymorphonuclear cells results in increased bacterial virulence. *Infect Immun* **71**(9): 5376-80.

Michaud, S., R. Duperval and R. Higgins (1996). *Streptococcus suis* meningitis: First case reported in Quebec. *Can J Infect Dis* **7**: 329-31.

Mott, J., Y. Rikihisa and S. Tsunawaki (2002). Effects of *Anaplasma phagocytophila* on NADPH oxidase components in human neutrophils and HL-60 cells. *Infect Immun* **70**(3): 1359-66.

Normile, D. (2005). Infectious diseases. WHO probes deadliness of China's pig-borne disease. *Science* **309**(5739): 1308-9.

Norton, P. M., C. Rolph, P. N. Ward, R. W. Bentley and J. A. Leigh (1999). Epithelial invasion and cell lysis by virulent strains of *Streptococcus suis* is enhanced by the presence of suilysin. *FEMS Immunol Med Microbiol* **26**(1): 25-35.

Nuutila, J. and E. M. Lilius (2005). Flow cytometric quantitative determination of ingestion by phagocytes needs the distinguishing of overlapping populations of binding and ingesting cells. *Cytometry A* **65**(2): 93-102.

Organization, W. H. (2005). Outbreak associated with *Streptococcus suis* in pigs in China.

Pallares, F. J., P. G. Halbur, C. S. Schmitt, J. A. Roth, T. Opriessnig, P. J. Thomas, J. M. Kinyon, D. Murphy, D. E. Frank and L. J. Hoffman (2003). Comparison of experimental models for *Streptococcus suis* infection of conventional pigs. *Can J Vet Res* **67**(3): 225-8.

Parker, L. C., M. K. Whyte, S. K. Dower and I. Sabroe (2005). The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *J Leukoc Biol* **77**(6): 886-92.

Paton, J. C., B. Rowan-Kelly and A. Ferrante (1984). Activation of human complement by the pneumococcal toxin pneumolysin. *Infect Immun* **43**(3): 1085-7.

Pedroli, S., M. Kobisch, O. Beauchet, J. P. Chaussinand and F. Lucht (2003). *Streptococcus suis* bacteremia. *Presse Med* **32**(13 Pt 1): 599-601.

Perch, B., P. Kristjansen and K. Skadhauge (1968). Group R streptococci pathogenic for man. Two cases of meningitis and one fatal case of sepsis. *Acta Pathol Microbiol Scand* **74**(1): 69-76.

Perch, B., K. B. Pedersen and J. Henrichsen (1983). Serology of capsulated streptococci pathogenic for pigs: six new serotypes of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol* **17**(6): 993-6.

Quessy, S., J. D. Dubreuil, M. Jacques, F. Malouin and R. Higgins (1994). Increase of capsular material thickness following in vivo growth of virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains. *FEMS Microbiol Lett* **115**(1): 19-26.

Quessy, S., P. Busque, R. Higgins, M. Jacques and J. D. Dubreuil (1997). Description of an albumin binding activity for *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Microbiol Lett* **147**(2): 245-50.

Rainard, P., C. Riollet, B. Poutrel and M. J. Paape (2000). Phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* by bovine neutrophils after priming by tumor necrosis factor-alpha and the des-arginine derivative of C5a. *Am J Vet Res* **61**(8): 951-9.

Reams, R. Y., L. T. Glickman, D. D. Harrington, H. L. Thacker and T. L. Bowersock (1994). *Streptococcus suis* infection in swine: a retrospective study of 256 cases. Part II. Clinical signs, gross and microscopic lesions, and coexisting microorganisms. *J Vet Diagn Invest* **6**(3): 326-34.

Reams, R. Y., D. D. Harrington, L. T. Glickman, H. L. Thacker and T. L. Bowersock (1996). Multiple serotypes and strains of *Streptococcus suis* in naturally infected swine herds. *J Vet Diagn Invest* **8**(1): 119-21.

Robertson, I. D. and D. K. Blackmore (1989a). Occupational exposure to *Streptococcus suis* type 2. *Epidemiol Infect* **103**(1): 157-64.

Robertson, I. D. and D. K. Blackmore (1989b). Prevalence of *Streptococcus suis* types 1 and 2 in domestic pigs in Australia and New Zealand. *Vet Rec* **124**(15): 391-4.

Robertson, I. D., D. K. Blackmore, D. J. Hampson and Z. F. Fu (1991). A longitudinal study of natural infection of piglets with *Streptococcus suis* types 1 and 2. *Epidemiol Infect* **107**(1): 119-26.

Rubins, J. B., D. Charboneau, C. Fasching, A. M. Berry, J. C. Paton, J. E. Alexander, P. W. Andrew, T. J. Mitchell and E. N. Janoff (1996). Distinct roles for pneumolysin's cytotoxic and complement activities in the pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* **153**(4 Pt 1): 1339-46.

Salasia, S. I., C. Lammler and G. Herrmann (1995). Properties of a *Streptococcus suis* isolate of serotype 2 and two capsular mutants. *Vet Microbiol* **45**(2-3): 151-6.

Salles, M. W., J. Perez-Casal, P. Willson and D. M. Middleton (2002). Changes in the leucocyte subpopulations of the palatine tonsillar crypt epithelium of pigs in response to *Streptococcus suis* type 2 infection. *Vet Immunol Immunopathol* **87**(1-2): 51-63.

Salyers, A. A. and D. D. Whitt (2002). Bacterial pathogenesis: a molecular approach. Washington, D.C., ASM Press.

Sanford, S. E. and M. E. Tilker (1982). *Streptococcus suis* type II-associated diseases in swine: observations of a one-year study. *J Am Vet Med Assoc* **181**(7): 673-6.

Sanford, S. E. (1987). Gross and histopathological findings in unusual lesions caused by *Streptococcus suis* in pigs. II. Central nervous system lesions. *Can J Vet Res* **51**(4): 486-9.

Scaife, H., Z. Woldehiwet, C. A. Hart and S. W. Edwards (2003). *Anaplasma phagocytophilum* reduces neutrophil apoptosis in vivo. *Infect Immun* **71**(4): 1995-2001.

Schnitzler, N., G. Haase, A. Podbielski, R. Luttkicken and K. G. Schweizer (1999). A co-stimulatory signal through ICAM-beta2 integrin-binding potentiates neutrophil phagocytosis. *Nat Med* **5**(2): 231-5.

Segal, A. W. (2005). How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* **23**: 197-223.

Segers, R. P., T. Kenter, L. A. de Haan and A. A. Jacobs (1998). Characterisation of the gene encoding suilysin from *Streptococcus suis* and expression in field strains. *FEMS Microbiol Lett* **167**(2): 255-61.

Segura, M., J. Stankova and M. Gottschalk (1999). Heat-killed *Streptococcus suis* capsular type 2 strains stimulate tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by murine macrophages. *Infect Immun* **67**(9): 4646-54.

Segura, M. and M. Gottschalk (2002). *Streptococcus suis* interactions with the murine macrophage cell line J774: adhesion and cytotoxicity. *Infect Immun* **70**(8): 4312-22.

Segura, M., N. Vadeboncoeur and M. Gottschalk (2002). CD14-dependent and -independent cytokine and chemokine production by human THP-1 monocytes stimulated by *Streptococcus suis* capsular type 2. *Clin Exp Immunol* **127**(2): 243-54.

Segura, M., M. Gottschalk and M. Olivier (2004). Encapsulated *Streptococcus suis* inhibits activation of signaling pathways involved in phagocytosis. *Infect Immun* **72**(9): 5322-30.

Segura, M. A., P. Cleroux and M. Gottschalk (1998). *Streptococcus suis* and group B *Streptococcus* differ in their interactions with murine macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol* **21**(3): 189-95.

Serhir, B., D. Dubreuil, R. Higgins and M. Jacques (1995). Purification and characterization of a 52-kilodalton immunoglobulin G-binding protein from *Streptococcus suis* capsular type 2. *J Bacteriol* **177**(13): 3830-6.

Shi, J., R. D. Goodband, M. M. Chengappa, J. L. Nelssen, M. D. Tokach, D. S. McVey and F. Blecha (1994). Influence of interleukin-1 on neutrophil function and resistance to *Streptococcus suis* in neonatal pigs. *J Leukoc Biol* **56**(1): 88-94.

Sihvonen, L., D. N. Kurl and J. Henrichsen (1988). *Streptococcus suis* isolated from pigs in Finland. *Acta Vet Scand* **29**(1): 9-13.

Simons, M. P., W. M. Nauseef and M. A. Apicella (2005). Interactions of *Neisseria gonorrhoeae* with adherent polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* **73**(4): 1971-7.

Smith, H. E., U. Vecht, A. L. Gielkens and M. A. Smits (1992). Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the 136-kilodalton surface protein (muramidase-released protein) of *Streptococcus suis* type 2. *Infect Immun* **60**(6): 2361-7.

Smith, H. E., F. H. Reek, U. Vecht, A. L. Gielkens and M. A. Smits (1993). Repeats in an extracellular protein of weakly pathogenic strains of *Streptococcus suis* type 2 are absent in pathogenic strains. *Infect Immun* **61**(8): 3318-26.

Smith, H. E., U. Vecht, H. J. Wisselink, N. Stockhofe-Zurwieden, Y. Biermann and M. A. Smits (1996). Mutants of *Streptococcus suis* types 1 and 2 impaired in expression of muramidase-released protein and extracellular protein induce disease in newborn germfree pigs. *Infect Immun* **64**(10): 4409-12.

Smith, H. E., M. Damman, J. van der Velde, F. Wagenaar, H. J. Wisselink, N. Stockhofe-Zurwieden and M. A. Smits (1999). Identification and characterization of the cps locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. *Infect Immun* **67**(4): 1750-6.

Smith, J. A. (1994). Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol* **56**(6): 672-86.

Spanaus, K. S., D. Nadal, H. W. Pfister, J. Seebach, U. Widmer, K. Frei, S. Gloor and A. Fontana (1997). C-X-C and C-C chemokines are expressed in the cerebrospinal fluid in bacterial meningitis and mediate chemotactic activity on peripheral blood-derived polymorphonuclear and mononuclear cells in vitro. *J Immunol* **158**(4): 1956-64.

Sprenger, H., A. Rosler, P. Tonn, H. J. Braune, G. Huffmann and D. Gemsa (1996). Chemokines in the cerebrospinal fluid of patients with meningitis. *Clin Immunol Immunopathol* **80**(2): 155-61.

Staali, L., M. Morgelin, L. Bjorck and H. Tapper (2003). *Streptococcus pyogenes* expressing M and M-like surface proteins are phagocytosed but survive inside human neutrophils. *Cell Microbiol* **5**(4): 253-65.

Staats, J. J., I. Feder, O. Okwumabua and M. M. Chengappa (1997). *Streptococcus suis*: past and present. *Vet Res Commun* **21**(6): 381-407.

Staats, J. J., B. L. Plattner, G. C. Stewart and M. M. Changappa (1999). Presence of the *Streptococcus suis* sulysin gene and expression of MRP and EF correlates with high virulence in *Streptococcus suis* type 2 isolates. *Vet Microbiol* **70**(3-4): 201-11.

Suankratay, C., P. Intalapaporn, P. Nunthapisud, K. Arunyingmongkol and H. Wilde (2004). *Streptococcus suis* meningitis in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **35**(4): 868-76.

Takahashi, S., Y. Nagano, N. Nagano, O. Hayashi, F. Taguchi and Y. Okuwaki (1995). Role of C5a-ase in group B streptococcal resistance to opsonophagocytic killing. *Infect Immun* **63**(12): 4764-9.

Tarradas, C., I. Luque, D. de Andres, Y. E. Abdel-Aziz Shahein, P. Pons, F. Gonzalez, C. Borge and A. Perea (2001). Epidemiological relationship of human and swine *Streptococcus suis* isolates. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **48**(5): 347-55.

Tenenbaum, T., R. Adam, I. Eggelnpohler, D. Matalon, A. Seibt, K. N. GE, H. J. Galla and H. Schrotten (2005). Strain-dependent disruption of blood-cerebrospinal fluid barrier by *Streptococcus suis* in vitro. *FEMS Immunol Med Microbiol* **44**(1): 25-34.

Tikkanen, K., S. Haataja, C. Francois-Gerard and J. Finne (1995). Purification of a galactosyl-alpha 1-4-galactose-binding adhesin from the gram-positive meningitis-associated bacterium *Streptococcus suis*. *J Biol Chem* **270**(48): 28874-8.

Tikkanen, K., S. Haataja and J. Finne (1996). The galactosyl-(alpha 1-4)-galactose-binding adhesin of *Streptococcus suis*: occurrence in strains of different hemagglutination activities and induction of opsonic antibodies. *Infect Immun* **64**(9): 3659-65.

Torremorell, M., M. Calsamiglia and C. Pijoan (1998). Colonization of suckling pigs by *Streptococcus suis* with particular reference to pathogenic serotype 2 strains. *Can J Vet Res* **62**(1): 21-6.

Touil, F., R. Higgins and M. Nadeau (1988). Isolation of *Streptococcus suis* from diseased pigs in Canada. *Vet Microbiol* **17**(2): 171-7.

Ulett, G. C., J. F. Bohnsack, J. Armstrong and E. E. Adderson (2003). Beta-hemolysin-independent induction of apoptosis of macrophages infected with serotype III group B streptococcus. *J Infect Dis* **188**(7): 1049-53.

Vadeboncoeur, N., M. Segura, D. Al-Numani, G. Vanier and M. Gottschalk (2003). Pro-inflammatory cytokine and chemokine release by human brain microvascular endothelial cells stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Immunol Med Microbiol* **35**(1): 49-58.

Valdivia, R. H. and S. Falkow (1998). Flow cytometry and bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **1**(3): 359-63.

Vanier, G., M. Segura, P. Friedl, S. Lacouture and M. Gottschalk (2004). Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* **72**(3): 1441-9.

Vecht, U., J. P. Arends, E. J. van der Molen and L. A. van Leengoed (1989). Differences in virulence between two strains of *Streptococcus suis* type II after experimentally induced infection of newborn germ-free pigs. *Am J Vet Res* **50**(7): 1037-43.

- Vecht, U., H. J. Wisselink, M. L. Jellema and H. E. Smith** (1991). Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. *Infect Immun* **59**(9): 3156-62.
- Vecht, U., H. J. Wisselink, N. Stockhofe-Zurwieden and H. E. Smith** (1996). Characterization of virulence of the *Streptococcus suis* serotype 2 reference strain Henrichsen S 735 in newborn gnotobiotic pigs. *Vet Microbiol* **51**(1-2): 125-36.
- Vela, A. I., J. Goyache, C. Tarradas, I. Luque, A. Mateos, M. A. Moreno, C. Borge, J. A. Perea, L. Dominguez and J. F. Fernandez-Garayzabal** (2003). Analysis of genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs in Spain by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* **41**(6): 2498-502.
- Voyich, J. M., D. E. Sturdevant, K. R. Braughton, S. D. Kobayashi, B. Lei, K. Virtaneva, D. W. Dorward, J. M. Musser and F. R. DeLeo** (2003). Genome-wide protective response used by group A Streptococcus to evade destruction by human polymorphonuclear leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(4): 1996-2001.
- Voyich, J. M., J. M. Musser and F. R. DeLeo** (2004). *Streptococcus pyogenes* and human neutrophils: a paradigm for evasion of innate host defense by bacterial pathogens. *Microbes Infect* **6**(12): 1117-23.
- Wade, B. H. and G. L. Mandell** (1983). Polymorphonuclear leukocytes: dedicated professional phagocytes. *Am J Med* **74**(4): 686-93.
- Watkins, E. J., P. Brooksby, M. S. Schweiger and S. M. Enright** (2001). Septicaemia in a pig-farm worker. *Lancet* **357**(9249): 38.
- Watorek, W.** (2003). Azurocidin -- inactive serine proteinase homolog acting as a multifunctional inflammatory mediator. *Acta Biochim Pol* **50**(3): 743-52.
- Weineisen, M., U. Sjobring, M. Fallman and T. Andersson** (2004). Streptococcal M5 protein prevents neutrophil phagocytosis by interfering with CD11b/CD18 receptor-mediated association and signaling. *J Immunol* **172**(6): 3798-807.
- Weingart, C. L., G. Broitman-Maduro, G. Dean, S. Newman, M. Pepler and A. A. Weiss** (1999). Fluorescent labels influence phagocytosis of *Bordetella pertussis* by human neutrophils. *Infect Immun* **67**(8): 4264-7.
- Wibawan, I. W. and C. Lammler** (1994). Relation between encapsulation and various properties of *Streptococcus suis*. *Zentralbl Veterinarmed B* **41**(7-8): 453-9.

Williams, A. E. (1990). Relationship between intracellular survival in macrophages and pathogenicity of *Streptococcus suis* type 2 isolates. *Microb Pathog* **8**(3): 189-96.

Williams, A. E. and W. F. Blakemore (1990). Pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus suis* type 2. *J Infect Dis* **162**(2): 474-81.

Windsor, R. S. and S. D. Elliott (1975). Streptococcal infection in young pigs. IV. An outbreak of streptococcal meningitis in weaned pigs. *J Hyg (Lond)* **75**(1): 69-78.

Wisselink, H. J., H. E. Smith, N. Stockhofe-Zurwieden, K. Peperkamp and U. Vecht (2000). Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries. *Vet Microbiol* **74**(3): 237-48.

Wisselink, H. J., U. Vecht, N. Stockhofe-Zurwieden and H. E. Smith (2001). Protection of pigs against challenge with virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains by a muramidase-released protein and extracellular factor vaccine. *Vet Rec* **148**(15): 473-7.

Witko-Sarsat, V., P. Rieu, B. Descamps-Latscha, P. Lesavre and L. Halbwachs-Mecarelli (2000). Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* **80**(5): 617-53.

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Nom de l'étudiant Geneviève Chabot-Roy		
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Pathologie et microbiologie

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Geneviève Chabot-Roy, Philip Willson, Mariela Segura, Sonia Lacouture, Marcelo Gottschalk	
Titre Phagocytosis and killing of <i>Streptococcus suis</i> by porcine neutrophils	
Revue Microbial pathogenesis	Date de publication soumis

DÉCLARATION DES COAUTEURS

Déclaration		
À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que Geneviève Chabot-Roy inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre <i>Étude des interactions entre Streptococcus suis et des neutrophils</i>		
Coauteur Geneviève Chabot-Roy		Date 6-12-2005
Coauteur Philip Willson		Date 6-12-2005
Coauteur Mariela Segura		Date 6-12-2005
Coauteur Sonia Lacouture		Date 6-12-2005
Coauteur Marcelo Gottschalk		Date 6-12-2005
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

¹Annexe II du Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat, mars 2001

