

2m11.2822.5

Université de Montréal

Études des interactions entre *Streptococcus suis* sérotype 2  
et des cellules épithéliales

par

Mélanie Lalonde

Département de pathologie et microbiologie  
Faculté de médecine vétérinaire

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

Avril, 2000

©Mélanie Lalonde, 2000



2000-00-00

L'Université de Montréal

Étude des interactions entre les cellules souches et les cellules différenciées

Étude de la

SF  
607  
U54  
2000  
n. 004

Département de psychologie et neurosciences  
École de psychologie

Mémoire présenté à la Faculté des études  
en vue de l'obtention du grade

de

en

psychologie

Avril 2000

Université de Montréal



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

Études des interactions entre *Streptococcus suis* sérotype 2  
et des cellules épithéliales

présenté par

Mélanie Lalonde

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Monique Doré,	présidente du jury
Marcelo Gottschalk,	directeur de recherche
Sylvain Quessy,	membre du jury

Mémoire accepté le ..... 20 AVR 2000 .....

## SOMMAIRE

*Streptococcus suis* est une bactérie impliquée dans plusieurs maladies porcines à travers le monde, en plus d'être un agent de zoonose. Des 35 sérotypes, le sérotype 2 est le plus prévalent et le plus virulent.

Actuellement, la pathogénèse de l'infection à *S. suis* est mal connue tout en étant possiblement le résultat d'un procédé complexe comprenant plusieurs étapes.

Différentes études ont tenté de préciser la pathogénie de l'infection de *S. suis*. Pendant longtemps l'hypothèse selon laquelle *S. suis* voyagerait dans la circulation sanguine à l'intérieur des monocytes a été considérée comme la plus probable. Toutefois, le faible pourcentage de bactéries phagocytées (moins de 10%) suggère plutôt qu'elles voyagent librement. L'élucidation de la pathogénèse de l'infection par d'autres pathogènes, tels les *Streptococcus* du groupe B (GBS) causant entre autres des méningites, rend plausible l'hypothèse suivante. Tout d'abord, il serait possible que les bactéries interagissent avec les cellules épithéliales des poumons afin de passer des voies respiratoires vers la circulation sanguine. Alternativement, lors de méningites, elles pourraient interagir avec les cellules épithéliales des plexus choroïdiens afin de passer de la circulation sanguine vers le système nerveux central.

Les objectifs de la présente étude étaient donc les suivants: 1) étudier l'adhérence, l'invasion, la survie et l'effet toxique de *S. suis* sérotype 2 sur des lignées de cellules épithéliales et 2) effectuer une comparaison entre *S. suis* sérotype 2 et GBS quant à leurs façons d'interagir avec ces cellules.

Afin d'atteindre ces objectifs, différentes lignées de cellules épithéliales ont été utilisées: la lignée pulmonaire d'origine humaine A549, la lignée rénale d'origine canine MDCK, les lignées de reins d'origine porcine LLC-PK1 et PK(15) ainsi que la lignée d'utérus d'origine humaine HeLa. Différentes souches de *S. suis* sérotype 2 ont



été utilisées : deux souches possédant la suilysine, une souche ne possédant pas la suilysine ainsi qu'un mutant isogénique acapsulé. Il a été observé que *S. suis* est capable d'adhérer mais non d'envahir les cellules épithéliales. La capsule masquerait, du moins en partie, les composants bactériens responsables de l'adhérence. Nos résultats démontrent que la paroi cellulaire serait responsable en partie de l'adhérence aux cellules épithéliales. De plus, l'hémolysine semble être l'élément principal responsable de la cytotoxicité.



1.3.3.3	Rôle de la capsule dans l'adhérence.....	16
1.3.4	Adhésines.....	17
1.3.4.1	Hémagglutinines.....	17
1.3.4.2	Protéine liant l'albumine.....	20
1.3.5	Autres facteurs.....	21
1.3.5.1	Protéines liant les IgG.....	21
1.3.5.2	Protéine de stress.....	21
1.3.5.3	Fimbriae.....	22
1.4	Pathogénie de l'infection.....	22
1.4.1	Voies possibles d'entrée dans la circulation sanguine.....	23
1.4.2	Voies possibles d'entrée dans le système nerveux central.....	24
1.4.2.1	Microvaisseaux cérébraux.....	24
1.4.2.2	Les plexus choroïdiens.....	25
1.5	Interactions entre <i>S. suis</i> et des cellules de l'hôte.....	27
2.	Rôle de l'adhérence avec des cellules épithéliales chez d'autres agents bactériens de pneumonie et méningite.....	29
2.1	<i>Neisseria meningitidis</i> .....	29
2.2	<i>Haemophilus influenzae</i> .....	30
2.3	<i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	32
2.4	<i>Streptococcus</i> du groupe B (GBS).....	34
III- MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS.....		35
Article:	Interactions between <i>Streptococcus suis</i> serotype 2 and different epithelial cell lines.....	36
IV- DISCUSSION.....		77
V- CONCLUSIONS.....		83
VI- BIBLIOGRAPHIE.....		85

## LISTE DES FIGURES

### MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

- Figure 1. Invasion of epithelial cell lines LLC-PK1, PK(15), MDCK, A549 and HeLa by *Streptococcus suis* serotype 2 (strains S735 (■), 31533 (□), AAH4 (△)) and unencapsulated mutant 2A (□) and group B streptococci (strain COH1 (■)). Results were determined after a 2-h exposure with  $10^5$  c.f.u. per well, followed by an additional 2-h incubation in presence of penicillin/gentamicin to kill extracellular bacteria, and epithelial cell lysis to retrieve 100  $\mu$ l aliquots of intracellular bacteria for viable plate counts.....68
- Figure 2. (a) Adhesion of epithelial cell lines LLC-PK1, PK(15), MDCK, A549 and HeLa by *Streptococcus suis* serotype 2 (strains S735 (■), 31533 (□), AAH4 (△) and uncapsulated mutant 2A (□) and group B streptococci (strain COH1 (■)); \*,  $P < 0.05$  versus adherence of the parent strain S735. Results were determined after a 2-h exposure with  $10^5$  c.f.u. per well, followed by extensive washing of non-adherent bacteria and epithelial cell lysis to retrieve 100- $\mu$ l aliquots of total cell-associated bacteria for viable plate counts. (b) Transmission electron micrograph showing *Streptococcus suis* adhered to LLC-PK1; bar : 300 nm. (c) Scanning electron micrograph showing *Streptococcus suis* adhered to LLC-PK1; bar : 2  $\mu$ m.....69

- Figure 3. Adherence kinetic to epithelial cell line LLC-PK1 of *Streptococcus suis* serotype 2, strain S735 in (a) time-dependant way in presence of  $10^5$  c.f.u. per well and (b) dose-dependant way after 2-h incubation.....71
- Figure 4. Effect of *Streptococcus suis* concentration on LLC-PK1 injury. Haemolytic strains S735 ( $\square$ ) and 31533 ( $\sigma$ ); non-haemolytic strain AAH4 ( $\lambda$ ) and GBS strain COH1( $\circ$ ). LLC-PK1 cytotoxicity was determined by LDH release in presence of different concentrations of *S. suis* strains after 4 h- incubation.....73
- Figure 5. Effect of incubation time in presence of *Streptococcus suis* haemolytic strains 31533 ( $\square$ ) and S735 ( $\blacksquare$ ) and non-haemolytic strain AAH4 ( $\boxtimes$ ) on LLC-PK1 injury; \*,  $P < 0.01$  versus the haemolytic strains S735 and 31533 (4 h and 18 h). LLC-PK1 cytotoxicity was determined by LDH release in presence of  $10^8$  c.f.u. per well after different incubation times.....74
- Figure 6. Electron micrographs demonstrating LLC-PK1 injury with  $10^8$  c.f.u./well *Streptococcus suis*. Panel (a): non infected control cells. Panel (b): non-suilysin-producing strain AAH4 (bar: 1  $\mu$ m). Panel (c): Suilysin-producing strain S735 (bar: 300 nm). LLC-PK1 integrity after 2 h- incubation with strain AAH4 was comparable to non infected control cells. Injury was manifested by the lost of the cytoplasmic density, severe disruption of cellular membranes and lost of microvillus structures.....75

Figure 7. Effects of different variables on the cytotoxic effect of *Streptococcus suis* serotype 2 strains S735 (■), 31533 (□) and AAH4 (⊠). Cholesterol ( $400 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) was incubated for 1 h prior to the incubation with cells. LLC-PK1 cytotoxicity was determined by LDH release in presence of different variables after 4-h incubation.....76

**LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS**

BBB :	Blood brain barrier
BMEC :	Brain microvascular endothelial cells
BMH :	Barrière hémato-méningée
CFU :	Colony forming unit (c.f.u.)
CNS :	Central nervous system
CPS :	Polysaccharidic capsule
EF :	Extracellular factor
ELISA :	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESA :	Espace sub-arachnoïdien
Gal :	Galactose
GbO <sub>3</sub> :	Glycolipide trihexosylceramide
GlcNAc :	N-acétylglucosamine
GBS :	Streptocoques du groupe B
IgG:	Immunoglobuline de type G
IgY:	Immunoglobuline de type Y (IgG chez le poulet)
LCR:	Liquide céphalorachidien
LDH:	Lactate dehydrogenase
LPS:	Lipopolysaccharides
MC:	Meningocoque
MEM:	Minimal essential medium
MRP:	Muramidase released protein
SEM:	Scanning electron microscopy
SNC:	Système nerveux central
TEM:	Transmission electron microscopy
THB:	Todd-Hewitt broth

## REMERCIEMENTS

**J'aimerais remercier toutes les personnes ayant participé de près ou de loin à ce projet de maîtrise et plus particulièrement :**

- **Le docteur Marcelo Gottschalk, pour m'avoir tout d'abord chaleureusement accueillie dans son laboratoire. Je le remercie pour m'avoir guidée tout au long de ce projet qu'est la maîtrise par sa présence, ses judicieux conseils et son enthousiasme des plus contagieux.**
- **La docteure Nathalie Charland à la fois pour avoir partagé avec moi son savoir incommensurable que pour son encouragement constant. Mille fois merci.**
- **Sonia Lacouture et Mariela Segura pour leur support inestimable autant au niveau des discussions scientifiques... que ludiques! Sans oublier évidemment leur soutien technique.**
- **Lise Lapointe et Gabriela Martinez, pour nos discussions, nos rires, nos marches, nos folies...et l'inoubliable aventure qu'aura été Chicago!**
- **Tous mes collègues du laboratoire autant de recherche que de diagnostic pour leurs encouragements et le plaisir que j'ai eu à les côtoyer chaque jour.**
- **Tous les membres et étudiants du Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, pour leur implication ou leurs encouragements.**
- **Ma famille, mes amis...et famille de mes amis, pour leur soutien constant, pour leur présence dans les bons et moins bons moments et pour leur affection.**



## **I- INTRODUCTION**

*Streptococcus suis*, un coque à Gram positif alpha-hémolytique, cause plusieurs maladies et syndromes porcins. D'abord identifiée comme appartenant à de nouveaux groupes de Lancefield (R, S, RS et T), il est finalement démontré que la bactérie possède l'antigène qui appartient au groupe D de Lancefield. Les groupes R, S, RS et T deviennent respectivement les types capsulaires (sérotypes) 2, 1, 1/2 et 15. L'espèce *S. suis*, génétiquement homogène et différente des autres espèces appartenant aux groupes de Lancefield, est officialisée en 1987. Jusqu'à ce jour, on dénombre 35 sérotypes de *S. suis*. Les sérotypes sont établis sur la base des antigènes capsulaires polysaccharidiques de la bactérie. *S. suis* est considéré comme un habitant normal du tractus respiratoire supérieur des porcs et les amygdales seraient le réservoir chez les animaux porteurs. Cependant, les streptocoques deviennent parfois invasifs et peuvent causer des méningites, des endocardites, des pneumonies, et des septicémies chez l'espèce porcine. La transmission se ferait par le déplacement d'animaux porteurs entre les troupeaux. La bactérie a aussi été isolée chez plusieurs autres espèces animales (bovins, équins, oiseaux, etc.) dont l'espèce humaine. *S. suis* est un agent de zoonose, surtout pour les personnes en contact fréquent avec les porcs, causant des méningites, des endocardites et des septicémies. Parfois fatales, les infections à *S. suis* chez l'espèce humaine laissent souvent des séquelles telles l'arthrite et la surdité chez les sujets convalescents.

De tous les sérotypes de *S. suis* décrits jusqu'à maintenant, le sérotype 2 est le plus prévalent et le plus virulent à travers le monde. La pathogénèse des infections causées par le sérotype 2 est peu connue. Il est probable qu'elle soit la résultante d'un procédé complexe comportant plusieurs étapes. De plus, bien qu'il y ait plusieurs facteurs de virulence proposés, ces derniers sont peu connus. Plusieurs évidences laissent suggérer que la capsule a pour rôle, entre autres, d'aider la bactérie à être éliminée moins rapidement de la circulation sanguine à l'intérieur de l'hôte. Cependant, ce seul facteur ne suffit pas car il existe plusieurs souches capsulées qui ne sont pas virulentes. Une possibilité envisagée est que l'interaction entre *S. suis* sérotype 2 et des cellules épithéliales puissent jouer un rôle important. Par exemple, il serait possible que la bactérie interagisse avec ce type de cellules au niveau des poumons afin de se rendre

des voies respiratoires vers la circulation sanguine et/ou, lors de méningites, interagisse avec les plexus choroïdiens afin de se rendre de la circulation sanguine vers le système nerveux central. Il semble que cette hypothèse soit valable dans le cas de différents pathogènes dont, entre autres, les streptocoques du groupe B (GBS).

Puisque *S. suis* et GBS sont des pathogènes possédant plusieurs analogies, il serait possible qu'ils aient une pathogénèse similaire.

Le but de ce projet de maîtrise est d'étudier l'adhérence, l'invasion, la survie et l'effet toxique de *S. suis* sérotype 2 sur des lignées de cellules épithéliales. L'hypothèse proposée est que *S. suis* sérotype 2, en réussissant à interagir avec des cellules épithéliales, se créerait un chemin chez l'hôte afin de causer entre autres, selon la situation, une pneumonie, une septicémie ou une méningite.

## **II- REVUE DE LITTÉRATURE**

## 1. *Streptococcus suis*

### 1.1 Généralités sur *S. suis*

Le premier pays où on l'a émis un rapport associant des streptocoques à des méningites, de l'arthrite et une septicémie chez les porcs, est la France en 1912 (Touil et Higgins, 1998). Le terme *Streptococcus suis* est proposé en 1966 (Elliott, 1966). Ce n'est cependant qu'en 1987 qu'elle est officiellement acceptée comme une nouvelle espèce bactérienne (Kilpper-Balz et Schleifer, 1987). *S. suis* représente une des bactéries du porc les plus importantes dans tous les pays où l'industrie porcine est intensive (Higgins et Gottschalk, 1998).

#### 1.1.1 La bactérie

*Streptococcus suis* est une bactérie à Gram positif et de forme ovoïde, se présente seule ou en paires et forme parfois de courtes chaînes (Kilpper-Bälz et Schleifer, 1987; Clifton-Hadley et coll., 1986). Anaérobie facultative, la bactérie forme des colonies grises et minuscules produisant une hémolyse alpha sur la plupart des milieux contenant du sang de diverses espèces animales, mais pouvant être entourées d'une hémolyse beta sur milieu avec sang de cheval (de Moor, 1963; Higgins et Gottschalk, 1990).

L'identification préliminaire de la bactérie requiert une absence de croissance sur milieu contenant 6,5% NaCl, un test Voges-Proskauer (VP) négatif et la production d'acide à partir de bouillon tréhalose et salicine (Higgins et Gottschalk, 1990).

#### 1.1.2 Les sérotypes

Une première caractérisation de ces streptocoques est effectuée par de Moor en 1963. Ils ont été classés comme appartenant aux nouveaux groupes de Lancefield R, S,

RS et T. Elliott (1966) et Windsor et Elliott (1975) ont isolé des streptocoques apparemment identiques à ceux précédemment caractérisés par de Moor. Ils démontrent que ces souches possèdent de l'acide teichoïque lié aux lipides, ce qui caractérise les membres du groupe D de Lancefield. Ils désignent alors ces souches comme étant *Streptococcus suis* sérotype 1, 2 et 1/2 (respectivement les groupes R, S et RS, selon de Moor) selon la composition de leur matériel capsulaire. Kilpper-Balz et Schleifer (1987) démontrent qu'il s'agit d'une espèce génétiquement homogène différente des autres membres du groupes D de Lancefield. De plus, l'analyse des séquences des gènes d'ARN ribosomal 16S permet de montrer une forte similarité (94-100%) entre les souches de référence de *S. suis* (Chatellier et coll., 1998). Des études de caractérisations effectuées par homologie d'ADN (Kilpper-Balz et Schleifer, 1987) et de typage de l'ARN ribosomique 16S (Bentley et coll., 1991) démontrent que *S. suis* est différent des autres membres du groupe D de Lancefield.

Il existe aujourd'hui 35 sérotypes différents (Elliott, 1966; Windsor et Elliott, 1975; Perch et coll., 1983; Gottschalk et coll., 1989; Higgins et coll., 1995). La distinction entre les sérotypes est basée sur la spécificité antigénique au niveau des polysaccharides de la capsule (Alexander, 1995). Des 35 différents sérotypes existants, on ne retrouve pas ces derniers en proportion équivalente dans la population porcine. En effet, la majorité des souches pathogènes isolées des cas cliniques appartiennent aux sérotypes 2, 1/2, 3, 4, 6, 7, 8 et 9 (Higgins et coll., 1995). Certains sérotypes, tels 18, 19 et 21, sont retrouvés généralement chez des animaux cliniquement sains (Higgins et coll., 1995).

C'est le sérotype 2 qui est le plus prévalent à travers le monde (Higgins et Gottschalk, 1998). C'est aussi le sérotype le plus fréquemment associé à la maladie. Si le sérotype 1 est généralement associé aux infections chez de très jeunes porcelets (2 à 6 semaines), le sérotype 2, lui, affecte des porcs de tous âges (Touil et Higgins, 1988; Higgins et Gottschalk, 1998). Tous les sérotypes ne sont pas impliqués dans des infections et des souches d'un même sérotype peuvent causer des infections diverses ou

ne pas causer d'infection du tout (Staats et coll., 1997). Une étude menée pendant un an par Sanford et Tilker (1982), rapporte que *S. suis* sérotype 2 est associé à des bronchopneumonies, des mortalités néonatales, des méningites, des endocardites valvulaires et de l'arthrite.

## 1.2 Les infections causées par *S. suis*

Bien que *S. suis* soit reconnu comme agent responsable de septicémie, d'arthrite, d'endocardite et de péricardite, il est principalement associé à des cas de méningite et de pneumonie (Higgins et Gottschalk, 1989).

### 1.2.1 Signes respiratoires

Chez des porcs infectés par *S. suis*, on retrouve différents signes cliniques. Une étude menée par Reams et coll.(1994) met en évidence le fait que l'on retrouve associé à *S. suis*, entre autres, des signes respiratoires. On observe par exemple la toux chez 25,4% des porcs infectés par *S. suis* sérotype 2. La lésion microscopique pulmonaire la plus commune est la bronchopneumonie suppurative (62,0% chez les porcs affectés avec le sérotype 2). La deuxième lésion la plus commune est la pleurésie fibrineuse (22,4% chez les porcs affectés avec le sérotype 2).

### 1.2.2 Signes neurologiques

Des signes neurologiques sont aussi observés. Selon une étude menée par Reams et coll., (1994), 57,6% des porcs affectés avec le sérotype 2 démontrent des signes neurologiques. Avec entre autres la postration (15,4%), le pédalage (10,2%), l'ataxie (8,5%) et d'autres signes neurologiques (23,7%). Les lésions du cerveau les plus couramment observées sont la méningite suppurative (57,7% des porcs infectés par le sérotype 2) et/ou l'encéphalite suppurative (34,6% des porcs infectés par le sérotype 2).

Pendant une période de quatre ans, Sanford (1987) a diagnostiqué des méningo-encéphalites ou de méningo-encéphalomyélites subaiguës attribuables à *S. suis* chez 53 porcs. Les lésions macroscopiques les plus fréquentes du système nerveux central se traduisent par une hyperémie des vaisseaux des méninges et une légère augmentation du volume de liquide céphalo-rachidien. L'histopathologie révèle la présence de fibrine, d'oedème et de production d'un exsudat cellulaire mixte dans les méninges et les plexus choroïdes (Sanford, 1987).

Selon une étude menée par Williams et Blakemore (1990b), tous les porcs infectés par *S. suis* sérotype 2 présentent une infiltration inflammatoire fibrinopurulente généralisée diffuse s'étendant tout le long de l'axe neural. On retrouve dans tous les cas des lésions au niveau des pachyméninges et des leptoméninges. Selon la distribution des lésions, il semble que ni les nerfs olfactifs, ni les vaisseaux durs, ni les villosités arachnoïdales ne soient des sites d'entrée de la bactérie à l'intérieur du compartiment du liquide cérébrospinal (Williams et Blakemore, 1990b).

Une étude a comparé les lésions provoquées par *S. suis* selon le site d'inoculation: soit intraveineuse et intracisternale. On observe une similarité dans la distribution des lésions et ce, peu importe le site d'inoculation ou qu'il s'agisse d'une infection naturelle (Williams et Blakemore, 1990b). Cette similarité est le reflet d'événements qui surviennent après l'entrée des bactéries dans le compartiment du LCR. Williams et Blakemore (1990b) proposent ainsi que ces lésions sont la conséquence du flux du LCR. En général, un porc ayant des lésions de bronchopneumonie suppurative n'aura pas de lésion de méningoencéphalite. On voit en fait que la bronchopneumonie suppurative et la méningite suppurative sont inversement reliées (Reams et coll., 1994).



### 1.3 Facteurs de virulence

Plusieurs facteurs de virulence ont été proposés, principalement le matériel capsulaire, des protéines de la paroi bactérienne ou extracellulaires, des adhésines et une hémolysine.

#### 1.3.1 Protéines Muramidase-Released Protein (MRP) et Extracellular Factor (EF)

Chez des souches européennes de *S. suis* sérotype 2, Vecht et coll. (1991) ont identifié deux protéines présentes chez les souches isolées à partir de porcs malades. Une protéine, la protéine MRP (pour "Muramidase Released Protein") a un poids moléculaire de 136 kDa. Cette protéine est associée à la paroi mais on la retrouve aussi dans le surnageant. La seconde protéine, EF (pour "Extracellular Factor") a un poids moléculaire de 110 kDa et elle n'est détectée que dans le surnageant.

Basé sur la présence des protéines MRP et EF dans le surnageant des cultures, au départ, trois phénotypes des souches de *S. suis* sérotype 2 sont identifiés:  $MRP^+EF^+$ ,  $MRP^+EF^-$  et  $MRP^-EF^-$ . Des souches isolées de porcs malades, 80% ont le phénotype  $MRP^+EF^+$ . Chez les souches isolées d'amygdales de porcs sains, seulement 2% ont ce phénotype alors que 86% des souches ont le phénotype  $MRP^-EF^-$  (Vecht et coll., 1991). De nouveaux types de MRP et de EF sont subséquentement décrits. Un type de EF à plus haut poids moléculaire (EF\*) est retrouvé, celui-ci étant présent surtout chez des souches d'origine humaine et des souches non-virulentes d'origine porcine (Vecht et coll., 1991). Cette protéine a la particularité de posséder des répétitions d'acides aminés en position C-terminale, ce qui amène l'hypothèse qu'une recombinaison à ce niveau, en éliminant les répétitions, produirait des souches virulentes à profil  $EF^+$  (Smith et coll., 1993). Ils trouvent aussi une MRP présentant un plus haut poids moléculaire (MRP\*) et qui se retrouverait chez les souches isolées de pneumonie. Un nouveau profil  $MRP^-EF^+$  se voit chez quelques souches américaines de méningite (Galina et coll., 1996). De plus, une protéine MRPs, de plus faible poids moléculaire que la MRP

originale, est retrouvée chez 8% des souches canadiennes de sérotype 2 alors qu'elle n'avait été retrouvée jusqu'ici que chez les sérotypes 1 et 4 (Vecht et coll., 1996). Comme les protéines MRP et EF sont présentes de façon prédominante chez les souches virulentes, Vecht et coll.(1991) les considèrent comme étant des facteurs de virulence potentiels.

Une étude entreprise par Gottschalk et coll. (1998) s'est intéressée à la présence de ces facteurs de virulence potentiels chez les souches canadiennes. La plupart des isolats (72%) provenant de porcs malades sont MRP<sup>-</sup>EF<sup>-</sup> et seulement un isolat est MRP<sup>+</sup>EF<sup>+</sup>. Treize isolats (15%) s'avèrent MRP<sup>+</sup>EF<sup>-</sup> et seulement trois isolats présentent un profil MRP<sup>\*</sup>EF<sup>-</sup>. Tous les isolats provenant de porcs cliniquement sains présentent un phénotype MRP<sup>-</sup>EF<sup>-</sup>. Ainsi, la plupart des isolats canadiens de *S. suis* testés dans cette étude ne produisent pas les protéines décrites comme étant reliées à la virulence de *S. suis* sérotype 2.

L'absence d'implication de MRP et de EF dans la virulence a été confirmé récemment à l'aide de mutants isogéniques défectifs dans la production de ces deux protéines. Il est démontré que ces mutants sont toujours virulents chez le porc, suggérant qu'elles ne sont pas reliées à la virulence ou que d'autres facteurs compensent leur absence (Smith et coll., 1999).

### 1.3.2 Hémolysine

Plusieurs souches de *S. suis* possèdent une hémolysine. L'hémolysine du sérotype 2 a été purifiée et caractérisée (Jacobs et coll., 1994, Gottschalk et coll., 1995). Plusieurs souches de différents sérotypes (1, 1/2, 10, 14, 15, 18 et 19) sécrètent une activité hémolytique qui ne peut être distingué biochimiquement et immunologiquement de l'hémolysine des souches du sérotype 2 (Jacobs et coll., 1994). Cette hémolysine est une protéine extracellulaire appelée suilysine (Gottschalk et coll., 1995, Jacobs et coll., 1994). Elle appartient à une famille de toxines connues comme étant antigéniquement

reliées aux toxines cytolytiques liant le cholestérol. Cette famille de toxines a pour caractéristiques d'être sensible à des agents oxydants, activée par des agents réducteurs et inhibée par une faible concentration de cholestérol (Jacobs et coll., 1994; Gottschalk et coll., 1995). Le mécanisme d'action de cette toxine est de former des pores transmembranaires d'environ 7nm de diamètre sur la cellule touchée (Gottschalk et coll., 1995).

C'est avec la pneumolysine que la suilysine est la plus phylogénétiquement reliée et a le plus de séquences en acides aminées identiques. Elles comportent toutefois des différences majeures. La pneumolysine est une protéine intracellulaire alors que la suilysine est exportée à l'extérieur de la cellule. La pneumolysine est exprimée par virtuellement tous les isolats cliniques de *S. pneumoniae* alors que la suilysine est absente chez environ 37% des isolats de *S. suis* (Segers et coll., 1998).

La majorité des souches européennes de sérotype 2 et plusieurs souches européennes et américaines d'autres sérotypes produisent la suilysine (Feder et coll., 1994; Jacobs et coll., 1995). A cause de cette prévalence, Jacobs et coll., (1996) émettent l'hypothèse que l'hémolysine est un facteur de virulence et que sa neutralisation pourrait induire la protection chez les porcs. Pour ce faire, ils développent un vaccin contenant la suilysine purifiée et démontrent que ce vaccin protège les souris et les porcs contre une inoculation expérimentale à *S. suis* (Jacobs et coll., 1994; Jacobs et coll., 1996).

Bien qu'il existe des souches virulentes ne produisant pas l'hémolysine, jusqu'à ce jour, toutes les souches produisant l'hémolysine sont considérées comme virulentes (Charland et coll., 2000). La plupart des souches du sérotype 2 provenant de 4 pays d'Europe produisent l'hémolysine. Par contre, au Canada, la plupart des souches ne produisent pas l'hémolysine (Gottschalk et coll., 1995). Une étude ayant entre autres pour but d'étudier la présence de l'hémolysine chez les souches canadiennes indique qu'uniquement une souche sur les 98 testées produisait l'hémolysine (Gottschalk et

coll., 1998). En fait, il a été démontré que si en Europe 95% des souches possèdent le gène de l'hémolysine, en Amérique du Nord, il n'y a que 7% des souches qui le possèdent (Segers et coll., 1998).

### 1.3.3 Capsule

#### 1.3.3.1 Composition

La capsule polysaccharidique de *S. suis* sérotype 2 contient du rhamnose, du galactose, du glucose, du N-acétyl glucosamine et de l'acide sialique dans un ratio moléculaire de 1.07:3.17:1.00:0.94:1.00 (Elliott et Tai, 1978). Le comportement de la capsule sur colonne de Sepharose suggère un poids moléculaire d'au moins 100 000 (Elliott et Tai, 1978). La composition chimique de la capsule de *S. suis* sérotype 2 ressemble à la capsule des streptocoques du groupe B (GBS). Elle contient aussi de l'acide sialique (Elliott et Tai, 1978; Katsumi et coll., 1996).

La souche de référence S735 du sérotype 2 ne semble pas être recouverte d'une épaisse couche de matériel capsulaire. Un des buts d'une étude effectuée par Jacques et coll.(1990) est de déterminer l'épaisseur de la capsule par microscopie électronique à transmission où le matériel capsulaire est stabilisé à l'aide de différentes techniques. L'épaisseur observée pour la souche S735 du sérotype 2 n'est que de 70-100 nm ce qui n'est pas élevé comparativement à la souche 11538 du sérotype 5 qui varie entre 350 et 375 nm.

Quessy et coll. (1994), suite aux observations faites chez le rat, observent que seule la souche virulente peut augmenter l'épaisseur de sa capsule *in vivo*. Bien que l'épaisseur de la capsule de la souche virulente augmente après croissance *in vivo*, Charland et coll. (1996) observent aussi une augmentation de l'épaisseur de la capsule de la souche non-virulente lors de la croissance en chambres intrapéritonéales chez le

porc. Clifton-Hadley et coll. (1986) remarquent aussi que l'épaisseur de la capsule d'une souche n'est pas reliée à sa virulence.

Smith et coll. (1999) ont identifié et effectué une caractérisation moléculaire d'un fragment d'ADN de 16 kb contenant en majeure partie les déterminants génétiques impliqués dans la biosynthèse des polysaccharides de la capsule de *S. suis* sérotype 2.

L'acide sialique est un constituant de plusieurs bactéries extrêmement pathogènes causant la méningite dont les méningocoques des groupes B et C (Frosch et coll., 1989), les streptocoques du groupe B (Wessels et coll., 1987) et *E. coli* K1 (Kasper et coll., 1973). Chez certaines bactéries, dont GBS, l'acide sialique de la capsule joue un rôle anti-phagocytaire en inactivant la voie alternative du complément (Kazatchkine et coll., 1979). Il semblerait que la position de l'acide sialique, à l'intérieur des chaînes de polysaccharides répétitifs, est importante pour son implication dans la virulence (Edwards et coll., 1982). Une expérience menée par Shigeoka et coll. (1983) démontre que le fait d'enlever l'acide sialique de la capsule de GBS diminue la virulence de ces souches de façon significative.

Par contre, chez *S. suis* sérotype 2, l'acide sialique ne semble pas jouer un rôle antiphagocytaire important en présence de monocytes de porc (Charland et coll., 1996). En effet, on retrouve la même concentration d'acide sialique chez les souches virulentes et non virulentes. Lorsque l'on fait croître les souches *in vivo* chez le porc, la concentration d'acide sialique augmente autant chez les souches virulentes que non virulentes, et ceci dû à l'augmentation de l'épaisseur de la capsule. De plus, le fait de traiter les bactéries avec une sialidase ou bien avec une lectine reconnaissant l'acide sialique de *S. suis* n'a pas changé le degré de virulence lorsque inoculées à des souris. Seule la survie intracellulaire est quelque peu diminuée lorsque la bactérie possède une capsule sans acide sialique.

### 1.3.3.2 Rôle de la capsule dans la phagocytose et la virulence

Selon les études effectuées par Williams (1990) et Brazeau et coll. (1996), les bactéries capsulées sont phagocytées à moins de 10% par les macrophages murins en absence d'anticorps et/ou du complément, indépendamment de leur virulence. Williams (1990) observe que les isolats capsulés non-pathogènes sont tués alors que les organismes capsulés pathogènes survivent et se répliquent à l'intérieur des macrophages. Lorsque du sérum normal, inactivé ou non, est utilisé pour opsoniser, les souches virulentes et non-virulentes ne sont pas capables de survivre à l'intérieur des macrophages (Brazeau et coll., 1996). Ce résultat diffère de celui obtenu par Williams (1990), où seulement le sérum de lapin hyperimmunisé contre *S. suis* sérotype 2 (mais pas le sérum normal), augmente la mortalité des bactéries intracellulaires. Par contre, Busque et coll. (1998) ont plutôt observé un pourcentage de phagocytose de la souche capsulée et virulente S735 du sérotype 2 de 61% par des monocytes porcins et 82% par des monocytes humains.

En 1992, Gottschalk et coll. produisent un mutant non-capsulé M2 ainsi qu'un mutant capsulé M42 dont le matériel capsulaire est distribué à la surface de la cellule de façon irrégulière. C'est par passages successifs dans un milieu contenant des anticorps anti-capsule à partir de la souche 89-1591 qu'ils sont produits. Il manque cependant à ces mutants spontanés une protéine de 44 kDa présente chez la souche sauvage. Chez le modèle murin, les deux mutants sont non-virulents. La souche sauvage a une  $DL_{50}$  de  $3 \times 10^7$  CFU alors que les mutants n'ont pas réussi à tuer les souris et ce, même avec  $10^9$  CFU. Ils ont effectué un test de protection chez la souris à l'aide d'antisérums dirigés contre la souche sauvage ou les souches mutantes. Comme contrôle, ils ont injecté chez un groupe de souris un mélange du sérum normal et d'une culture de la souche sauvage. Aucune protection n'est alors obtenue. Lorsque le test est effectué avec l'antisérum dirigé contre la souche mère, 100% de protection est obtenu. Par contre, lorsque le test est effectué avec l'antisérum dirigé contre la souche M2 ou M42, seulement 10% et 60% respectivement de protection sont obtenus. Ainsi, il semble donc que des anticorps

dirigés contre le matériel capsulaire et contre la protéine de 44 kDa soient essentiels afin d'assurer une protection complète chez la souris.

Charland et coll. (1998) observent que deux mutants non-capsulés (2A et 79) obtenus en utilisant le transposon auto-conjugatif Tn916 sont 100 fois moins virulents pour la souris que la souche mère S735 sérotype 2. De plus, la souche sauvage peut être isolée à partir de plusieurs organes différents chez tous les porcs infectés ce qui démontre que les polysaccharides de la capsule peuvent aider la bactérie à se disséminer et à survivre plus facilement. En fait la souche sauvage est isolée à partir des amygdales chez tous les animaux, alors que les mutants 2A et 79 n'ont pas été retrouvés dans ce site. Ainsi, la présence des polysaccharides de la capsule contribue à la virulence de *S. suis* sérotype 2 à la fois chez la souris et le porc. Cette étude démontre aussi que le mutant 2A est éliminé très rapidement de la circulation comparativement à la souche mère. En effet, 18 heures après l'infection, aucun mutant n'est retrouvé dans le sang alors qu'on retrouve  $10^6$  CFU/mL de la souche mère. Ces résultats confirment ceux obtenus par Clifton-Hadley et Alexander (1981) (voir page 13, 1<sup>er</sup> paragraphe).

Segura et coll. (1998) sont les premiers à obtenir des résultats quantitatifs de phagocytose en utilisant une technique de compte-viable. La souche de référence S735 du sérotype 2 n'est pratiquement pas phagocytée par les macrophages murins, et ce, même après 90 min. d'incubation. Par contre, le mutant acapsulé 2A (Charland et coll., 1998) dérivé de la souche de référence et obtenu par mutagenèse à l'aide du transposon Tn916 est très phagocyté comparativement à la souche mère. La souche sauvage COH1 de GBS est légèrement moins phagocytée que le mutant acapsulé COH-13. Cette différence est beaucoup moins prononcée que celle observée entre la souche mère de *S. suis* et le mutant acapsulé. En ce qui a trait à la survie des bactéries une fois phagocytées, après 4 heures d'incubation, celle du mutant 2A acapsulé est de moins de 5%. Par contre, la survie intracellulaire des souches de GBS est significativement plus élevée que celle du mutant 2A de *S. suis*.

Une étude menée par Smith et coll. (1999) confirme que la capsule protège contre la phagocytose et qu'elle est un facteur de virulence important. Selon les conditions utilisées *in vitro*, la souche mère est résistante à la phagocytose. Par contre, après 90 min., plus de 99% des mutants non-capsulés sont ingérés par les macrophages alvéolaires porcins. De tous les mutants ingérés, 90 à 98% sont tués en 90 min. Les propriétés de virulence de la souche mère et des mutants non-capsulés ont été testées par infection expérimentale sur des porcelets nouveaux-nés libres de pathogènes. Tous les porcs inoculés avec la souche mère sont morts au cours de l'expérience, ou euthanasiés dû à la présence de sérieux signes cliniques. Par contre, les porcs inoculés avec les mutants acapsulés n'ont démontré aucun signe de maladie et ils ont tous survécu jusqu'à la fin des expériences. De plus, une différence significative de leur index de fièvre et de leucocytes est observable entre la souche mère et les mutants non-capsulés. La souche mère est isolée à partir du système nerveux central, des reins, du coeur, du foie, de la rate, des articulations et des amygdales. Les souches mutantes, par contre, ne sont retrouvées qu'à partir des amygdales. Ces résultats démontrent que les souches mutantes, puisqu'elles ne produisent pas de capsule, sont avirulentes.

#### 1.3.3.3 Rôle de la capsule dans l'adhérence

Pour plusieurs pathogènes tels *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus agalactiae*, *Klebsiella pneumoniae* et *Neisseria meningitidis*, la perte de la capsule pour une souche signifie une augmentation de l'adhérence et/ou l'invasion de cellules épithéliales et/ou endothéliales (St-Geme III et Falkow, 1991; Hulse et coll., 1993; Nizet et coll., 1997; Favre-Bonte et coll., 1999; Stephens et coll., 1993). Différentes études se sont intéressées au rôle de la capsule de *S. suis* lors de l'adhérence à des cellules.

Gottschalk et coll. (1991) observent une corrélation entre l'épaisseur de la capsule et la capacité d'adhérence à des coupes congelées de tissu pulmonaire de porc. L'épaisseur de la capsule des isolats adhérents est de 100 à 140 nm alors que celle des



isolats non-adhérents est de 80-100 nm. Toutefois, la présence de la capsule ne semble pas être essentielle car une souche non-capsulée présente au moins le même degré d'adhérence que la souche mère.

Salasia et coll. (1995) ont étudié l'adhérence de *S. suis* avec différents types de cellules: soit avec des cellules épithéliales buccales humaines, avec des macrophages alvéolaires de lapin et avec la lignée cellulaire humaine HeLa. La souche 89-1591 du sérotype 2 ainsi que deux mutants acapsulés produits en cultivant la bactérie en présence d'antisérum anti-capsulaire sérotype 2 (Gottschalk et coll., 1992) sont utilisés. On observe que plus le degré d'hydrophobicité augmente, plus le nombre de bactéries adhérentes aux cellules épithéliales buccales humaines ainsi qu'aux macrophages alvéolaires de lapin augmente. Ainsi, la souche 89-1591 qui a le moins de surface hydrophobe exposée (6) est celle qui adhère le moins alors que le mutant M2 qui a le plus de surface hydrophobe exposée (96) est celui qui adhère le plus. Il semble donc que le matériel capsulaire masque des structures de surface hydrophobes, elles-mêmes impliquées dans l'adhérence. Toutefois, aucune des trois souches ne semble adhérer à la lignée cellulaire HeLa.

#### 1.3.4 Adhésines

##### 1.3.4.1 Hemagglutinines

Kurl et coll. (1989) sont les premiers à décrire des hémagglutinations spécifiques à certains sucres chez *S. suis*. Trois types de spécificité sont retrouvés avec des globules rouges de sang humain de groupe B. Certaines souches de différents sérotypes, dont quelques-unes de sérotype 2, possèdent des adhésines sensibles à la trypsine reconnaissant du galactose et/ou du N-acétylgalactosamine. Certaines souches non-typables possèdent une adhésine sensible à la trypsine reconnaissant plutôt l'acide sialique.

Gottschalk et coll. (1990) confirment les hémagglutinations en plus de démontrer ces interactions avec des globules rouges de différentes espèces. Ces réactions, indépendantes d'interactions hydrophobes, sont variables selon le sérotype et à l'intérieur d'un même sérotype. Par exemple, certaines souches de sérotype 2 réagissent avec des cellules de cheval alors que d'autres sont limitées aux cellules de sang humain de groupe B et O. Cependant, aucune corrélation ne peut être établie entre l'hémagglutination, les tissus d'où les souches ont été isolées ou la virulence.

Liukkonen et coll. (1992) ont caractérisé l'une des adhésines reconnaissant l'acide sialique. Lorsque les érythrocytes sont traités à la trypsine ou à la pronase, on observe une augmentation de l'hémagglutination. Suite à un test de résialysation des érythrocytes traités auparavant avec la sialidase, les résultats suggèrent que les souches de *S. suis* se lient à la portion NeuNAc $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc des molécules situées sur la membrane des érythrocytes. Sur la base de tests d'inhibition à l'aide d'oligosaccharides, la structure la mieux reconnue des souches de *S. suis* est un glycan contenant la séquence NeuNAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Glc (NAc).

Haataja et coll. (1993) ont aussi caractérisé l'une des adhésines, nommée adhésine P, d'une souche du sérotype 2 liant le galactose et le N-acétylgalactosamine. Ils se sont intéressés à caractériser la spécificité du carbohydate situé sur le galactose où se lie *S. suis*. C'est le trisaccharide Gal $\alpha$ 1-4Gal qui est le meilleur inhibiteur parmi tous les oligosaccharides testés. Des différentes néoglycoprotéines testées, seulement le Gal $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc-O-CETE-BSA est capable d'inhiber l'hémagglutination. La souche se lie fortement au glycolipide trihexosylcéramide (GbO<sub>3</sub>). De plus, c'est avec les érythrocytes de lapin, qui contiennent en majorité le GbO<sub>3</sub>, que *S. suis* agglutine le plus fortement. Une souche hémagglutinante adhère à des coupes congelées de pharynx de porc alors qu'une souche non-hémagglutinante ne démontre qu'une faible adhérence. De plus, les souches mises en présence du GbO<sub>3</sub>, glycolipide présent chez le groupe P et exprimé dans plusieurs tissus porcins, n'adhèrent

plus à des coupes congelées de pharynx de porc. Le GbO<sub>3</sub> contient une séquence qui est reconnue par l'adhésine et qui inhibe l'adhérence des souches aux tissus.

C'est en 1994 que Haataja et coll. démontrent qu'il existe en fait deux sous-groupes de souches pouvant être inhibées par le galactose. L'hémagglutination de certaines souches est inhibée par le galactose et le N-acétylgalactosamine (type P<sub>N</sub>) alors que d'autres ne sont inhibées que par le galactose (type P<sub>O</sub>). Cette étude vise à déterminer si les deux types d'adhésines interagissent de la même façon avec le récepteur. Ainsi, c'est le même trisaccharide qui est le meilleur inhibiteur pour les deux types d'adhésines. L'inhibition de l'hémagglutination a été comparée entre les deux types d'adhésines et il n'y a pas de différences significatives. Les deux types de souches adhèrent plus fortement aux érythrocytes de lapin. Toutefois, les souches de type P<sub>O</sub> sont Gal $\alpha$ 1-6Glc, ce qui indique qu'il est possible qu'elles dépendent davantage de la liaison avec le galactose en position terminale que les souches du type P<sub>N</sub>. Sur la base des résultats de leur étude, le schéma des liaisons hydrogènes entre le récepteur disaccharidique et les 2 types d'adhésines peut être déduit. Ainsi, l'adhésine des deux types de souches forme des ponts hydrogènes avec les positions HO-2, HO-3, HO-4' et HO-6' de la portion Gal $\alpha$ 1-4Gal du récepteur. Chez les souches du type P<sub>O</sub>, sont aussi présents des ponts hydrogènes aux positions HO-6 et HO-3'.

Cette adhésine a été identifiée chez plusieurs sérotypes (surtout ceux impliqués dans les infections) et souches non-typables de *S. suis* (Tikkanen et coll., 1996). Sa présence semble être variable, ce qui peut suggérer une variation de phase dans l'expression de l'adhésine. Cette expression serait inversement proportionnelle à la quantité de capsule présente à la surface bactérienne.

L'adhésine est identifiée, purifiée et caractérisée en 1995 par Tikkanen et coll. L'adhésine est une protéine de 18 kDa. Elle ne possède pas de ponts disulfures car la motilité n'est pas changée lors de l'utilisation d'agents réducteurs. Cela est confirmé par des analyses d'acides aminés qui révèlent l'absence de résidus cystéines. Les

séquences N-terminales des adhésines de 4 autres souches de *S. suis*, deux du type P<sub>N</sub> et deux du type P<sub>O</sub> sont identiques à celle de l'adhésine purifiée. L'adhésine contient une proportion relativement élevée d'acides aminés hydrophobes.

#### 1.3.4.2 Protéine liant l'albumine

Lors de tests de croissance bactérienne *in vivo* dans des chambres intrapéritonéales chez le rat, Quessy et coll. (1994) retrouvent une protéine de plasma de 67 kDa liée aux bactéries. Cette protéine a récemment été identifiée comme étant de l'albumine (Quessy et coll., 1997). Grâce à cette propriété de liaison, ces mêmes auteurs ont mis en évidence chez *S. suis* une protéine de 39 kDa liant l'albumine (Quessy et coll., 1997). Cette protéine est présente chez toutes les souches virulentes et non-virulentes de sérotype 2 testées. Elle possède une homologie avec l'enzyme glyceraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase des streptocoques du groupe A, qui est aussi impliquée dans diverses liaisons avec des protéines de l'hôte (ex.: fibronectine) (Pancholi et Fischetti, 1992). L'addition d'albumine au milieu de croissance augmente la virulence des souches chez la souris. Il semble que le matériel capsulaire soit impliqué dans l'activité liante puisqu'une souche non-virulente possédant davantage de matériel capsulaire a un pourcentage d'adhérence plus élevé. Cependant, son rôle dans la virulence est incertain puisque la protéine est aussi présente chez les souches non-virulentes (Quessy et coll., 1997).

#### 1.3.5 Autres facteurs

##### 1.3.5.1 Protéines liant les IgG

Différentes études rapportent l'existence d'une protéine de 60 kDa liant les IgG présente chez plusieurs sérotypes et possédant aussi l'unique caractéristique de lier les IgY de poulet (Serhir et coll., 1993; Serhir et coll., 1995; Benkirane et coll., 1998). Il semble que les IgG de porc et les IgY de poulet se lient à des régions différentes de la

protéine alors que les IgG des autres espèces animales semblent posséder des sites de liaison communs (Benkirane et coll., 1998). Par microscopie électronique, il est possible de voir que cette protéine forme de longs filaments de 4 nm de diamètre ce qui suggère son arrangement comme un long polymère constitué de plusieurs sous-unités (Benkirane et coll., 1998).

#### 1.3.5.2 Protéine de stress

Benkirane et coll. (1997) ont récemment démontré que cette protéine liant les IgG est aussi une protéine de stress. Les protéines de stress appartiennent à une famille de protéines essentielles et sont synthétisées par une variété de microorganismes. Elles sont responsables de fonctions physiologiques essentielles. Lors d'un stress cellulaire, elles vont jouer le rôle de chaperonines et permettre un transport et une translocation des protéines efficaces en plus de les protéger contre la dénaturation. Ces protéines sont exprimées de façon constitutive et leur synthèse est régulée positivement suite à plusieurs formes de stress. Après une croissance de 2 heures d'une souche de *S. suis* à 42°C comparativement à une culture incubée à 37°C, il y a une augmentation de l'expression de la protéine de 60 kDa.

#### 1.3.5.3 Fimbriae

En 1990, Jacques et coll. révèlent, par coloration négative en microscopie électronique, la présence de fimbriae répartis sur toute la surface de la bactérie. Ces fimbriae pérित्रiches sont flexibles, d'environ 2 nm de diamètre et de 250 nm de longueur. Actuellement, leur rôle n'est pas connu et leur implication dans la virulence n'est toujours pas démontrée.

#### 1.4 Pathogénie de l'infection

Une infection causée par *S. suis* sérotype 2 se traduit généralement par une méningite. À ce jour, il existe peu d'informations quant à la pathogénie de l'infection causée par *S. suis* sérotype 2. Afin d'élucider cette question, plusieurs hypothèses furent émises. Il est généralement accepté que *S. suis* sérotype 2 se transmet par voie aérienne et loge au niveau des voies respiratoires (Clifton-Hadley et coll., 1980; Clifton-Hadley et coll., 1986; Robertson et coll., 1991). La maladie invasive survient suite à l'entrée de l'organisme dans la circulation via les amygdales. Une phase importante précédant la méningite est bactériémie.

Les mécanismes d'entrée de la bactérie à l'intérieur du compartiment du liquide céphalorachidien (LCR) ne sont pas établis de façon concluante (William et Blakemore, 1990a). Il a été proposé que l'organisme en circulation envahit le compartiment du LCR associé aux monocytes qui migrent via les plexus choroïdiens. Ils entreraient ainsi par un mécanisme de "Cheval de Troie" (Walsh et coll, 1992; Williams et Blakemore, 1990a).

La nature des interactions entre les isolats de *S. suis* sérotype 2 pathogéniques et non-pathogéniques avec les macrophages diffèrent *in vitro* et *in vivo* (Williams et coll., 1988; Williams, 1990). Avec le temps, le nombre d'isolats phagocytés augmente pour les isolats pathogéniques alors qu'il reste stable pour les isolats non-pathogéniques (Williams, 1990). Il semble, selon les observations, que le site d'entrée de *S. suis* sérotype 2 à l'intérieur du compartiment du LCR lors de méningite généralisée soient les plexus choroïdiens (William et Blakemore, 1990a). Toutefois, suite à une étude ayant pour but de déterminer le site d'entrée de la bactérie dans le LCR, Williams et Blakemore (1990b) arrivent à la conclusion que la distribution des lésions lors de cas cliniques de méningite aiguë généralisée est en grande partie le reflet d'une accumulation passive des cellules inflammatoires suite à l'écoulement du LCR. En fait,

il n'existe aucune relation entre la distribution des lésions et le site d'entrée de l'organisme dans le compartiment du LCR.

Williams et Blakemore (1990a) soulignent que l'on doit considérer aussi bien les bactéries intracellulaires que les organismes circulant librement lorsqu'il s'agit de bactériémie et de méningite. Comme il a été mentionné précédemment, le pourcentage de phagocytose de *S. suis* n'est pas élevé. Il ne faut donc pas écarter la possibilité que la bactérie circule et entre librement à l'intérieur du compartiment du LCR.

#### 1.4.1 Voies possibles d'entrée dans la circulation sanguine

Au moins trois voies possibles ont été proposées (Alexander, 1995). Premièrement, *S. suis* serait phagocyté par les macrophages présents dans les amygdales et serait ainsi transporté jusque dans le sang (Williams, 1989). Deuxièmement, suite à l'entrée de la bactérie par une abrasion au niveau de la peau, la bactérie poursuit sa route directement dans la circulation (Swe, 1976). Finalement, la troisième voie serait celle des alvéoles pulmonaires.

Bien qu'aucune preuve n'existe à ce jour, différentes études suggèrent que des bactéries pathogènes, qui se retrouvent au niveau des voies respiratoires inférieures ou supérieures, traversent les cellules épithéliales des poumons et/ou des vaisseaux lymphatiques ou sanguins des amygdales en les envahissant. C'est possiblement le cas des GBS, de *N. meningitidis*, de *H. influenzae* et de *S. pneumoniae* (Rubens et coll., 1992; Pujol et coll., 1997; St-Geme III et Falkow, 1990; Cundell et Tuomanen, 1994).

#### 1.4.2 Voies possibles d'entrée dans le système nerveux central

En 1995, il y avait trois hypothèses qui visaient à répondre à cette question (Alexander, 1995). Premièrement, celle de Clifton-Hadley (1982) qui suggère que *S. suis* entre dans le nasopharynx et continue sa progression via le nerf olfactif jusque dans l'espace sub-arachnoïdien (ESA) pour ainsi causer initialement une infection locale et

qui peut, dans certains cas, se transformer en méningite. Ensuite selon l'hypothèse de Kay (1985), l'entrée de *S. suis* dans le cerveau s'effectue via l'oreille interne et la trompe d'Eustache. Les expériences réalisées afin de prouver ces théories ont toujours échoué puisque l'infection de l'oreille interne est secondaire à l'infection du liquide cébrospinal et non le contraire (Kay, 1985). Une autre hypothèse est que *S. suis* serait transportée du sang au système nerveux central à l'intérieur des monocytes (Williams et Blakemore, 1990 a, b, c). Cependant, cette théorie est mise en doute suite aux résultats de phagocytose mentionnés dans la section 1.3.3.2. Finalement, la bactérie pourrait voyager librement dans la circulation et traverser la barrière hémato-méningée (BMH).

Une fois les bactéries arrivées dans les vaisseaux des méninges, elles doivent traverser la BHM pour se rendre dans l'ESA. Il existerait deux voies possibles par lesquelles la bactérie pourrait traverser la BHM. Elle pénétrer les microvaisseaux cérébraux, ou elle peut pénétrer via les cellules épithéliales du plexus choroïdien (Tuomanen, 1996).

#### 1.4.2.1 Microvaisseaux cérébraux

La bactérie peut se rendre dans l'encéphale. Pour ce faire, elle doit traverser les microvaisseaux cérébraux tapissés par des cellules endothéliales. Au niveau de l'encéphale, ce sont les cellules endothéliales des microvaisseaux qui forment la BHM. Afin d'empêcher les échanges entre les cellules, on observe la présence de jonctions serrées. Parce qu'elles sont très imperméables, il n'y a que par diffusion facilitée qu'il est possible de les traverser.

Afin de déterminer le ou les moyens utilisés par différents pathogènes pour causer la méningite suite à certaines interactions avec les microvaisseaux cérébraux, un modèle était nécessaire. C'est ainsi qu'une lignée de cellules endothéliales provenant des microvaisseaux cérébraux (BMEC) humains a été développée, immortalisée par transformation avec le virus simian 40 et propagée en monocouche de culture cellulaire



(Stins et coll, 1997; Stins et coll., 1994). *S. pneumoniae*, *E. coli* K1 et GBS sont reconnus comme étant capables d'adhérer et d'envahir la lignée BMEC humaine (Ring et coll, 1998; Prasadarao et coll, 1996; Nizet et coll., 1997).

Charland et coll. (2000) ont étudié les interactions entre *S. suis* et la lignée BMEC humaine. Ils observent que *S. suis* sérotype 2 est capable d'adhérer à la lignée BMEC mais est incapable de l'envahir (Charland et coll., 2000).

#### 1.4.2.2 Les plexus choroïdiens

La bactérie peut se rendre dans les plexus choroïdiens qui sont constitués de collections de capillaires entrelacés entourés de cellules épithéliales ciliées, produisant le liquide céphalo-rachidien et étant en continuité avec les méninges (Tuomanen, 1996). Les capillaires sont poreux et formés de cellules endothéliales perméables. La bactérie peut donc très facilement traverser ces capillaires. Elle se retrouve alors face aux cellules épithéliales. Au niveau des plexus choroïdiens, ce sont les cellules épithéliales qui forment la BHM. Elles sont très imperméables. Afin d'empêcher les échanges entre les cellules, on observe la présence de jonctions serrées. Si la bactérie réussit à passer à travers cette barrière, elle se retrouve alors dans le liquide céphalo-rachidien (LCR).

Malgré que l'entrée puisse être possible via l'endothélium de la BHM, puisque le fluide extracellulaire du cerveau est en continuité avec le LCR, le manque de lésions diffuses précoces du parenchyme au moment d'une maladie aiguë ne suggère pas cette route.

Il existe deux routes plus directes pour pénétrer l'espace du LCR: la pénétration des vaisseaux cérébraux plus larges et l'attaque de l'épithélium des plexus choroïdiens.

Plusieurs évidences favorisent l'entrée via les plexus choroïdiens. Lors de méningites expérimentales, on observe une relation au niveau de la densité bactérienne du LCR entre les ventricules et l'espace lombaire et ce, même à faible densité. Puisque la direction du LCR est unidirectionnelle à partir des ventricules vers la région lombaire, la présence des bactéries dans le liquide ventriculaire suggère l'entrée à ce niveau, c'est-à-dire les plexus choroïdiens. De plus, ceci est supporté par la présence fréquente de plexite lors des méningites précoces (Tuomanen, 1996). Parmi les pathogènes où un ciblage direct des plexus choroïdiens a été démontré, on retrouve le virus Sendai, le virus de la chorioméningite lymphocytaire et les trypanosomes (Levine, 1987).

Il existe plusieurs façons différentes par lesquelles une bactérie peut passer à travers une cellule qui compose la BHM. Un pathogène peut utiliser un moyen qui lui est propre afin d'envahir la cellule et se retrouver à l'intérieur d'une vésicule. Cette vésicule peut ou non permettre au pathogène d'entrer dans le cytoplasme. C'est le cas pour *Listeria monocytogenes* et *Haemophilus influenzae* (Tuomanen, 1996). Les vésicules pinocytiques sont rarement retrouvées dans les cellules normales de la BMH. Augmenter le transport vésiculaire peut faciliter l'entrée dans le SNC. C'est, entre autres, le cas des bactériémies d'intensité faible et peut-être de *Neisseria meningitidis* (Tuomanen, 1996). Certains pathogènes vont cibler des récepteurs spécifiques situés sur les cellules ce qui initie la transmigration. C'est notamment le cas de *S. pneumoniae* (Tuomanen, 1996). Une bactérie peut aussi passer entre les cellules par une destruction directe des jonctions serrées. C'est ainsi que *H. influenzae* transmigre (Tuomanen, 1996).

Une bactérie peut aussi affecter indirectement la fonction des cellules endothéliales, gliales ou de la membrane basale (Tuomanen, 1996).

Elle peut aussi traverser la barrière avec ou à l'intérieur des leucocytes (Tuomanen, 1996). Cette hypothèse a été suggérée pour *S. suis* alors que les bactéries

entrent dans l'ESA à l'intérieur des monocytes (Williams et Blakemore, 1990a). Cette hypothèse est peu probable car comme il a été mentionné précédemment, *S. suis* n'est que faiblement phagocytée (Brazeau et coll., 1996; Smith et coll., 1999). Et pour les quelques bactéries phagocytées, la survie à l'intérieur des monocytes est très faible (Segura et coll., 1998; Smith et coll., 1999).

De nouvelles connaissances des composants connus des jonctions serrées indiquent que, de façon fonctionnelle et chimique, la BHM des cellules endothéliales est très similaire à celle de l'épithélium polarisé (Tuomanen, 1996).

Une identification des composantes des jonctions serrées indique que la BHM, au niveau endothélial et épithélial est structurellement et fonctionnellement analogue à un épithélium transporteur. Cela suggère donc que les mécanismes par lesquels la bactérie interagit avec l'épithélium polarisé peuvent être pertinents lors de l'étude d'invasion du SNC (Tuomanen, 1996).

### 1.5 Interactions entre *S. suis* et des cellules de l'hôte.

À part les études de phagocytose (section 1.3.3.2), très peu d'études se sont intéressées à étudier les interactions entre *S. suis* et des cellules de l'hôte. Tout d'abord, Gottschalk et coll. (1991) ont étudié le degré d'adhérence de *S. suis* sérotype 2 à des sections congelées de poumons porcins. Trente-trois isolats ont été testés: vingt de ces isolats provenaient d'animaux malades (méningite ou pneumonie) alors que treize isolats provenaient de cavités nasales de porcs cliniquement sains. Tous les isolats provenant d'animaux malades adhèrent significativement aux sections congelées de poumons porcins. Seulement 4 isolats provenant des animaux cliniquement sains démontrent une faible adhérence.

Norton et coll. (1999) ont récemment publié une étude portant sur l'habileté de *S. suis* à envahir et lyser la lignée de cellules épithéliales Hep-2. Afin d'observer l'invasion, ils ont utilisé une technique d'immunofluorescence et ont confirmé leurs résultats par microscopie électronique à transmission et à balayage. Ils observent que *S. suis* est capable d'envahir la lignée Hep-2. En fait, les bactéries virulentes envahissent en plus grande quantité que les bactéries moins virulentes. Ils observent aussi que les souches virulentes sont cytotoxiques à concentration élevée alors que les souches moins virulentes ne sont pas cytotoxiques. C'est la suilysine qui est principalement responsable de la lyse des cellules épithéliales. De plus, la suilysine pourrait aussi être impliquée lors de l'initiation de l'invasion.

## **2 Rôle de l'adhérence avec des cellules épithéliales chez d'autres agents bactériens de pneumonie et méningite**

L'adhérence est un élément écologique important pour la colonisation de sites spécifiques chez les plantes et les animaux ainsi qu'un événement important de la pathogénèse d'une infection bactérienne chez les animaux et les humains (Beachey, 1981). Elle permet entre autres de faciliter la colonisation. Des études suggèrent fortement qu'une bactérie doit être capable de s'attacher aux cellules afin que la bactérie soit infectieuse. Entre autres, pour *E. coli*, la bactérie doit être capable de s'attacher aux cellules épithéliales intestinales afin de produire les toxines provoquant des diarrhées (Beachey, 1981). Un des buts lors de l'étude des mécanismes d'adhérence des bactéries est de développer éventuellement des mesures prévenant l'adhésion de bactéries. Cela serait possible en développant un vaccin qui est constitué de l'adhésine purifiée elle-même (Beachey, 1981). Puisque l'adhérence aux cellules hôtes est une étape aussi importante de la pathogénie de l'infection d'un microorganisme, il n'est pas surprenant que plusieurs études sur l'interaction entre un pathogène et des cellules de l'hôte aient été menées jusqu'à présent.

### 2.1.1 *Neisseria meningitidis*

Aussi appelé méningocoque (MC), *N. meningitidis* est un pathogène extracellulaire responsable de méningites et septicémies. Il colonise le nasopharynx et se disperse de personne à personne. Pour atteindre les méninges à partir du pharynx, MC doit interagir avec deux barrières cellulaires, une dans le nasopharynx et l'autre dans le cerveau.

Tout d'abord, traverser le nasopharynx. Certaines études démontrent que les fimbriae servent d'intermédiaires à l'adhérence entre les bactéries et les cellules épithéliales du nasopharynx (Tunkel et Sheld, 1993; Pujol et coll., 1997). Suite à l'attachement au récepteur de surface spécifique retrouvé sur la cellule, la bactérie est transportée à l'intérieur d'une vacuole phagocytique par delà la barrière de cellules épithéliales du nasopharynx noncilié (Stephens et coll., 1983).

Ensuite, se rendre au SNC. Les cellules épithéliales et endothéliales de la BMH partagent plusieurs caractéristiques fonctionnelles et chimiques avec l'épithélium polarisé (Pujol et coll., 1997). Pujoll et coll. (1997) ont utilisé cette caractéristique afin d'étudier le moyen utilisé par MC pour traverser les cellules de la BMH à l'aide d'une lignée de cellules épithéliales polarisées. Ils observent tout d'abord une adhérence localisée, qui implique les fimbriae, entraînant la formation de petites colonies à la surface de la membrane apicale. À la suite de cette étape, la bactérie adhère de façon intime et ferme. Les composantes bactériennes impliquées dans cet attachement intime n'ont pas encore été identifiées. La réduction du nombre de fimbriae sur les bactéries suggère que ces derniers ne sont pas responsables de cet attachement intime. Cet attachement intime génère une modification du cytosquelette qui survient avant que la bactérie ne traverse la monocouche. Cela suggère donc que ces modifications sont importantes afin de permettre cette dernière étape. Puisqu'il n'y a pas d'altération au niveau des jonctions serrées et que l'on peut voir la bactérie à l'intérieur des cellules par

examen confocale et microscopie électronique, on peut conclure que MC traverse la monocouche de cellules par voie transcellulaire.

## 2.2 *Haemophilus influenzae*

*H. influenzae* est un organisme commensal retrouvé fréquemment dans les voies respiratoires humaines. De plus, cette bactérie est responsable de maladies localisées au niveau des voies respiratoires ainsi que d'infections systémiques. Les souches non-capsulées non-typables sont responsables de la majorité des maladies localisées, notamment les otites, les sinusites, les bronchites et les conjonctivites. Par contre, les souches du sérotype b sont responsables de plus de 95% des maladies invasives et des méningites causées par *H. influenzae*, bien qu'elles ne constituent que moins de 5% des isolats du nasopharynx (St-Geme et Falkow, 1990; Tunkel et Scheld, 1993).

L'hypothèse la plus répandue concernant la pathogénie de l'infection causée par *H. influenzae* est qu'elle débute par la colonisation de l'épithélium du nasopharynx. Elle est suivie par la dispersion à l'intérieur des voies respiratoires où alors par l'invasion de la circulation sanguine (St-Geme et Falkow, 1990).

Bien qu'au départ une corrélation a été notée entre la présence de fimbriae et le degré d'adhérence à des cellules oropharyngiennes et des érythrocytes humains, suggérant que les fimbriae avaient un rôle comme adhésine, d'autres études sont venues infirmer cette observation. Entre autres, St-Geme et Falkow (1990) observent que l'adhérence survient indépendamment de la présence de fimbriae. Cette étude avait aussi pour but d'obtenir des informations additionnelles concernant les mécanismes d'attachement de la bactérie dans le nasopharynx. Pour ce faire, ils ont examiné les interactions entre un isolat clinique et une lignée de culture cellulaire dérivée d'un épithélium conjonctif humain normal. Ainsi, *H. influenzae* adhère aux cellules épithéliales. Cette adhérence augmente avec le temps, ce qui suggère des interactions dynamiques entre la bactérie et la monocouche de cellules. La fixation des cellules

(pendant 2 heures) avec de la glutaraldéhyde abolit l'adhérence, ce qui implique qu'il est important que les cellules soient vivantes et/ou que le récepteur soit lié à la glutaraldéhyde. Lorsque les bactéries sont mortes, on observe un pourcentage d'adhérence de 2% alors qu'on observe 7% d'adhérence lorsque les bactéries sont vivantes. Lors d'une incubation à 4°C (où les bactéries sont métaboliquement inactives), on observe moins de 2% d'adhérence. Puisque l'addition de tétracycline à une concentration bactériostatique à la monocouche juste avant l'inoculation avec la bactérie vivante induit une inhibition de l'adhérence (2% d'adhérence), cela indique le besoin de synthèse de protéines suivant l'exposition initiale à la monocouche de cellules. Cela suggère que l'adhésine pourrait être induite durant l'incubation.

*H. influenzae* est capable d'envahir la monocouche de cellules épithéliales et le nombre de bactéries à l'intérieur des cellules augmente avec le temps. Comme la plupart des bactéries invasives, *H. influenzae* pénètre les cellules épithéliales par un procédé dépendant des microfilaments. En effet, l'incubation en présence de cytochalasine D, un inhibiteur de la formation des microfilaments, inhibe l'invasion.

### 2.3 *Streptococcus pneumoniae*

Le pathogène à Gram positif *S. pneumoniae* est un responsable majeur de pneumonies, d'otites, de septicémies et de méningites. Il est le responsable le plus fréquent de pneumonies bactériennes chez les enfants dans les pays en voie de développement et de plus de 76% des cas chez les adultes (Cundell et Tuomanen, 1994). Le site initial de colonisation est le nasopharynx (Adamou et coll., 1998).

Chez les modèles expérimentaux, la propagation de la pneumonie résulte de la dispersion du pneumocoque du nasopharynx vers les voies respiratoires inférieures par l'entremise de l'air (Cundell et Tuomanen, 1994). Dans certains cas, le pneumocoque peut pénétrer l'épithélium de la muqueuse du nasopharynx ou des poumons et entrer

dans la circulation sanguine pour causer la septicémie et la méningite (Adamou et coll., 1998).

*S. pneumoniae* adhère spécifiquement à différents types de lignées cellulaires. Il est capable d'adhérer à des cellules épithéliales de nasopharynx humain, des cellules épithéliales alvéolaires de type II, des cellules endothéliales vasculaires humaines ainsi qu'à une lignée de cellules épithéliales transformées de bronche humaine (Adamou et coll., 1998). L'adhérence est dépendante de la dose et du temps, en plus d'être saturable (Adamou et coll., 1998; Cundell et Tuomanen, 1994).

*S. pneumoniae* possède une toxine, la pneumolysine, sensible à l'oxygène et intracellulaire. En effet, la cytolysine de 53 kDa est relâchée suivant l'autolyse de la bactérie. Elle semble être un facteur de virulence majeur. La pneumolysine détruit les cellules endothéliales des artères pulmonaires et pourrait être un responsable important dans la pathogénie de l'hémorragie alvéolaire lors de la phase précoce de la pneumonie pneumococcale (Rubins et coll., 1993). Rubins et coll. (1993) ont étudié l'effet de la pneumolysine sur des cellules épithéliales d'alvéoles pulmonaires. Les études biochimiques et immunologiques identifient la pneumolysine comme une cytotoxine majeure pour les cultures de cellules épithéliales d'alvéoles pulmonaires. En plus d'être directement cytotoxique, la pneumolysine peut endommager davantage le tissu pulmonaire par son habileté à induire une inflammation. De plus, en détruisant l'épithélium et l'endothélium alvéolaire, la pneumolysine peut jouer un rôle central en facilitant la pénétration de l'organisme à l'intérieur de la circulation sanguine (Rubins et coll., 1993).

Andersson et coll. (1988) se sont intéressés à identifier et caractériser l'adhésine de *S. pneumoniae*. L'adhérence est diminuée suite à un prétraitement des bactéries avec de la trypsine, de la pepsine ou du périodate, ou bien lorsqu'elles sont traitées à la chaleur. Cela suggère que l'adhésine est une protéine ou qu'elle est une molécule fortement associée à une composante ayant une surface protéinique sensibles à ces



traitements. La composante de la bactérie qui se lie à la cellule est retrouvée dans l'extrait de parois cellulaires car cette dernière, à une concentration de 0,1 mg/mL, inhibe l'adhérence de 37%.

Barthelson et coll. (1998) se sont intéressés à définir davantage le rôle des carbohydrates comme récepteurs pour l'adhérence de *S. pneumoniae* au niveau des voies respiratoires. Ils arrivent ainsi à observer que pour l'adhérence aux cellules épithéliales, *S. pneumoniae* dépend de ligands oligosaccharidiques ayant comme séquence terminale NeuAc alpha 2-3 (ou 6) Gal beta 1. Ils confirment aussi que *S. pneumoniae* adhère spécifiquement aux chaînes oligosaccharidiques des "nedacto" et "globo series" des glycosphingolipides.

#### 2.4 *Streptococcus* du groupe B (GBS)

GBS est un pathogène humain qui cause la pneumonie, la septicémie et la méningite chez les nouveaux-nés. La pneumonie se développe suite à l'aspiration du liquide amniotique dans l'utérus lors de l'accouchement (Rubens et coll., 1992). Les poumons sont une porte d'entrée probable pour GBS dans la circulation sanguine (Nizet et coll., 1996).

Dans le processus d'invasion, l'adhérence est une étape essentielle. GBS adhère à plusieurs lignées cellulaires épithéliales humaines (Tamura et coll., 1994). Il est aussi capable d'envahir des cellules épithéliales *in vitro* (Rubens et coll., 1992). La pénétration de GBS à l'intérieur de la cellule dépend des microfilaments. L'utilisation de cytochalasine B et D, qui inhibent l'aggrégation des filaments d'actine, inhibe significativement l'entrée de GBS à l'intérieur des monocouches de cellules (Rubens et coll., 1992). Une synthèse active de protéines, d'ARN et d'ADN est aussi requise. GBS ne se réplique pas à l'intérieur des cellules épithéliales et reste à l'intérieur des vacuoles.

La plupart des isolats cliniques produisent une beta-hémolysine lorsqu’incubés sur gélose au sang de mouton (Nizet et coll., 1996). Nizet et coll. (1996) ont voulu savoir si l’expression de cette beta-hémolysine contribue directement à l’endommagement de cellules épithéliales de poumons humains. L’utilisation de mutants isogéniques qui ne produisent pas l’hémolysine démontre que l’activité beta-hémolytique est directement reliée à l’endommagement de cellules épithéliales de poumon *in vitro*. Les mutants non-hémolytiques n’endommagent pas les cellules. Cela suggère donc que la beta-hémolysine joue un rôle dans la pathogénie de la maladie chez l’humain. Un endommagement direct de la membrane cellulaire de l’hôte peut contribuer à de sévères pneumonies caractéristiques des infections précoces à GBS. L’endommagement de la barrière de cellules épithéliales peut aussi faciliter l’accès dans la circulation sanguine et la dispersion systémique par la bactérie (Nizet et coll., 1996).

### III- MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

Article

Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and  
different epithelial cell lines

Accepté par *Microbiology*

## Revised manuscript # 24045

# Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines

Mélanie Lalonde, Mariela Segura, Sonia Lacouture and Marcelo Gottschalk<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, CP 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6

Running title: Interactions between *S. suis* and epithelial cells

Keywords: *Streptococcus suis*, epithelial cells, adhesion, cytotoxicity, haemolysin (suilysin)

Pathogenicity and Medical Microbiology

Author for correspondence: Marcelo Gottschalk. Tel: +1 450 773 8521 ext. 8374. Fax: +1 450 778 8108. XXXXXXXXXX

**Abbreviations:** GBS, group B *Streptococcus*; CPS, polysaccharidic capsule; GbO<sub>3</sub>, trihexosylceramide; BBB, blood brain barrier; CNS, central nervous system; THB, Todd-Hewitt broth; MEM, Minimal Essential Medium; LDH, lactate dehydrogenase; SEM, scanning electron microscopy; TEM, transmission electron microscopy.

## ABSTRACT

*Streptococcus suis* is an important swine pathogen responsible for cases of sudden death, septicaemia, meningitis, endocarditis and pneumonia. In addition, it is recognised as a zoonotic agent in people occupationally exposed to pigs or pig products. Knowledge on virulence factors of *S. suis* serotype 2 is limited and the pathogenesis of the infection is poorly understood. It has been suggested that the disease due to *S. suis* serotype 2 begins with colonisation of the nasopharyngeal epithelium, followed by either spread within the respiratory tract or invasion of the bloodstream. The mechanisms involved in the access of bacteria from the bloodstream to the central nervous system are unknown. It is possible that epithelial cells of the choroid plexus also play an important role in the pathogenesis of the meningitis. Different interactions (adhesion, invasion and toxic effects) of *S. suis* serotype 2 with epithelial cell lines were studied and compared to those of a human pathogen which also causes meningitis, group B *Streptococcus* (GBS). The following cell lines were used: LLC-PK1, PK(15), A549, HeLa and MDCK. Results showed that *S. suis* serotype 2, in contrast to GBS, is able to adhere but not to invade epithelial cells. The involved adhesin(s) seem(s) to be partially masked by the capsule and are a part of the cell wall. The haemolysin produced by *S. suis* serotype 2 is responsible for a toxic effect observed on epithelial cells. The results described herein give additional evidence that pathogenesis of the infection differs between *S. suis* and GBS. In particular, it is possible that suilysin-positive *S. suis* strains use adherence and cell injury, as opposed to direct cellular invasion, as part of a complicated multistep process which leads to bacteremia and meningitis in pigs.

## INTRODUCTION

*Streptococcus suis* is an important swine pathogen responsible for cases of sudden death, septicaemia, meningitis, endocarditis and pneumonia (Higgins & Gottschalk, 1999). Of the 35 serotypes of *S. suis*, serotype 2 is the most prevalent in diseased animals (Higgins & Gottschalk, 1999). This serotype is also recognised as a zoonotic agent since it has been identified as a cause of septicaemia, endocarditis and meningitis in humans, particularly those occupationally exposed to pigs or pig products (Trottier *et al.*, 1991; Arends & Zanen, 1988).

Knowledge on virulence factors of *S. suis* serotype 2 is limited. Several virulence factor candidates have been proposed, such as the polysaccharidic capsule (CPS), which confers resistance to phagocytosis (Charland *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1999), virulence-related proteins (Vecht *et al.*, 1991) and a haemolysin (named suilysin) belonging to the family of antigenically related cholesterol-binding cytolytic toxins (Gottschalk *et al.*, 1995; Jacobs *et al.*, 1994). Despite the fact that the CPS is an important virulence factor, non-virulent strains are also well encapsulated. Unlike European strains, most virulent North American strains do not produce all virulence-related proteins (Chatellier *et al.*, 1999; Gottschalk *et al.*, 1998; Segers *et al.*, 1998). An adhesin, named P adhesin, has also been described. This adhesin recognises the disaccharide galactosyl- $\alpha$ 1-4-galactose present in the glycolipid trihexosylceramide (GbO<sub>3</sub>) that belongs to the P blood group antigen system (Haataja *et al.*, 1993). However, its role as a virulence factor has not yet been confirmed.

The pathogenesis of the meningitis caused by *S. suis* serotype 2 is also unclear and is possibly the result of a multistep process. It is believed that disease due to this microorganism begins with the colonisation of the nasopharyngeal tissue, followed by spread within the respiratory tract and invasion of the bloodstream. Mechanisms used by *S. suis* type 2 to gain access to the bloodstream are not known. It is possible that *S. suis* interacts with respiratory epithelial cells to enter into the bloodstream to cause overwhelming sepsis. Although the presence of the capsule would prevent phagocytosis (Charland *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1999), the mechanisms which enable *S. suis* to disseminate in the body and more particularly in the central nervous system (CNS) are not well understood. At one point, free bacteria would have to pass by or through the cells which form the blood brain barrier (BBB). The BBB, which is formed by the arachnoid membrane, the brain microvascular endothelial cells and the choroid plexus, maintains the homeostasis within the CNS. It has already been suggested that bacteria may enter the CNS through the choroid plexus, which has an exceptionally high rate of blood flow that may imply a higher bacterial influx (per unit of time) to this site than to other anatomic locations in the CNS (Tunkel & Scheld, 1993). The principal characteristic of the epithelial cells of the choroid plexus is the presence of tight junctions that regulates fluid, macromolecule and cell trafficking on both sides of the layer (Betz & Goldstein, 1986; Tuomanen, 1996).

In order to obtain additional information on the pathogenesis of the infection caused by *S. suis* type 2, different interactions between this microorganism and epithelial cells



were studied. More specifically, the objective of this study was to evaluate the ability of *S. suis* serotype 2 to adhere to, invade and damage different epithelial cell lines.

## METHODS

**Bacterial strains and growth conditions.** The European suilysin-positive virulent strains S735 (reference strain ATCC 43765) and 31533 (kindly supplied by Dr. M. Kobisch, from AFSSA Ploufragan, France) as well as the North American suilysin-negative virulent strain AAH4 (kindly provided by Dr. Brad Fenwick, Kansas State University) were used. The isogenic unencapsulated mutant 2A, derived from strain S735 by Tn916 transposition, was also studied (Charland *et al.*, 1998). The Group B *Streptococcus* (GBS) type III strain COH1 (kindly provided by Dr. C. Rubens, from the Children's Hospital and Medical Center, Seattle), was used as a positive control. Bacteria were grown on blood agar plates and isolated colonies were used as inocula in Todd-Hewitt broth (THB; Difco) for growth to mid-log phase (OD<sub>600</sub> of 0.4 equivalent to  $\sim 10^8$  c.f.u. ml<sup>-1</sup>). An accurate determination of the c.f.u. ml<sup>-1</sup> in the final suspension was carried out by plating on THB-agar.

**Cell cultures.** Different epithelial cell lines were used, all obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). The A549 (LLC-185) line was derived from a human lung carcinoma. The HeLa (CCL-2) line was derived from a human cervix carcinoma. The MDCK (CCL-34.1) cell line was derived from the kidney of a normal adult dog and forms polar monolayers. The PK(15) (CCL-33) derived from the original PK-2a, that it was initiated from the kidney of an adult pig. Finally, the LLC-PK1 (CL-101) line was derived from the kidney of a normal juvenile pig. The A549 cell line was propagated in F-12K medium (Gibco) whereas all other cell lines were propagated in Minimal Essential Medium (MEM; Gibco). The different media were supplemented

with 10 % heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Gibco), L-glutamine and penicillin-streptomycin (Gibco), as recommended by the ATCC. Cells were incubated at 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> in a humid atmosphere, at a 1:8 dilution passage and grown for 2 to 3 days. The cell lines were used before passage 35 for all experiments. For adherence, invasion and cytotoxic assays, cells were transferred after trypsination to 24-well tissue culture plates (Falcon) and incubated to confluence (~10<sup>5</sup> cells per well). Before the experiment, cells were washed twice in HBSS buffer (Gibco). Then, 0.4 ml of medium without antibiotics was added.

**Epithelial cell invasion assay.** The assay was performed as previously described (Rubens *et al.*, 1992) with some modifications. Briefly, log-phase bacteria were pelleted, washed once with PBS (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3) and resuspended in fresh cell culture medium without antibiotics. Bacterial suspensions diluted in cell culture medium (0.1 ml, inocula between 10<sup>2</sup> and 10<sup>7</sup>) were added to wells containing a monolayer (~10<sup>5</sup> cells) of epithelial cells in 0.4 ml of medium (m.o.i of 100 to 0.001 bacteria/cell). The plates were centrifuged at 800 *g* for 10 min to bring bacteria at the surface of the monolayer. The plates were incubated for 2 h at 37 °C with 5 % CO<sub>2</sub>, to allow cellular invasion by the bacteria. The monolayers were then washed three times with PBS, 1 ml of cell culture medium containing 100 µg gentamicin and 5 µg penicillin G ml<sup>-1</sup> was added to each well, and the plates incubated for 2 h at 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> to kill extracellular and surface-adherent bacteria. The monolayers were washed three times with PBS, and cells were disrupted by the addition of 0.5 ml of sterile deionized water and repeated pipetting to liberate

intracellular bacteria. A hundred  $\mu\text{l}$  from each well was plated onto THB-agar and incubated overnight at 37 °C. The rate of invasion was expressed as the total number of c.f.u. recovered per well. Assays were performed in duplicate and repeated at least three times.

**Epithelial cell adherence assays.** Total cell-associated (invading plus surface-adherent) bacteria was quantified as for the cellular invasion assay but without antibiotic treatment. After different incubation times (see results), cells were washed five times with PBS, lysed as described above and quantified by quantitative plating. Bacterial adherence was determined by subtracting invading bacteria from total cell-associated bacteria. All assays were performed in duplicate and repeated at least three times. In experiments testing inhibition of adherence, epithelial cells were pre-incubated with 100  $\mu\text{g}$  purified *S. suis* cell wall  $\text{ml}^{-1}$  for 60 min at 37 °C or bacteria were pre-incubated with 1  $\mu\text{g}$  Gal $\alpha$ 1-4Gal  $\beta$  1-4Glc  $\beta$ -O-CETE-BSA  $\text{ml}^{-1}$  (Cedarlane) (Haataja *et al.*, 1993) for 10 min at 4 °C before the test. Implication of proteins as adhesins was studied treating bacteria for 1 h at 37 °C with 1 mg trypsin  $\text{ml}^{-1}$  (Sigma) or 1 mg proteinase K  $\text{ml}^{-1}$  (Boehringer-Mannheim).

**Purification of *S. suis* cell wall.** *S. suis* cell wall was purified as previously described (Segura *et al.*, 1999a). Briefly, the unencapsulated strain 2A was grown in 1 L of THB for 12 h at 37 °C with agitation to a cell concentration of  $\sim 2 \times 10^8$  c.f.u.  $\text{ml}^{-1}$ . Bacteria were harvested by centrifugation (12000 g, 15 min, 4 °C), washed and resuspended in 2 % (w/v) boiling SDS. The denatured cells were then disintegrated by ultrasound

treatment (Sonics & Materials-Danbury) for 5 x 8 min. The suspension was centrifuged (3000 *g*, 30 min) to remove unbroken cells, and the supernatant was centrifuged at 30000 *g* for 30 min at room temperature (RT) to sediment out the cell wall material. The pellet was resuspended in distilled water and subjected to a second ultrasound cycle (5 x 8 min) to assure complete cell disruption. This crude cell wall material was washed six times by centrifugation (30000 *g*, 30 min, RT) in distilled water and subsequently treated at 37 °C with pancreatic 50 µg DNase I ml<sup>-1</sup> plus 100 µg Rnase ml<sup>-1</sup> (Sigma) for 2 h, followed by 100 µg trypsin ml<sup>-1</sup> (Gibco) for 12 h. Cell wall was sedimented by centrifugation and resuspended in 2 % (w/v) SDS at 100 °C in a water bath for 30 min. Detergent was removed by 10 cycles of washing and the purified cell wall was lyophilized, weighted and stored in the dry state at RT.

**Epithelial cell cytotoxic assay.** To determine cell cytotoxicity of *S. suis*, the lactate dehydrogenase (LDH) microtiter plate assay was performed as previously described (Nizet *et al.*, 1997), with some modifications. Briefly, 10<sup>8</sup> c.f.u. of log-phase bacteria were centrifuged, washed in PBS and concentrated in 1 ml of MEM without serum. Twofold serial dilutions in MEM were carried out and 100 µl of the different bacterial dilutions were added to wells of a 24-well tissue culture plate containing a LLC-PK1 monolayer. Non-infected cells and bacteria in MEM without a LLC-PK1 monolayer were used as negative controls, whereas cells lysed with 500 µl of sterile deionized water were used as a positive control. Plates were incubated at 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> for 4 h in most experiments (unless otherwise specified). At the end of the incubation period, a 75-µl aliquot of each supernatant was transferred to a 96-well plate which was

centrifuged at 3000 *g* for 30 min to pellet bacteria. LDH measurement was performed on 50- $\mu$ l aliquots of each centrifuged supernatant using a miniaturised version of the LDH colorimetric assay (Sigma) as already described (Nizet *et al.*, 1996). The percentage of cytotoxicity was calculated as  $[(OD_{\text{bacteria}} - OD_{0\%}) / (OD_{100\%} - OD_{0\%})] \times 100$ , where  $OD_{0\%}$  represents  $OD_{414}$  (UVmax; Molecular Devices) for non-infected cells and  $OD_{100\%}$  represents  $OD_{414}$  for lysed cells. To determine if cytolytic components were secreted extracellularly, growth supernatants of late log-phase bacteria were recovered by centrifugation at 3000 *g* for 10 min, filtrated on 0.22- $\mu$ m filters and then added to LLC-PK1 monolayers as described above. The assay was also performed with purified suilysin at a concentration of 10  $\mu$ g  $\text{ml}^{-1}$  (Charland *et al.*, 2000). All the assays were performed in duplicate and repeated at least three times.

**Inhibition of cytolytic activity.** Heat-killed bacteria were used to verify if live bacteria were needed to obtain cytotoxicity. Log-phase bacteria ( $10^9$  c.f.u.  $\text{ml}^{-1}$ ) were killed in a 60 °C waterbath for 45 min (Segura *et al.*, 1999a) and then added to LLC-PK1 monolayers for LDH measurement as described above. Inhibition of suilysin-related cytotoxicity was performed by incubating log-phase bacteria or purified suilysin (10  $\mu$ g  $\text{ml}^{-1}$ ) in 400  $\mu$ g ethanol-soluble cholesterol  $\text{ml}^{-1}$  (Sigma) for 1 h at 37 °C before adding them to LLC-PK1 monolayers (Charland *et al.*, 2000). Non-infected cells with cholesterol in culture medium were used as a negative control. Inhibition assays were always compared in parallel with non-treated bacteria or suilysin.

**Suilysin purification.** Suilysin was purified from 16 h-growth supernatants of the highly haemolytic strain 31533. Supernatants were subjected to SDS-PAGE. A 52 kDa band representing the suilysin (Gottschalk *et al.*, 1995) was cut, emulsified with Freund's complete adjuvant and injected intramuscularly to a New Zealand rabbit. The injection was repeated twice with Freund's incomplete adjuvant. The rabbit was bled 2 weeks after the last inoculation and the IgG were purified with a protein-A affinity column. The activity and specificity of the anti-haemoysin IgG were confirmed by inhibition of the haemolytic activity and immunoblotting with supernatant of a haemolysin-positive strain (results not-shown). An affinity column was constructed with the monospecific antibodies using the Pierce CarboLink™ Coupling Gel (Pierce) and the haemolysin purified from culture supernatant of strain 31533 grown as above. Haemolysin and monospecific antibodies concentrations were determined by the method of Markwell *et al.* (1978). The identity and purity of the suilysin preparation was verified by immunoblotting, with a monoclonal antibody directed against the suilysin (kindly provided by T. Jacobs, INTERVET, The Netherlands), and by silver staining, respectively. The titre of the purified suilysin was verified by lysis of horse red blood cells as described previously (Gottschalk *et al.*, 1995).

**Electron microscopy studies.** LLC-PK1 cells were used for electron microscopy studies. For transmission electron microscopy (TEM), LLC-PK1 monolayers ( $\sim 10^5$  cells) in 24-well tissue culture plates were infected with  $10^8$  c.f.u./well of log-phase *S. suis* suspension in culture medium. Plates were then centrifuged at 800 g for 10 min to place bacteria at the surface of the cells and then incubated at 37 °C with 5 % CO<sub>2</sub>, for 1

h, 2 h, and 4 h. The supernatants were removed by gentle aspiration, the cells were washed once with PBS, the monolayers fixed for 1 h at RT with 2 % (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer pH 7.2 and then postfixed in 2 % (v/v) osmium tetroxide in deionized water. Samples were dehydrated in a graded series of ethanol washes and embedded in firm Spurr resin. Thin sections were cut with a diamond knife on a LKB nova ultramicrotome (LEICA) and poststained with uranyl acetate and lead citrate. Samples were examined with a 420 model electron microscope (Philips Electronics). For scanning electron microscopy (SEM), samples were treated as for the transmission electron microscopy but, after the ethanol washes, the preparations were then coated with gold palladium after critical point drying and observed using a Hitachi S-3000N.

**Statistics.** All data are expressed as means  $\pm$  standard deviations (error bars). Data were analysed by two-tailed, unpaired *t* test. A *P* value of  $<0.05$  was considered significant and a *P* value of  $<0.01$  was considered highly significant.



## RESULTS

### ***Streptococcus suis* does not invade epithelial cells**

As shown in Fig. 1, *S. suis* did not have the capacity to invade the epithelial cells tested. Before using the standard conditions for comparative assays ( $10^5$  c.f.u./well, 2 h-invasion time), many different variables were tested in order to find combinations that promote *S. suis* invasion. Different invasion times (e.g. 1 h, 2 h, and 3 h), inocula (e.g.  $10^2$  to  $10^7$  c.f.u./well), logarithmic or stationary phase of bacterial growth, and serum concentrations (e.g. 5 % and 10 %) were tested, but none induced *S. suis* invasion of epithelial cells (data not shown). In contrast, GBS strain COH1 was able to invade the human epithelial cell lines A549 and HeLa, with a significant lower invasion of animal origin cell lines ( $P < 0.01$ , Fig. 1). Since it has been reported that an unencapsulated strain of GBS invades epithelial cells at higher degree than the encapsulated parent strain (Hulse *et al.*, 1993), the unencapsulated *S. suis* mutant 2A was also tested for its ability to invade epithelial cells. Unlike GBS, the unencapsulated strain 2A did not show enhanced invasion. Indeed, no significant differences were observed with respect to the parent strain ( $P > 0.05$ , Fig. 1). It must be noted that the quantity of bacteria used for invasion or adherence assays was not toxic to the epithelial cell lines (see below). Finally, no intracellular bacteria were observed by TEM.

### ***Streptococcus suis* adheres to epithelial cells**

In general, *S. suis* was able to adhere to epithelial cells (Fig. 2a). No significant differences were observed among the different strains ( $P > 0.05$ ) and *S. suis* presented, in general, lower levels of adherence than those observed with GBS (Fig. 2a).

Adherence levels were similar for log- and stationary-phase bacteria (data not shown). In order to examine the role of CPS on adherence, the adhesion levels of the unencapsulated mutant 2A with the encapsulated parent strain S735 were compared. Increased adhesion levels were observed with the unencapsulated mutant with respect to those obtained with the parent strain and that, for all cell lines tested ( $P < 0.01$ , Fig. 2a). Adhesion of *S. suis* to epithelial cells was confirmed by TEM and SEM, as observed in Fig. 2(b) and 2(c), respectively.

The cell line LLC-PK1 and the strain S735 were chosen for further studying *S. suis* adhesion to epithelial cells. Fig. 3(a) and 3(b) show that *S. suis* adhered to epithelial cells in a time- and dose-dependant fashion. Using a concentration of  $10^5$  c.f.u./well, maximal adhesion was obtained at 120 min ( $P < 0.01$ , Fig. 3a). Longer periods of incubation did not significantly increase the adhesion of *S. suis* to cells (data not shown). Maximum adhesion was observed at a concentration of  $10^8$  c.f.u./well (Fig. 3b). Adhesion did not increase for the non-haemolytic strains using higher bacterial concentrations (data not shown). Higher bacterial concentrations of the haemolytic strains could not be used due to toxic effects (see below).

In order to obtain preliminary information about the interaction between *S. suis* and the epithelial cells, the inhibitory effect of protease bacterial treatment was evaluated. In addition, a possible competition effect of a BSA-neoglycoconjugate (Gal $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ -O-CETE-BSA), a receptor already described for a *S. suis* adhesin, (Haataja *et al.*, 1993) as well as that of purified *S. suis* cell wall was studied. Trypsin or proteinase K

treatment, as well as the addition of the BSA-neoglycoconjugate did not significantly affect *S. suis* adhesion to epithelial cells (data not shown). On the other hand, 100 µg purified cell wall ml<sup>-1</sup> was able to inhibit 93 % (+/- 3 %) of the adherence of *S. suis* to the epithelial cell line LLC-PK1.

### ***Streptococcus suis* strains can damage epithelial cells**

LDH release measurements were performed to determine if *S. suis* could be cytotoxic to epithelial cells. The cell line LLC-PK1 was used as a model. Fig. 4 shows that *S. suis* AAH4 strain did not injure LLC-PK1, while S735 and 31533 strains were highly cytotoxic. Cytotoxicity was directly proportional to bacterial concentration, with maximum cytotoxic effect at  $1 \times 10^8$  c.f.u./well ( $P < 0.01$ , Fig. 4). *S. suis* cytotoxicity was higher than that observed for GBS. In fact, approximately 50 % of cytotoxicity was observed for strains S735 and 31533 whereas 10 % of cytotoxicity was obtained for GBS at a bacterial concentration of  $5 \times 10^7$  c.f.u./well ( $P < 0.01$ ). Kinetic studies showed that cytotoxicity of strains increased over time and always remained higher than the non-toxic strain ( $P < 0.01$ ). Maximal cytotoxicity was observed at 4 h and did not significantly increase at 18 h (Fig. 5). Interestingly, the two highly cytotoxic strains produce the suilysin (Gottschalk *et al.*, 1995; Charland *et al.*, 2000). TEM were used to confirm the toxicity of S735 suilysin-positive strain to LLC-PK1 cells. Fig. 6(a) shows normal cell characteristics, which are kept after strain AAH4 infection ( $10^8$  c.f.u./well) of cells for 2 h (Fig. 6b). The nucleus was intact and a dense regular cytoplasmic contents were observed. On the other hand, cells incubated with S735 strain presented

cellular injury demonstrated by loss of cytoplasmic density, disappearance of the nucleus and discontinuity of cytoplasmic membranes (Fig. 6c).

### **Suilysin-associated injury to LLC-PK1 cells**

It is known that suilysin is secreted *in vitro* in growth supernatants (Gottschalk *et al.*, 1995). Addition of the growth supernatant of the suilysin-producing strains S735 and 31533 to LLC-PK1 monolayers induced cell injury, whereas that of the suilysin-negative strain AAH4 did not affect the cells (Fig. 7). Different experiments were performed to determine the involvement of the suilysin in cell injury. First, to determine if cytotoxicity required live bacteria, strains 31533 and S735 were killed by heat treatment (60 °C, 45 min) and the suspension added to a LLC-PK1 monolayer for 4 h. Results showed that only live bacteria could induce LLC-PK1 injury (Fig 7). This is in agreement with the fact that the suilysin was shown to be not cell-bound (Gottschalk *et al.*, 1995). Since washed bacteria were always used in the present study, only live bacteria were able to grow, to produce the suilysin and to be toxic to cells. Since it has been demonstrated that cholesterol is able to inhibit suilysin activity and toxicity (Gottschalk *et al.*, 1995; Charland *et al.*, 2000), live bacteria were mixed with cholesterol for 1 h and then added to LLC-PK1 monolayers. Figure 7 shows that cholesterol significantly inhibited cytolytic activity of suilysin-producing strains ( $P < 0.01$ ). Furthermore, when purified suilysin ( $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) was added to LLC-PK1 monolayers, cytotoxicity was similar to that observed with live bacteria ( $P > 0.05$ ). Suilysin cytotoxicity was also inhibited by cholesterol treatment ( $P < 0.01$ , Fig 7).

## DISCUSSION

*Streptococcus suis* is an important pathogen that causes significant economic losses to the swine industry. In addition, these bacteria represent a health risk for human beings working in close contact with swine or swine-derived products. It is thus important to understand the pathogenesis of *S. suis* infection in order to develop strategies for prevention or therapy.

As for other microbial pathogens, the process of *S. suis* infection is complex and multifactorial. Bacterial attachment to epithelial cells, colonisation of mucosal surfaces as well as interactions with respiratory epithelial cells are prerequisites for the induction of some streptococcal infections. Interactions between epithelial cells and streptococci have already been described (Tamura *et al.*, 1994; LaPenta *et al.*, 1994). In addition, the lack of diffuse parenchymal lesions in most *S. suis* cases of meningitis may indicate an epithelial choroid plexus route of access to the CNS. In fact, lesions have been observed at the choroid plexus in natural or experimentally induced cases of *S. suis* meningitis (Williams & Blakemore, 1990).

*S. suis* did not invade epithelial cells under the conditions tested in this study. The unencapsulated mutant 2A did not show any difference of invasion when compared to the parent encapsulated strain. Many different variables were tested in order to find combinations that could favour invasion by *S. suis*; however, none of them were shown to induce invasion, even with epithelial cells of swine origin. These results disagree

with a recent report published by Norton *et al.* (1999). In that study, it was shown that some *S. suis* strains were able, not only to adhere, but also to invade (as a rare event) Hep-2 cells, as shown by differential fluorescence. These authors mentioned that attempts to measure invasion by killing extracellular bacteria gave inconsistent results. Differences in the techniques and cell lines used may explain these discrepancies. On the other hand, our study confirmed that GBS was able to invade epithelial cells of human origin, as previously described (Rubens *et al.*, 1992). Results of this study suggest that interactions between *S. suis* and epithelial cells follow a pattern which is different for both pathogens, as already showed with phagocytic cells (Segura *et al.*, 1998) and endothelial cells (Charland *et al.*, 2000).

This study has shown that *S. suis* is able to adhere to different epithelial cells in a time- and dose-dependant fashion. In addition, levels of adherence were, in general, similar in human- and animal-derived cells. GBS adhered to most cell lines in higher numbers than *S. suis*. As reported earlier (Tamura *et al.*, 1994), a lower adherence of GBS to MDCK cells was observed. Unlike *Streptococcus* group A (LaPenta *et al.*, 1994) and similarly to GBS (Tamura *et al.*, 1994), adherence levels were similar for log- and stationary-phase bacteria.

Despite the fact that the CPS does not seem to prevent adherence, a significantly higher rate of adherence was observed in the absence of the CPS for all cell lines tested. Similarly, Salasia *et al.* (1995) showed an increased adherence rate of spontaneous unencapsulated mutants of *S. suis* serotype 2 to HeLa cell and rabbit lung macrophages.

It has already been shown that an unencapsulated *Streptococcus pneumoniae* strain adhered to a much greater extent to epithelial cells than the encapsulated parental strain (Adamou *et al.*, 1998). The influence of the CPS in epithelial adhesion of GBS is, on the other hand, more controversial (Wibawan *et al.*, 1992; Tamura *et al.*, 1994). St. Geme & Cutter (1996) suggested that encapsulation may be modulated depending on the infectious stage. Encapsulation may be down-regulated especially during colonisation of epithelial cells (lungs, nasopharynx) and, once in the bloodstream, up-regulation of capsule production protects bacteria against the immune system, but it does not completely prevent adhesion to other cells (Charland *et al.*, 2000). To date, however, there is no direct evidence of such encapsulation modulation for *S. suis*.

It has been reported that the *S. suis* CPS may prevent the interaction of the Gal $\alpha$ 1-4 Gal-binding P adhesin with erythrocytes and thus inhibit hemagglutination (Tikkanen *et al.*, 1996). The hemagglutination activity is also inhibited by protease treatments (Kurl *et al.*, 1989). After purification, Tikkanen *et al.* (1996) confirmed the protein nature of the adhesin. Because the erythrocyte receptor (GbO<sub>3</sub>) is also found on epithelial tissues, it was decided, in this study to verify if this receptor was implicated in the observed *S. suis* adhesion to epithelial cells. No significant adhesion inhibition was obtained when a Gal $\alpha$ 1-4 Gal $\beta$ 1-4 Glc $\beta$ -O-CETE-BSA, was used. Furthermore, protease treatment of bacteria had no effect on adhesion to epithelial cells. Thus, the interactions between *S. suis* type 2 and epithelial cell lines observed in this study seem to be different, at least in part, to those described in the hemagglutination tests (Haataja *et al.*, 1993; Tikkanen *et al.*, 1996). In addition, a high inhibition effect of the adhesion to epithelial cells using

*S. suis* purified cell wall was observed in this study. Cell wall components of Group A streptococci, GBS and *S. pneumoniae* have already been described as being responsible for adhesion to host cells (Beachey, 1981; Nealon & Mattingly, 1985; Andersson *et al.*, 1988). The possible role of the lipoteichoic acid and/or the peptidoglycan in *S. suis* adhesion to epithelial cells remains to be confirmed.

It may be hypothesised that, after adherence of *S. suis* to epithelial cells, bacteria can secrete toxic factors which would lead to cell lysis, which could favour the disruption of the epithelial cell barrier and might facilitate access to the bloodstream and systemic spread by the organism (Nizet *et al.*, 1996; Nizet *et al.*, 1997). In addition, the cell toxicity may increase BBB permeability, which could lead to the development of cerebral oedema, increased intracranial pressure and cerebral blood flow blockage characteristic of bacterial meningitis (Tauber, 1989). In the case of *S. suis*, the suilysin seems to be responsible for epithelial cell damage *in vitro*. Indeed, many lines of evidence implicate suilysin as the bacterial component responsible for cell cytotoxicity. Only suilysin-producing strains were toxic for the epithelial cells. In addition, the cytotoxic component was present in culture supernatants and toxicity increased by increasing time and bacterial concentrations, which correlates with the suilysin multi-hit activity way of action (Gottschalk *et al.*, 1995). Finally, cholesterol inhibited the toxic effect of suilysin-positive strains as well as that obtained with purified suilysin (Gottschalk *et al.*, 1995; Jacobs *et al.*, 1994). The suilysin has already been shown to be toxic for endothelial cells (Charland *et al.*, 2000), phagocytic cells (Segura & Gottschalk, 1999b) and the Hep-2 epithelial cell line (Norton *et al.*, 1999). It is known



that GBS beta-haemolysin causes injury of lung epithelial cells and brain endothelial cells *in vitro* (Nizet *et al.*, 1996; Nizet *et al.*, 1997). It should be noted that at a similar bacterial concentration, *S. suis* is much more toxic to LLC-PK1 than GBS. Pneumolysin, a member of the same family toxins as suilysin, is also known to damage epithelial cells (Rubins *et al.*, 1992). In this study, virulent non-haemolytic strains did not induce cytotoxicity. Since North American and European isolates are phenotypically and genetically distinct (Gottschalk *et al.*, 1998; Chatellier *et al.*, 1999), different virulence factors are probably involved in the pathogenesis of the infection caused by both groups of strains.

The results described herein give additional evidence that pathogenesis of the infection differs between *S. suis* and GBS (Segura *et al.*, 1998; Charland *et al.*, 2000). In particular, it is possible that suilysin-positive *S. suis* strains use adherence and cell injury, as opposed to direct cellular invasion, as part of a complicated multistep process which leads to bacteremia and meningitis in pigs.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We would like to thank D. Montpetit from Centre de Recherche et Développement sur les Aliments (CRDA) for the transmission and scanning electron micrographs. We also thank R. Higgins for critical review of the manuscript. This work was supported by Grant OGP0154280 from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to M. G.

**REFERENCES**

- Adamou, J. E., Wizemann, T. M., Barren, P. & Langermann, S. (1998).** Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Infect Immunol* **66**, 820-822.
- Andersson, B., Beachey, E. H., Tomasz, A., Tuomanen, E. & Svanborg-Edén, C. (1988).** A sandwich adhesin on *Streptococcus pneumoniae* attaching to human oropharyngeal epithelial cells *in vitro*. *Microbial Patho* **4**, 267-278.
- Arends, J. P. & Zanen, H. C. (1988).** Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *J Infect Dis* **10**, 131-137.
- Beachey, E. H. (1981).** Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J Infect Dis* **143**, 325-345.
- Betz, A. L. & Goldstein, G. W. (1986).** Specialized properties and solute transport in brain capillaries. *Ann Rev Physiol* **48**, 241-250.
- Charland, N., Harel, J., Kobisch, M., Lacasse, S. & Gottschalk, M. (1998).** *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology* **144**, 325-332.

**Charland, N., Nizet, V., Rubens, C., Kim K., Lacouture, S. & Gottschalk, M. (2000).** *Streptococcus suis* serotype 2 interactions with human brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun* **68**, 637-643.

**Chatellier, S., Gottschalk, M., Higgins, R., Brousseau, R. & Harel, J. (1999).** Relatedness of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from different geographic origins as evaluated by molecular fingerprinting and phenotyping. *J Clin Microbiol* **37**, 362-366.

**Clerc, P., Baudry, B. & Sansonetti, P. J. (1988).** Molecular mechanisms of entry, intracellular multiplication and killing of host cells by shigellae. *Curr Top Microbiol Immunol* **138**, 3-13.

**Gottschalk, M., Lacouture, S. & Dubreuil, J. D. (1995).** Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin. *Microbiology* **141**, 189-195.

**Gottschalk, M., Lebrun, A., Wisselink, H., Dubreuil, J. D., Smith, H. & Vecht, U. (1998).** Production of virulence-related proteins by Canadian strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. *Can J Vet Res* **62**, 75-79.

**Haataja, S., Tikkanen, K., Liukkonen, J., François-Gérard, C. & Finne, J. (1993).** Characterization of a novel bacterial adhesion specificity of *Streptococcus suis* recognizing blood group P receptor. *J Biol Chem* **268**, 4311-4317.

**Higgins, R. & Gottschalk, M. (1999).** Streptococcal diseases. In *Diseases of swine*, 8th edn., pp. 563-570. Edited by A. D. Leman, B. E. Straw, W. L. Mengeling, S. D'Allaire, & D. J. Taylor. Ames, Iowa: Iowa State University Press.

**Hulse, M. L., Smith, S., Chi, E. Y., Pham, A. & Rubens, C. E. (1993).** Effect of type III group B Streptococcal capsular polysaccharide on invasion of respiratory epithelial cells. *Infect Immun* **61**, 4835-4841.

**Jacobs, A. A. C., Loeffen, P. L. W., Van Den Berg, A. J. G. & Strom, P. K. (1994).** Identification, purification and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*. *Infect Immun* **62**, 1742-1748.

**Kurl, D.N., Haataja, S. & Finne, J. (1989).** Hemagglutination activities of group B, C, D and G streptococci: demonstration of novel sugar-specific cell-binding activities in *Streptococcus suis*. *Infect Immun* **57**, 384-389.

**LaPenta, D., Rubens, C., Chi, E. & Cleary, P. P. (1994).** Group A streptococci efficiently invade human respiratory epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 12115-12119.

**Markwell, M. A. K., Haas, S. M., Bieber, L. L. & Tolbert, N. E. (1978).** A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* **87**, 206-210.

**Nealon, T. J. & Mattingly, S. J. (1985).** Kinetic and chemical analyses of the biologic significance of lipoteichoic acids in mediating adherence of serotype III group B streptococci. *Infect Immun* **50**, 107-115.

**Nizet, V., Gibson, R. L., Chi, E. Y., Framson, P. E., Hulse, M. & Rubens, C. E. (1996).** Group B streptococcal beta-hemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells. *Infect Immun* **64**, 3818-3826.

**Nizet, V., Kim, K. S., Stins, M., Jonas, M., Chi, E. Y., Nguyen, D. & Rubens, C.E. (1997).** Invasion of brain microvascular endothelial cells by group B Streptococci. *Infect Immun* **65**, 5074-5081.

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

**Rubens, C. E., Smith, S., Hulse, M., Chi, E. Y. & van Velle, G. (1992).** Respiratory epithelial cell invasion by group B Streptococci. *Infect Immun* **60**, 5157-5163.

**Rubins, J. B., Duane, P. G., Charboneau, D. & Janoff, E. N. (1992).** Toxicity of pneumolysin to pulmonary endothelial cells *in vitro*. *Infect Immun* **60**, 1740-1746.

**Salasia, S. I. O., Lämmler, C. & Herrmann, G. (1995).** Properties of a *Streptococcus suis* isolate of serotype 2 and two capsular mutants. *Vet Microbiol* **45**, 151-156.

**Segers, R. P. A. M., Kenter, T., de Haan, L. & Jacobs, A. C. (1998).** Characterization of the gene encoding suilysin from *Streptococcus suis* and expression in field isolates. *FEMS Microbiol Letters* **167**, 255-261.

**Segura, M. A., Cléroux, P. & Gottschalk, M. (1998).** *Streptococcus suis* and group B *Streptococcus* differ in their interactions with murine macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol* **21**, 189-195.

**Segura, M., Stankova, J. & Gottschalk, M. (1999a).** Heat-killed *Streptococcus suis* capsular type 2 strains stimulate tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 production by murine macrophages. *Infect Immun* **67**, 4646-4654.

**Segura, M. & Gottschalk, M. (1999b).** Adhesion of *Streptococcus suis* capsular type 2 to phagocytic cells. In *Abstracts of the XIV Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases*, abstract P8.17. Auckland. New Zealand.

**Smith, H. E., Damman, M., van der Velde, J., Wagenaar, F., Wisselink, H. J., Stockhofe-Zurwieden, N. & Smits, M. A. (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**, 1750-1756.

**St. Geme III, J.W. & Cutter, D. (1996).** Influence of pili, fibrils, and capsule on *in vitro* adherence by *Haemophilus influenzae* type b. *Mol Microbiol* **21**, 21-31.

**Tamura, G. S., Kuypers, J. M., Smith, S., Raff, H. & Rubens, C. E. (1994).** Adherence of group B Streptococci to cultured epithelial cells: roles of environmental factors and bacterial surface components. *Infect Immun* **62**, 2450-2458.

**Tauber, M. G. (1989).** Brain edema, intracranial pressure and cerebral blood flow in bacterial meningitis. *Pediatr Infect Dis* **8**, 915-917.

**Tikkanen, K., Haataja, S. & Finne, J. (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**, 3659-3665.

**Trottier, S., Higgins, R., Brochu G. & Gottschalk, M. (1991).** A case of human endocarditis due to *Streptococcus suis* in North America. *Rev Infect Dis* **13**, 1251-1252.



**Tuomanen, E. (1996).** Entry of pathogens into the central nervous system. *FEMS Microbiol Rev* **18**, 289-299.

**Tunkel, A. R. & Scheld, W. M. (1993).** Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev* **6**, 118-136.

**Vecht, U., Wisselink, H. J., Jellema, M. L. & Smith, H.E. (1991).** Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. *Infect Immun* **59**, 3156-3162.

**Wibawan, I., Lammler, C. & Pasaribu, F. H. (1992).** Role of hydrophobic surface proteins in mediating adherence of group B streptococci to epithelial cells. *J Gen Microbiol* **138**, 1237-1242.

**Williams, A. E. & Blakemore, W. F. (1990).** Pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus suis* type 2. *J Infect Dis* **162**, 474-481.

## FIGURE LEGENDS

**Fig.1.** Invasion of epithelial cell lines LLC-PK1, PK(15), MDCK, A549 and HeLa by *Streptococcus suis* serotype 2 [strains S735 (⊗), 31533 (⊗), AAH4 (⊖) and unencapsulated mutant 2A (□)] and group B streptococci [strain COH1 (■)]. Results were determined after a 2-h exposure with  $10^5$  c.f.u. per well, followed by an additional 2-h incubation in presence of penicillin/gentamicin to kill extracellular bacteria, and epithelial cell lysis to retrieve 100- $\mu$ l aliquots of intracellular bacteria for viable plate counts.

**Fig. 2.** (a) Adhesion of epithelial cell lines LLC-PK1, PK(15), MDCK, A549 and HeLa by *Streptococcus suis* serotype 2 [strains S735 (⊗), 31533 (⊗), AAH4 (⊖) and unencapsulated mutant 2A (□)] and group B streptococci [strain COH1 (■)]; \*,  $P < 0.05$  versus adherence of the parent strain S735. Results were determined after a 2-h exposure with  $10^5$  c.f.u. per well, followed by extensive washing of non-adherent bacteria and epithelial cell lysis to retrieve 100- $\mu$ l aliquots of total cell-associated bacteria for viable plate counts. (b) Transmission electron micrograph showing *Streptococcus suis* adhered to LLC-PK1; bar : 300 nm. (c) Scanning electron micrograph showing *Streptococcus suis* adhered to LLC-PK1; bar : 2  $\mu$ m.

**Fig. 3.** Kinetic adherence to epithelial cell line LLC-PK1 of *Streptococcus suis* serotype 2, strain S735 in (a) time-dependant way in presence of  $10^5$  CFU per well and (b) dose-dependant way after 2-h incubation.

**Fig. 4.** Effect of *Streptococcus suis* concentration on LLC-PK1 injury. Haemolytic strains S735 (□) and 31533 (σ); non-haemolytic strain AAH4 (λ) and GBS strain COH1 (○). LLC-PK1 cytotoxicity was determined by LDH release in the presence of different concentrations of *S. suis* strains after 4 h- incubation.

**Fig. 5.** Effect of incubation time in presence of *Streptococcus suis* haemolytic strains 31533 (□) and S735 (■) and non-haemolytic strain AAH4 (⊠) on LLC-PK1 injury; \*, P<0.01 versus the haemolytic strains S735 and 31533 (4 h and 18 h). LLC-PK1 cytotoxicity was determined by LDH release in presence of  $10^8$  c.f.u. per well after different incubation times.

**Fig. 6.** Electron micrographs demonstrating LLC-PK1 injury with  $10^8$  c.f.u./well *Streptococcus suis*. Panel (a): non infected control cells. Panel (b): non-suilysin-producing strain AAH4 (bar: 1 μm). Panel (c) : Suilysin-producing strain S735 (bar: 300 nm). LLC-PK1 integrity after 2 h- incubation with strain AAH4 was comparable to non infected control cells. Injury was manifested by the lost of the cytoplasmic density, severe disruption of cellular membranes and lost of microvillus structures.

**Fig. 7.** Effects of different variables on the cytotoxic effect of *Streptococcus suis* serotype 2 strains S735 (■), 31533 (□) and AAH4 (⊠). Cholesterol ( $400 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) was incubated with bacteria for 1 h prior to the addition to cells. LLC-PK1 cytotoxicity was determined by LDH release in presence of different variables after 4-h incubation.

Figure 1. Lalonde et al.

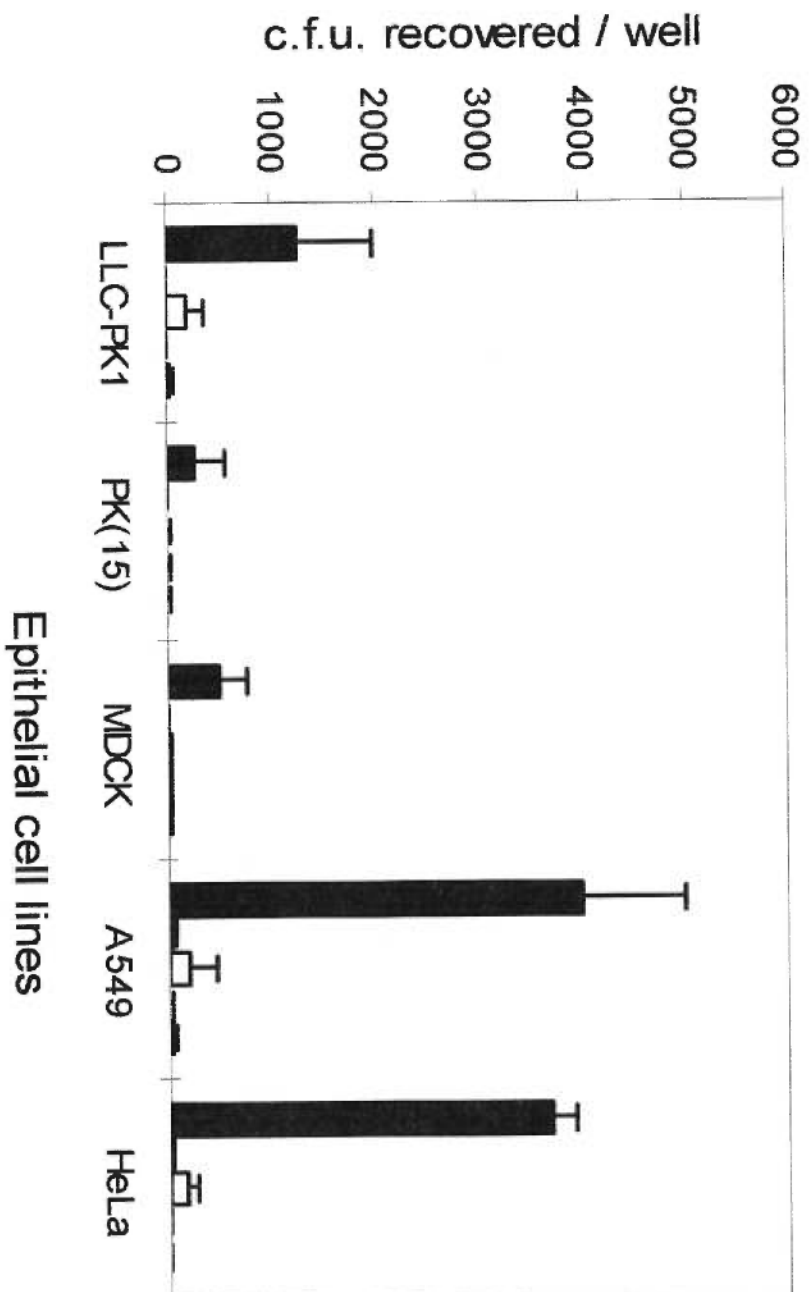


Figure 2 (a) Lalonde et al.

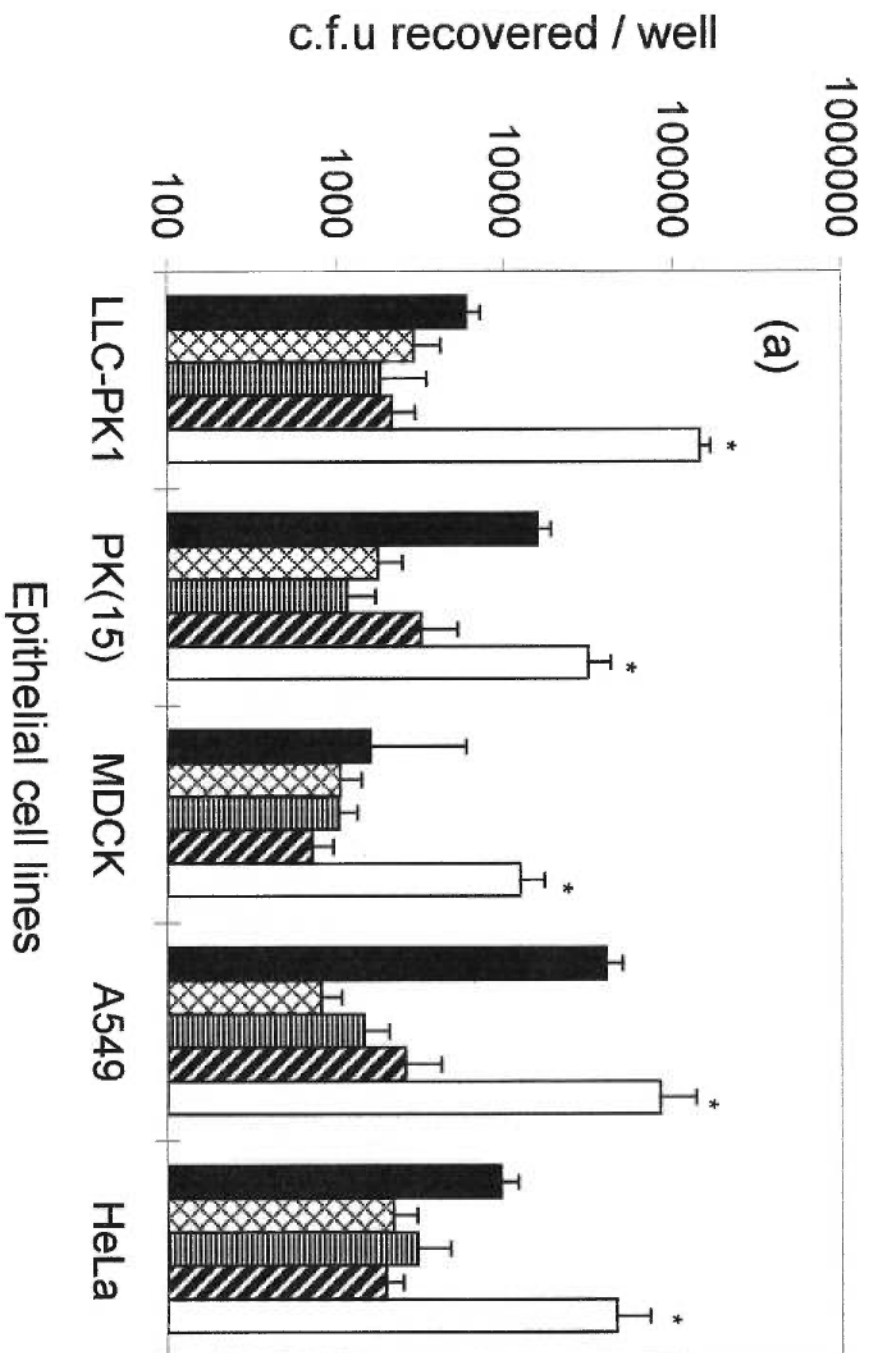


Figure 2 Lalonde et al.

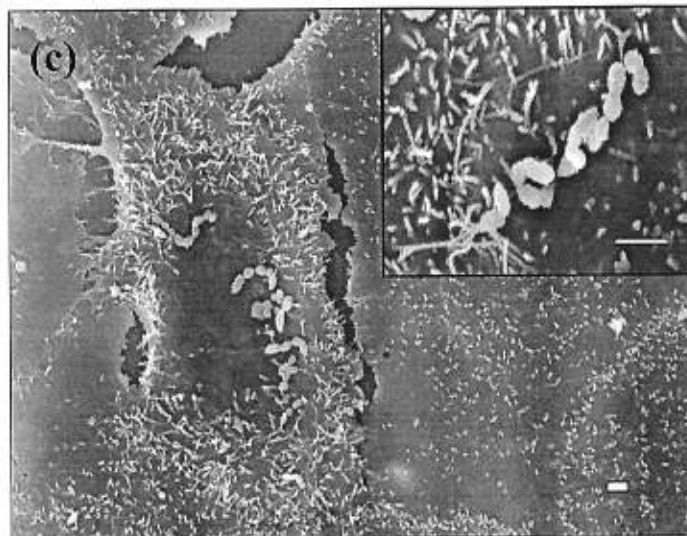
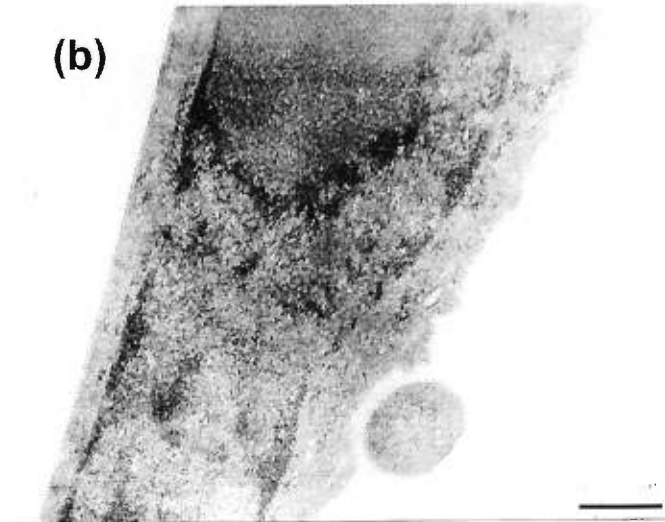


Figure 3 (a) Lalonde et al.

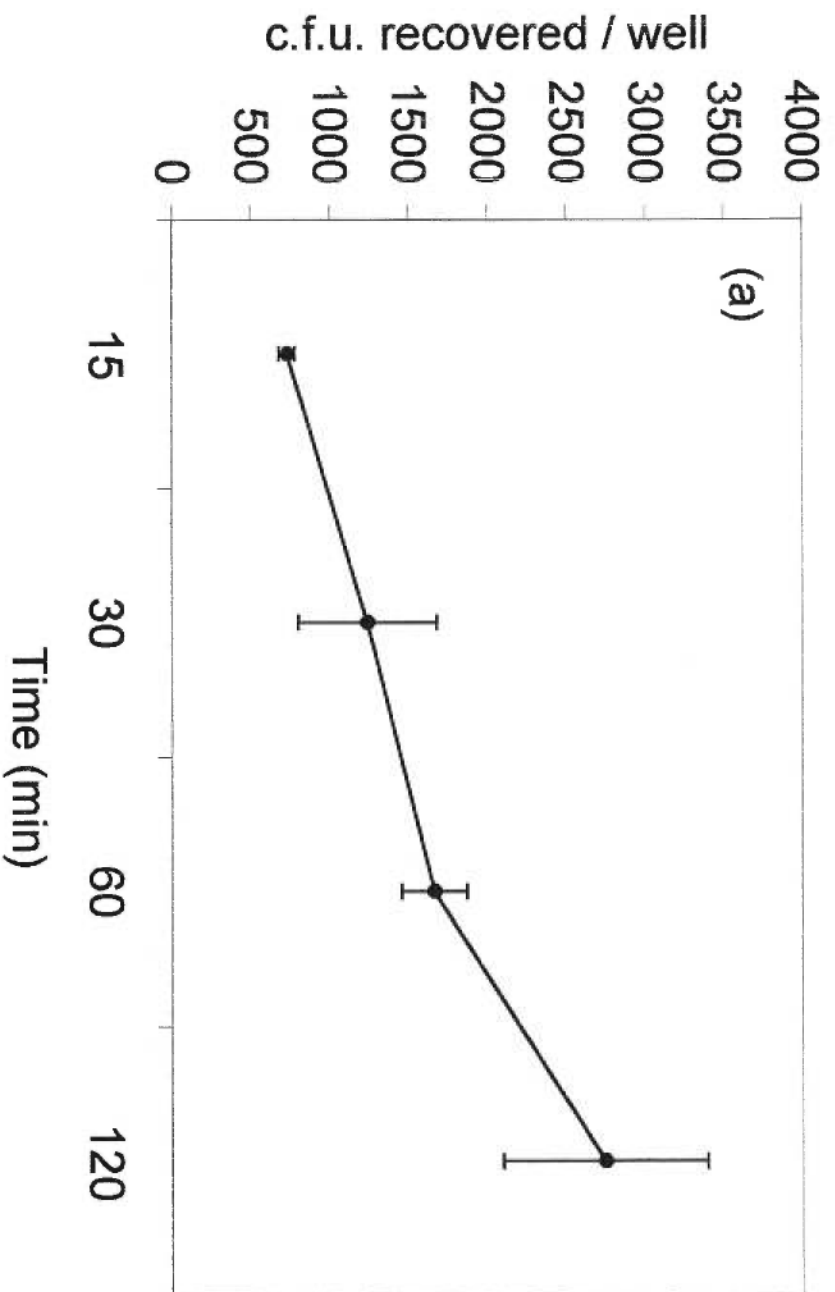


Figure 3 (b) Lalonde et al.

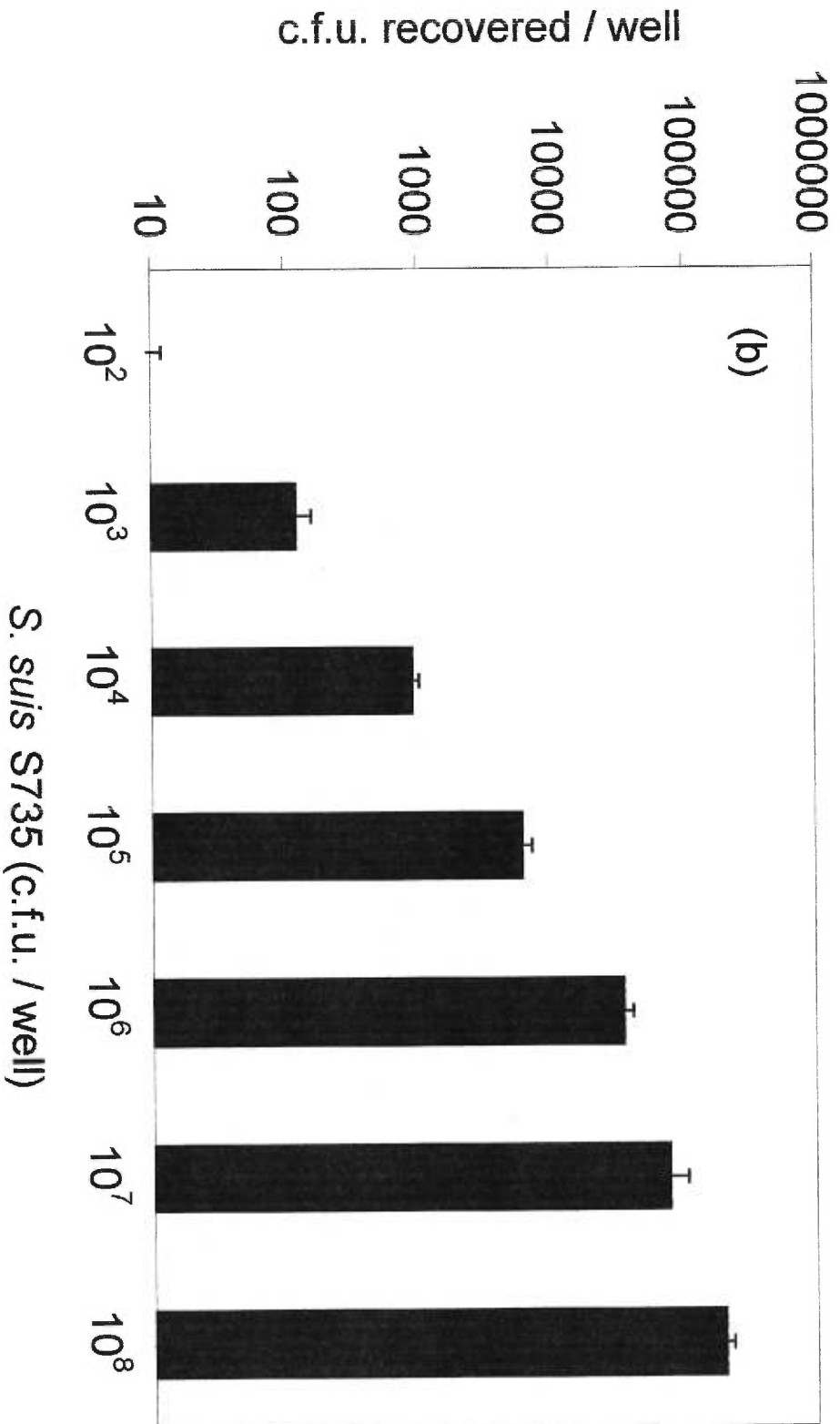




Figure 4. Lalonde et al.

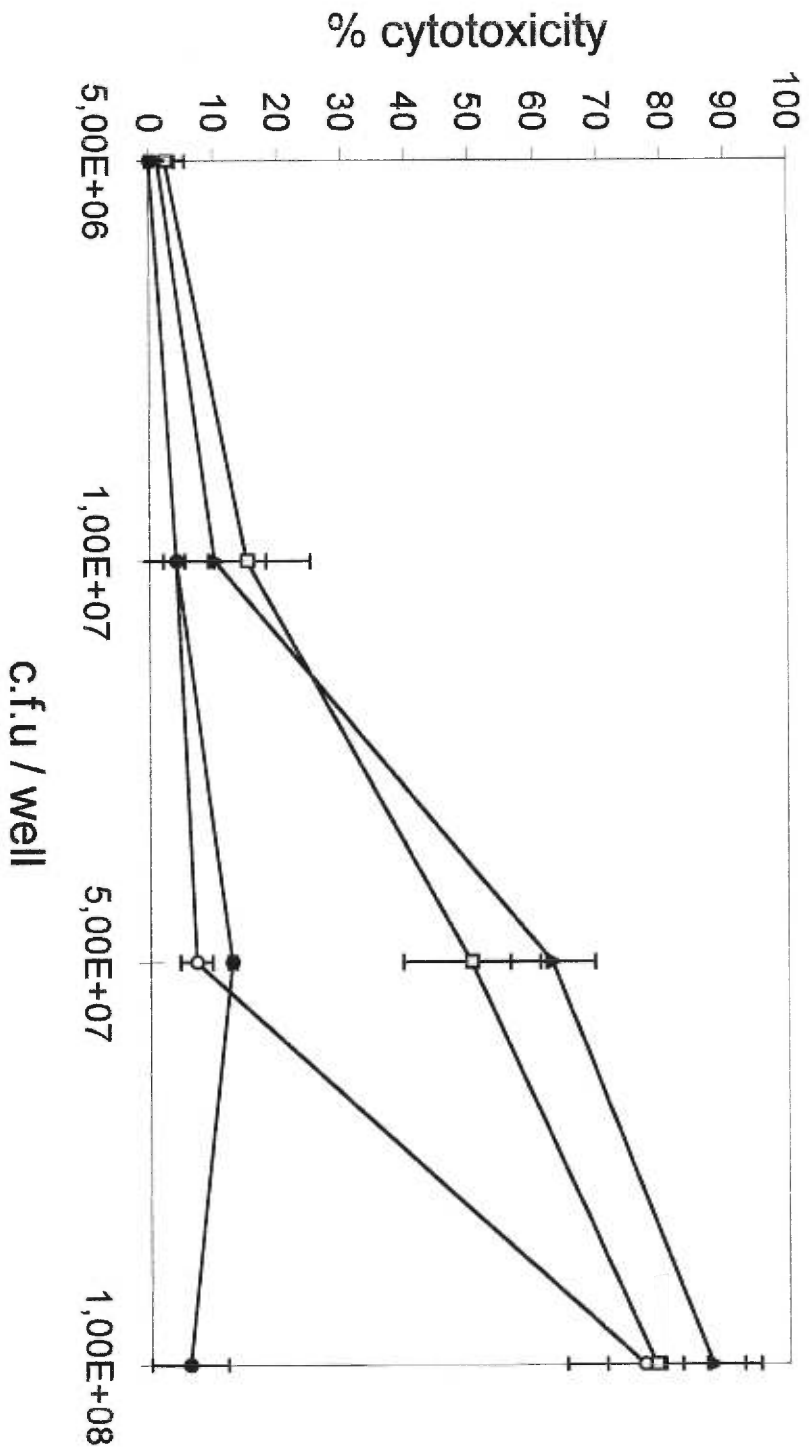


Figure 5. Lalonde et al.

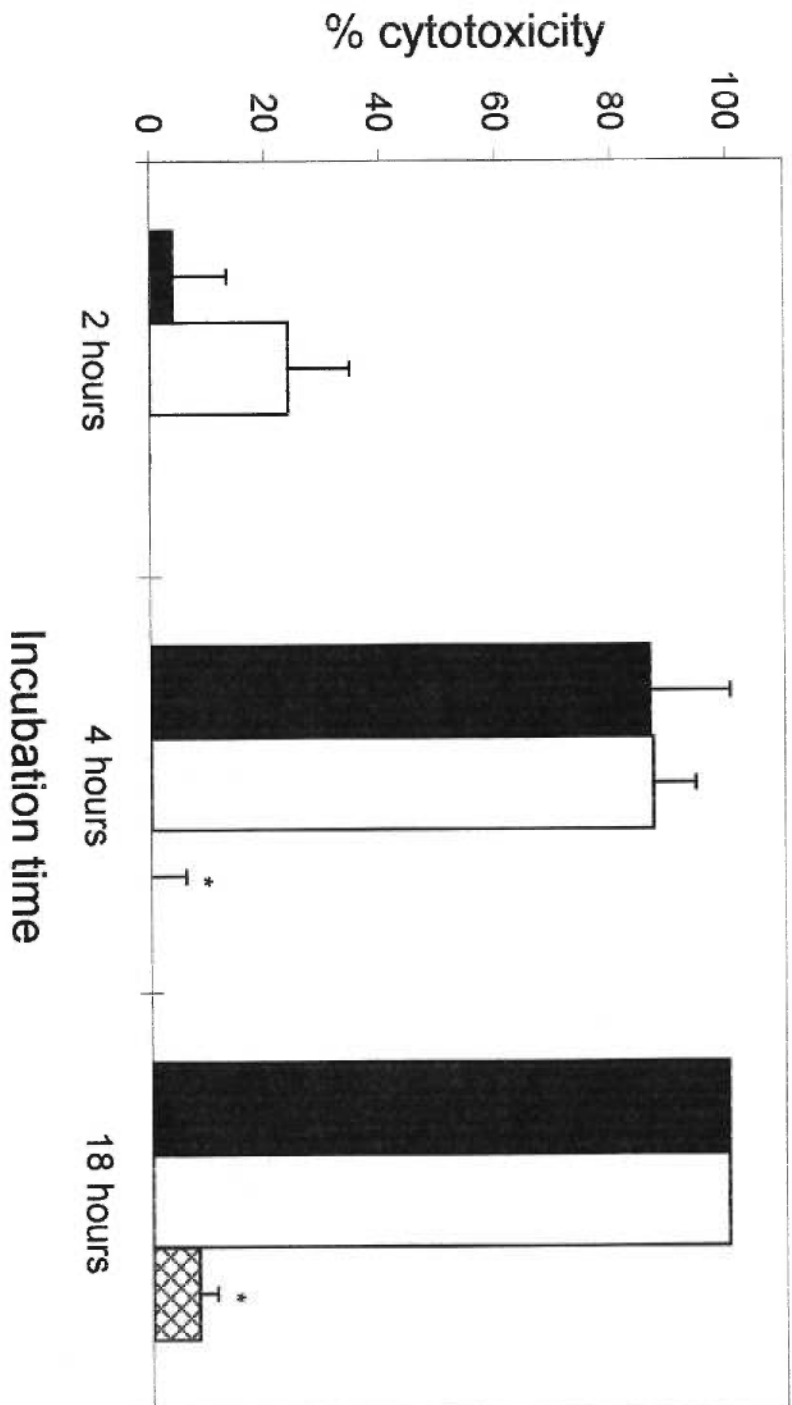


Figure 6. Lalonde et al.

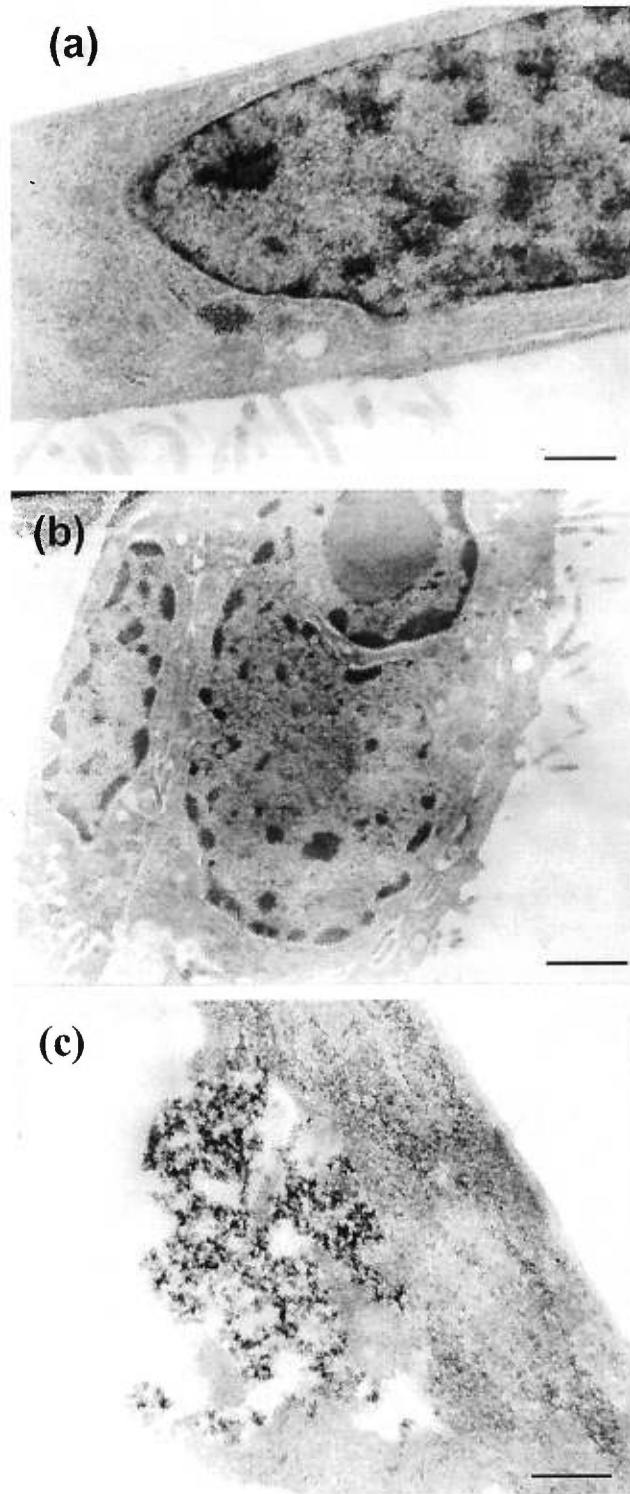
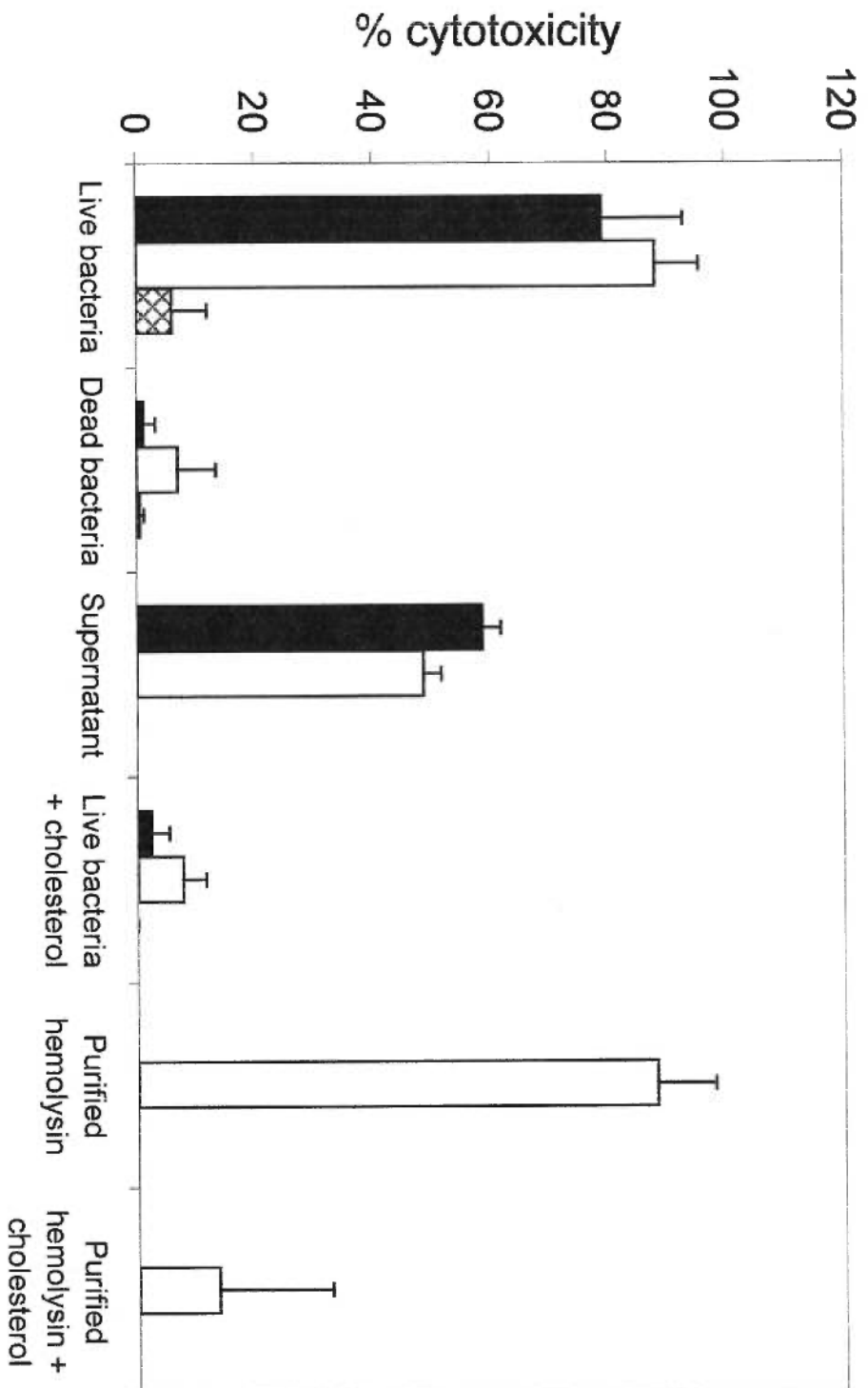


Figure 7. Lalonde et al.



#### **IV- DISCUSSION**

La pathogénèse des infections causées par *S. suis* sérotype 2 est peu connue. Comme pour d'autres pathogènes microbiens, il est probable qu'elle soit la résultante d'un procédé complexe comportant plusieurs étapes. L'attachement à des cellules épithéliales, la colonisation des muqueuses ainsi que des interactions avec des cellules épithéliales des voies respiratoires sont des étapes préliminaires essentielles à certaines infections. Par exemple, les interactions avec des cellules épithéliales chez les streptocoques des groupes A et B ont déjà été étudiées afin de mieux comprendre la pathogénie de ces infections (LaPenta et coll., 1994; Tamura et coll., 1994).

*S. suis* et GBS présentent plusieurs similarités. Ils sont tous deux des streptocoques responsables de méningites, de pneumonies et de septicémies. Ils possèdent une capsule dont l'acide sialique est un des composants et produisent une hémolysine. De plus, on retrouve une variabilité de la virulence des souches à l'intérieur d'un même sérotype. Jusqu'à ce jour, plusieurs études ont été effectuées afin d'éclaircir la pathogénèse de l'infection de GBS. C'est ainsi qu'il est aujourd'hui reconnu que GBS est capable d'adhérer et d'envahir des cellules épithéliales. Puisque *S. suis* et GBS sont des pathogènes possédant plusieurs similarités, il serait possible qu'ils partagent une pathogénèse des infections similaire.

Selon les résultats de notre étude, *S. suis* n'envahit pas les cellules épithéliales. Le mutant acapsulé 2A ne réussit pas plus à les envahir. Différentes variables ont été évaluées comme par exemple le temps d'incubation, la présence de sérum ainsi que la concentration et le stade de croissance des bactéries. Cependant, aucune n'a réussi à favoriser l'invasion. Ces résultats vont à l'encontre d'une récente publication de Norton et coll. (1999). Dans cette étude, il a été démontré que quelques souches de *S. suis* sont capables d'envahir de façon restreinte les cellules de la lignée Hep-2, tel que détecté par la méthode de fluorescence différentielle. Les auteurs mentionnent avoir tenté de mesurer l'invasion à l'aide de la méthode utilisée dans notre étude. Toutefois, il semble que les résultats obtenus ainsi n'ont pas été consistants. Des différences dans les caractéristiques des souches, les techniques et les lignées cellulaires utilisées pourrait

expliquer ces différences. D'un autre côté, nous confirmons que GBS est capable d'envahir les cellules épithéliales d'origine humaine, comme il a été précédemment décrit (Rubens et coll., 1992). Nos résultats suggèrent que *S. suis* et GBS interagissent de façon différente avec les cellules épithéliales. D'ailleurs, il a déjà été démontré qu'ils interagissent aussi différemment avec les cellules phagocytaires (Ségura et coll., 1998) et les cellules endothéliales (Charland et coll., 2000).

*S. suis* est capable d'adhérer à différentes lignées de cellules épithéliales. De plus, cette adhérence dépend du temps d'incubation et de la concentration de bactéries ajoutées. Peu importe l'origine des souches (Européenne ou Nord-Américaine), elles adhèrent toutes de façon équivalente aux différentes lignées. Comme pour GBS (Tamura et coll., 1994), l'état physiologique de la bactérie (phase logarithmique ou stationnaire) n'affecte pas le niveau d'adhérence. Tamura et coll. (1994) avaient observé un niveau d'adhérence plus faible à la lignée MDCK, ce qui est confirmé par cette étude.

Bien que la capsule ne semble pas empêcher l'adhérence, celle d'un mutant acapsulé est significativement plus élevée et ce, avec toutes les lignées testées. Salasia et coll. (1995) ont démontré que des mutants spontanés acapsulés de *S. suis* sérotype 2 adhèrent en plus grand nombre à la lignée cellulaire HeLa ainsi qu'à des macrophages pulmonaires de lapin. De plus, dans le cas de *S. pneumoniae*, une souche non-capsulée adhère en nombre beaucoup plus élevée que la souche mère capsulée (Adamou et coll., 1998). En ce qui concerne GBS, l'influence de la capsule sur l'adhérence à des cellules épithéliales est plus controversée (Wibawan et coll., 1992; Tamura et coll., 1994). St. Geme et Cutter (1996) suggèrent que l'encapsulation pourrait être modifiée selon l'étape de l'infection. L'encapsulation serait régulée négativement lors de la colonisation des cellules épithéliales des poumons et/ou du nasopharynx. Une fois dans la circulation sanguine, elle serait régulée positivement puisque la capsule permet de protéger la bactérie du système immunitaire. Cependant, la présence de la capsule n'empêche pas complètement l'adhérence aux autres cellules, comme par exemple les

cellules endothéliales du cerveau (Charland et coll., 2000) ou les cellules épithéliales des plexus choroïdiens. Toutefois, il n'existe à ce jour aucune évidence directe d'une telle modulation de l'encapsulation pour *S. suis*.

Tikkanen et coll. (1996) rapportent l'existence chez *S. suis* d'une adhésine dont les interactions avec un récepteur (GbO<sub>3</sub>), situé sur des érythrocytes, seraient empêchées par la capsule. Tikkanen et coll. (1996) ont effectué différentes études afin d'inhiber l'hémagglutination. L'ajout du néo-glycoconjugué Gal $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-4 Glc-O-CETE-BSA a permis d'inhiber l'hémagglutination. De la même façon, la destruction de la portion glycanique du récepteur avec du métapériodate de sodium ou suite à une digestion enzymatique à l'aide d'une  $\alpha$ -galactosidase ont réussi à inhiber l'hémagglutination. Puisque ce récepteur est aussi retrouvé sur les cellules épithéliales, nous avons vérifié s'il s'agissait du même récepteur qui était impliqué pour les interactions bactérie-cellule discutées dans notre étude. Toutefois, aucun de ces traitements n'a réussi à inhiber l'adhérence de *S. suis* sérotype 2 aux cellules épithéliales. De plus, le traitement des bactéries avec des protéases n'a pas affecté leur adhérence aux cellules épithéliales. Ainsi, les interactions entre *S. suis* sérotype 2 et les lignées de cellules épithéliales observées dans cette étude semblent être différentes, au moins en partie, de celles observées lors des tests d'hémagglutination. De plus, nous avons observé une forte inhibition de l'adhérence aux cellules épithéliales suite à l'ajout de la paroi cellulaire purifiée de *S. suis*. Pour les streptocoques des groupes A et B ainsi que pour *S. pneumoniae*, il a déjà été décrit que des composants de la paroi cellulaire seraient responsables de l'adhérence à des cellules de l'hôte (Beachy, 1981; Nealon et Mattingly, 1985; Andersson et coll., 1988). Le rôle possible de l'acide lipoteichoïque et/ou des peptidoglycans de *S. suis* avec les cellules épithéliales reste cependant à être confirmé.

Une fois *S. suis* adhérent aux cellules épithéliales, la bactérie pourrait sécréter des facteurs toxiques qui auraient pour conséquence la lyse des cellules. Cela favoriserait la rupture de la barrière de cellules épithéliales et ainsi faciliter l'accès à la circulation



sanguine et la dispersion systémique de l'organisme (Nizet et coll., 1996). De plus, cette toxicité pourrait augmenter la perméabilité de la BHM, ce qui aurait pour conséquence le développement d'un oedème cérébral, une augmentation de la pression intracrânienne et le blocage de la circulation sanguine cérébrale; toutes des caractéristiques d'une méningite bactérienne (Tauber, 1989). Pour le cas de *S. suis*, il semble que l'hémolysine soit la responsable de l'endommagement des cellules épithéliales *in vitro*. En fait, uniquement les souches productrices de suilysine ont un effet toxique sur les cellules épithéliales. Cette toxicité augmente avec le temps et la concentration bactérienne, ce qui concorde avec le mode d'action proposé de la suilysine (Gottschalk et coll., 1995). La cytotoxicité est perdue lorsque les bactéries sont mortes mais retrouvée avec le surnageant des souches productrices de suilysine ainsi qu'avec la suilysine purifiée. Il a été mentionné précédemment que le cholestérol, en se liant à la suilysine, l'empêche d'être active (Gottschalk et coll., 1995; Jacobs et coll., 1994). Ainsi, l'ajout de cholestérol inhibe l'effet toxique des souches produisant la suilysine ainsi que celle de la suilysine purifiée. Il a déjà été démontré que l'hémolysine a un effet toxique sur les cellules endothéliales (Charland et coll., 2000), les cellules phagocytaires (Segura et coll., 1999) et la lignée de cellules épithéliales Hep-2 (Norton et coll., 1999). Il est connu que la  $\beta$ -hémolysine de GBS est responsable de la destruction des cellules épithéliales *in vitro* (Nizet et coll., 1996). Toutefois, nous avons montré que pour une même concentration bactérienne, *S. suis* est beaucoup plus toxique sur la lignée LLC-PK1 que GBS. La pneumolysine, qui est membre de la même famille de toxines que la suilysine, est aussi reconnue pour sa capacité à endommager les cellules épithéliales (Rubins et coll., 1993). Dans cette étude, une souche virulente non-hémolytique n'induit pas de cytotoxicité. Puisqu'il a été démontré que les isolats Nord-Américains et Européens démontrent des profils génétiques et phénotypiques distincts (Chatellier et coll., 1999), différents facteurs de virulence sont probablement impliqués dans la pathogénèse de l'infection causée par ces deux groupes de souches. Des résultats similaires ont été obtenus avec les cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux (Charland et coll., 2000).

Les résultats obtenus dans cette étude amènent des évidences additionnelles que la pathogénie de l'infection diffère entre *S. suis* et GBS (Segura et coll., 1998; Charland et coll., 2000). Il est possible que les souches de *S. suis* productrices de la suilysine utilisent l'adhérence et la destruction cellulaire plutôt qu'une directe invasion cellulaire comme une des nombreuses étapes menant à la bactériémie et à la méningite chez les porcs.

Nous pouvons émettre l'hypothèse suivante. La pathogénie de l'infection de *S. suis* sérotype 2 est un procédé complexe comprenant plusieurs étapes. Il est possible que *S. suis* sérotype 2 interagisse avec les cellules épithéliales pulmonaires à un moment précoce de la pathogénie de l'infection en adhérant à ces dernières. Pour ce faire, l'encapsulation des bactéries pourrait tout d'abord être régulée négativement afin d'interférer le moins possible avec la colonisation des cellules épithéliales. Une fois adhérent, *S. suis* sérotype 2 doit traverser cette barrière de cellules pour se retrouver dans la circulation sanguine. Les résultats obtenus dans notre étude semblent indiquer qu'il existe deux profils de pathogénie selon si la souche est productrice de la suilysine ou non. Une souche produisant la suilysine se rend dans la circulation sanguine en détruisant les cellules épithéliales pulmonaires. Une fois dans la circulation sanguine, l'encapsulation des bactéries est maintenant régulée positivement. Il est en effet connu que la capsule sert de protection contre l'élimination par le système immunitaire. *S. suis* sérotype 2 peut se rendre au système nerveux central via les plexus choroïdiens. À ce niveau, ce sont les cellules épithéliales des plexus choroïdiens qui forment la barrière hémato-méningée. Il est possible que les souches de *S. suis* sérotype 2 productrices de la suilysine interagissent avec les cellules épithéliales des plexus choroïdiens. Tout d'abord en adhérant à ces dernières et ensuite en les détruisant par effet cytotoxique. Ce profil de pathogénie convient aux souches productrices de la suilysine ce qui correspond en grande partie aux souches virulentes européennes. C'est davantage en Amérique du Nord que l'on retrouve des souches virulentes ne produisant pas la suilysine. Pour ces dernières, le profil de pathogénie semble être différent, quoique toujours inconnu.

## **V- CONCLUSION**

- *Streptococcus suis* sérotype 2 est capable d'adhérer mais non d'envahir les cellules épithéliales. La ou les adhésines impliquées seraient masquées, du moins en partie, par la capsule et elles seraient situées dans la paroi cellulaire.
- La suilysine produite par *S. suis* sérotype 2 est, au moins en partie, responsable de l'effet toxique observé sur les cellules épithéliales.
- Les souches Européennes (MRP<sup>+</sup>, EF<sup>+</sup>, Hem<sup>+</sup>) et les souches Nord-Américaines (MRP<sup>-</sup>, EF<sup>-</sup>, Hem<sup>-</sup>) interagissent différemment avec les cellules épithéliales.
- *S. suis* sérotype 2 et GBS diffèrent dans leur façon d'interagir avec les cellules épithéliales.

## **VI- BIBLIOGRAPHIE**

- Adamou, J.E., Wizemann, T.M., Barren, P. et Langermann, S.** 1998. Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Infect. Immunol.* **66**: 820-822.
- Alexander, T.** 1995. *Streptococcus suis*: pathogenesis and host response. Allen D.Leman Swine conference. pp 49-53.
- Alouf, J. E. et Geoffroy, C.** 1991. The family of the antigenically-related cholesterol-binding ('sulphydryl-activated') cytolytic toxins, p. 147-186, Sourcebook of bacterial protein toxins. Academic press, New York.
- Andersson, B., Beachey, E.H., Tomasz, A., Tuomanen, E. et Svanborg-Eden, C.** 1988. A sandwich adhesin on *Streptococcus pneumoniae* attaching to human oropharyngeal epithelial cells in vitro. *Microb. Pathog.* **4**: 267-278.
- Barthelson, R., Mobasser, A., Zopf, D. et Simon, P.** 1998. Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to respiratory epithelial cells is inhibited by sialylated oligosaccharides. *Infect. Immunol.* **66**: 1439-1444.
- Beachey, E.H.** 1981. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J. Infect. Dis.* **143**: 325-345.
- Benkirane, R., Gottschalk, M. et Dubreuil, J.D.** 1997. Identification of a *Streptococcus suis* 60-kDa heat-shock protein using Western blotting. *FEMS Microbiol. Lett.* **153**: 379-385.
- Benkirane, R., Gottschalk, M., Jacques, M. et Dubreuil, J.D.** 1998. Immunochemical characterization of an IgG-binding protein of *Streptococcus suis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **20**: 121-127.
- Bentley, R.W., Leigh, J.A. et Collins, M.D.** 1991. Intrageneric structure of *Streptococcus suis* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **41**: 487-494.
- Brazeau, C., Gottschalk, M., Vincelette, S. et Martineau-Doizé, B.** 1996. In vitro phagocytosis and survival of *Streptococcus suis* capsular type 2 inside murine macrophages. *Microbiology.* **142**: 1231-1237.
- Busque, P., Higgins, R., Sénéchal, S., Marchand, R. et Quessy, S.** 1998. Simultaneous flow cytometric measurement of *Streptococcus suis* phagocytosis by polymorphonuclear and mononuclear blood leukocytes. *Vet. Microbiol.* **63**: 229-238.
- Charland, N., Kobisc, H.M., Martineau-Doizé, B., Jacques, M. et Gottschalk, M.** 1996. Role of capsular sialic acid in virulence and resistance to phagocytosis of *S. suis* capsular type 2. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **14**: 195-203.

- Charland, N., Harel, J., Kobisch, M., Lacasse, S. et Gottschalk, M.** 1998. *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiol.* **144**: 325-332.
- Charland, N, Nizet, V., Rubens, C.E., Kim, K.S., Lacouture, S. et Gottschalk, M.** 2000. *Streptococcus suis* serotype 2 interactions with human brain microvascular endothelial cells. *Infect. Imm.* **68**: 637-43.
- Chatellier, S., Harel, J., Zhang, Y., Gottschalk, M., Higgins, R., Devriese, L.A. et Brousseau, R.** 1998. Phylogenetic diversity of *Streptococcus suis* strains of various serotypes as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison. *Int. J. Syst. Bacteriol.* ?
- Chatellier, S., Gottschalk, M., Higgins, R., Brousseau, R. et Harel, J.** 1999. Relatedness of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from different geographic origins as evaluated by molecular fingerprinting and phenotyping. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 362-366.
- Clifton-Hadley, F. A. et Alexander, T.J.L.** 1980. The carrier site and carrier rate of *Streptococcus suis* type 2 in pigs. *Vet.Rec.* **107**: 40-41.
- Clifton-Hadley, F.A., et Alexander, T.J.L.** 1981. Studies of *Streptococcus suis* type 2 infection. *Pig Vet. Soc. Proc.* **8**: 14-19.
- Clifton-Hadley, F.A.** 1982. Studies of *S. suis* type 2 infection in pigs. PhD thesis, University of Cambridge.
- Clifton-Hadley, F.A., Alexander, T.I.L. et Enright, M.** 1986. The epidemiology, diagnosis, treatment and control of *Streptococcus suis* type 2 infection. *Proc. Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.* 471-491.
- Clifton-Hadley, F.A. et Alexander, T.J.L.** 1988. Update, diagnosis of *Streptococcus suis* infection in pigs. *In Pract., J. Vet. Post. Clin. Study.* **10**: 9-12.
- Cundell, D.R. et Tuomanen, E.I.** 1994. Receptor specificity of adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human type-II pneumocytes and vascular endothelial cells in vitro. *Microb. Pathog.* **17**: 361-374.
- de Moor, C.E.** 1963. Septicaemic infections in pigs, caused by haemolytic streptococci from new Lancefield groups designated R, S and T. *Ant. Leeuw. J. Microbiol. Serol.* **29**: 272-280.
- Edwards, M.S., Kasper, D.L., Jennings, H.J., Baker, C.J. et Nicholson-Weller, A.** 1982. Capsular sialic acid prevents activation of the alternative complement pathway by type III, group B streptococci. *J. Immunol.* **128**: 1278-1283.

- Elliott, S.D.** 1966. Streptococcal infections in young pigs. I An immunological study of the causative agent (PM *Streptococcus*). *J. Hyg. Camb.* **64**: 205-212.
- Elliott, S.D. et Tai, J.Y.** 1978. The type-specific polysaccharides of *Streptococcus suis*. *J. Exp. Med.* **148**: 1699-1704.
- Favre-Bonte, S., Joly, B. et Forestier, C.** 1999. Consequences of reduction of *Klebsiella pneumoniae* capsule expression on interactions of this bacterium with epithelial cells. *Infect. Immun.* **67**: 554-561.
- Feder, I., Chengappa, M.M., Fenwick, B., Rider, M. et Staats, J.** 1994. Partial characterization of *Streptococcus suis* type 2 hemolysin. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 1256-1260.
- Frosch, M., Weisberger, C. et Meyer, T.** 1989. Molecular characterization and expression in *Escherichia coli* of the gene complex encoding the polysaccharide capsule of *Neisseria meningitidis* group B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 1669-1673.
- Galina, L., Vecht, U., Wisselink, H.J. et Pijoan, C.** 1996. Prevalence of various phenotypes of *Streptococcus suis* isolated from swine in the U.S.A. based on the presence of muraminidase-released protein and extracellular factor. *Can. J. Vet. Res.* **60**: 72-74.
- Gottschalk, M., Higgins, R., Jacques, M., Mittal, K.R. et Henrichsen, J.** 1989. Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 2633-2636.
- Gottschalk, M., Lebrun, A., Jacques, M. et Higgins, R.** 1990. Hemagglutination properties of *S. suis*. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 2156-2158.
- Gottschalk, M., Petibois, S., Higgins, R. et Jacques, M.** 1991. Adherence of *Streptococcus suis* capsular type 2 to porcine lung sections. *Can. J. Vet. Res.* **55**: 302-304.
- Gottschalk, M., Higgins, R., Jacques, M. et Dubreuil, D.** 1992. Production and characterization of two *Streptococcus suis* capsular type 2 mutants. *Vet. Microbiol.* **30**: 59-71.
- Gottschalk, M., Lacouture, S. et Dubreuil, J. D.** 1995. Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin. *Microbiology.* **141**: 189-195.
- Gottschalk, M., Levrin, A., Wisselink, H., Dubreuil, J.D., Smith, H. et Vecht, U.** 1998. Production of virulence-related proteins by Canadian strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. *Can. J. Vet. Res.* **62**: 75-79.



- Haataja, S., Tikkanen, K., Liukkonen, J., Francois-Gerard, C. et Finne, J.** 1993. Characterization of a novel bacterial adhesion specificity of *Streptococcus suis* recognizing blood group P receptor oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **268**: 4311-4317.
- Haataja, S., Tikkanen, K., Nilsson, U., Magnusson, G., Karlsson, K.-A. et Jinne, J.** 1994. Oligosaccharide-receptor interaction of the Gal $\alpha$ 1-4Gal binding adhesin of *Streptococcus suis*. *J. Biol. Chem.* **269**: 27466-27472.
- Higgins, R. et Gottschalk, M.** 1989. L'infection à *Streptococcus suis*: une zoonose méconnue. *Médecin vétérinaire du Québec.* **19**: 161-165.
- Higgins, R. et Gottschalk, M.** 1990. An update on *Streptococcus suis* identification. *J. Vet. Diagn. Invest.* **2**:249-252.
- Higgins, R., Gottschalk, M., Boudreau, M., Lebrun, A. et Henrichsen, J.** 1995. Description of six new capsular types (29-34) of *Streptococcus suis*. *J. Vet. Diagn., Invest.* **7**: 405-406.
- Higgins, R. et Gottschalk, M.** 1999. Streptococcal diseases. Dans A.D. Leman, B.E. Straw, W.L. Mengelign, S. D'Allaire et D.J. Taylor (eds.), *Diseases of swine*, 8<sup>ième</sup> ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- Hulse, M.L., Smith, S., Chi, E.Y., Pham, A. et Rubens, C.E.** 1993. Effect of type III group B Streptococcal capsular polysaccharide on invasion of respiratory epithelial cells. *Infect. Immun.* **61**: 4835-4841.
- Jacobs, A. A. C., Loeffen, P. L. W., Van Den Berg, A. J. G. et Strom, P. K.** 1994. Identification, purification and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*. *Infect. Immun.* **62**: 1742-1748.
- Jacobs, A.A., van den Berg, A.J., Baars, J.C., Nielsen, B. et Johannsen, L.W.** 1995. Production of suilysin, the thiol-activated haemolysin of *Streptococcus suis*, by field isolates from diseased pigs. *Vet. Rec.* **137**: 295-296.
- Jacobs, A.A., van den Berg, A.J. et Loeffen, P.L.** 1996. Protection of experimentally infected pigs by suilysin, the thiol-activated haemolysin of *Streptococcus suis*. *Vet. Rec.* **139**: 225-228.
- Jacques, M., Gottschalk, M., Foiry, B. et Higgins, R.** 1990. Ultrastructural study of surface components of *Streptococcus suis*. *J. Bacteriol.* **172**: 2833-2838.
- Kasper, D.L., Winkelhake, L.J., Zollinger, W.D., Brandt, B.L. et Artenstein, M.S.** 1973. Immunochemical similarity between polysaccharide antigens of *Escherichia coli* O7:K1 (L): NM and group B *Neisseria meningitidis*. *J. Immunol.* **110**: 262-268.

- Katsumi, M., Saito, T., Kataoka, Y., Itoh, T., Kikuchi, N. et Hiramune, T.** 1996. Comparative preparation methods of sialylated capsule antigen from *Streptococcus suis* type 2 with type specific antigenicity. *J. Vet. Med. Sc.* **58**: 947-952.
- Kay, R.L.C.** 1985. Hearing loss in *Streptococcus suis* meningitis. M.D. dissertation. Univ. Cambridge.
- Kazatchkine, M.D., Fearon, D.T. et Austen, K.F.** 1979. Human alternative complement pathway: membrane-associated sialic acid regulates the competition between B and beta 1 H for cell-bound C3b. *J. Immunol.* **122**: 75-81.
- Kilpper-Bälz, R. et Schleifer, K.H.** 1987. *Streptococcus suis* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**: 160-162.
- Kurl, D.N., Haataja, S. et Finne, J.** 1989. Hemagglutination activities of group B, C, D, and G Streptococci demonstration of novel sugar-specific cell-binding activities in *Streptococcus suis*. *Infect. Immun.* **57**: 384-389.
- LaPenta, D., Rubens, C., Chi, E. et Cleary, P. P.** 1994. Group A streptococci efficiently invade human respiratory epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 12115-12119.
- Liukkonen, J, Haataja, S., Tikkanen, K., Kelm, S. et Finne, J.** 1992. Identification of N-acetylneuraminyl alpha2 → 3 poly-N-acetylactosamine glycans as the receptors of sialic acid-binding *Streptococcus suis* strains. *J. Biol. Chem.* **267**: 21105-21111.
- Levine, S.** 1987. Choroid plexus: target for systemic disease and pathway to the brain. *Lab. Invest.* **56**: 231-233.
- Nealon, T. J. et Mattingly, S. J.** 1985. Kinetic and chemical analyses of the biologic significance of lipoteichoic acids in mediating adherence of serotype III group B streptococci. *Infect. Immun.* **50**: 107-115.
- Nizet, V., Gibson, R. L., Chi, E. Y., Framson, P. E., Hulse, M. et Rubens, C. E.** 1996. Group B streptococcal beta-hemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells. *Infect. Immun.* **64**: 3818-3826.
- Nizet, V., Kim, K.S., Stins, M., Jonas, M., Chi, E.Y., Nguyen, D. et Rubens, C.E.** 1997. Invasion of brain microvascular endothelial cells by group B Streptococci. *Infect. Immun.* **65**: 5074-5081.
- Norton, P.M., Rolph, C., Ward, P.N., Bentley, R.W. et Leigh, J.A.** 1999. Epithelial invasion and cell lysis by virulent strains of *Streptococcus suis* is enhanced by the presence of suilysin. *FEMS Immunol. And Med. Microbiol.* **26**: 25-35.

- Pancholi, V. et Fischetti, V.** 1992. A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J. Exp. Med.* **176**: 415-426.
- Perch, B., Pedersen, K.B. et Henrichsen, J.** 1983. Serology of capsulated streptococci pathogenic for pigs: six new serotypes of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.* **17**: 993-996.
- Prasadarao, N.V., Wass, C.A. et Kim, K.S.** 1996. Endothelial cell GlcNAc1-4GlcNAc epitopes for outer membrane protein A enhance traversal of *Escherichia coli* across the blood-brain barrier. *Infect. Immun.* **64**: 154-160.
- Pujol, C., Eugène, E., De Saint Martin, L. et Nassif, X.** 1997. Interaction of *Neisseria meningitidis* with a polarized monolayer of epithelial cells. *Infect. Immun.* **65**: 4836-4842.
- Quessy, S., Dubreuil, J.D., Jacques, M., Malouin, F. et Higgins, R.** 1994. Increase of capsular material thickness following *in vivo* growth of virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **115**: 19-26.
- Quessy, S., Busque, P., Higgins, R., Jacques, M. et Dubreuil, J.D.** 1997. Description of an albumin binding activity for *S. suis* serotype 2. *FEMS Microbiol. Lett.* **147**: 245-250.
- Reams, R.Y., Glickman, L.T., Harrington, D.D., Thacker, H.L. et Bowersock, T.L.** 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**: 326-334.
- Ring, A., Weiser, J.N. et Tuomanen, E.I.** 1998. Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. *J. Clin. Invest.* **102**: 347-360.
- Rubens, C.E., Smith, S., Hulse, M., Chi, E.Y. et van Velle, G.** 1992. Respiratory epithelial cell invasion by group B Streptococci. *Infect. Immun.* **60**: 5157-5163.
- Rubins, J.B., Duane, P.G., Clawson, D., Charbonneau, D., Young, J. et Niewoehner, D.E.** 1993. Toxicity of pneumolysin to pulmonary alveolar epithelial cells. *Infect. Immun.* **61**: 1352-1358.
- Salasia, S.I.O., Lämmler, C. et Herrmann, G.** 1995. Properties of a *Streptococcus suis* isolate of serotype 2 and two capsular mutants. *Vet. Microbiol.* **45**: 151-156.
- Sanford, S.E. et Tilker, A.M.E.** 1982. *Streptococcus suis* type 2 association diseases in swine: observations of one year study. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **181**: 673-676.

- Sanford, S.E.** 1987. Gross and histopathological finding in unusual lesions caused by *Streptococcus suis* in pigs. II. Central nervous system lesions. *Can. J. Vet. Res.* **51**: 486-489.
- Segers, R.P.A.M., Kenter, T., de Haan, L.A.M et Jacobs, A.A.C.** 1998. Characterisation of the gene encoding sullysin from *Streptococcus suis* and expression in field strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **167**: 255-261.
- Segura, M. A. et Gottschalk, M.** 1999. Adhesion of *Streptococcus suis* capsular type 2 to phagocytic cells. XIV Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases. Auckland. New Zealand.
- Segura, M.A., Cl  roux, P. et Gottschalk, M.** 1998. *Streptococcus suis* and group B *Streptococcus* differ in their interactions with murine macrophages. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **21**: 189-195.
- Sellin, M., Linderholm, M., Norgren, M. et Hakansson, S.** 1992. Endocarditis caused by a group B *Streptococcus* strain type III, in a nonencapsulated phase. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 2471-2473.
- Serhir, B., Higgins, R., Foiry, B. et Jacques, M.** 1993. Detection of immunoglobulin G-binding proteins in *S. suis*. *J. Gen. Microbiol.*, **139**: 2953-2958.
- Serhir, B., Dubreuil, D., Higgins, R. et Jacques, M.** 1995. Purification and characterization of a 52 kDa immunoglobulin G-binding protein from *S. suis* capsular type 2. *J. Bacteriol.* **177**: 3830-3836.
- Shigeoka, A.O., Rote, N.S., Santos, J.I. et Hill, H.R.** 1983. Assessment of the virulence factors of Group B streptococci: Correlation with sialic acid content. *J. Infect. Dis.* **147**: 857-863.
- Smith, H.** 1993. Gonococci *in vivo*: host CMP-NANA, sialylated lipopolysaccharide and serum resistance. *Can. J. Infect. Dis.* **4**: 31-37.
- Smith, H.E., Damman, M., van der Velde, J., Wagenaar, F., Wisselink, H.J., Stockhofe-Zurwieden, N. et Smits, M.A.** 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**: 1750-1756.
- Staats, J.J., Feder, I., Okwumabua, O. et Chengappa, M.M.** 1997. *Streptococcus suis*: past and present. *Vet. Res. Commun.* **21**: 381-407.
- Stephens, D.S., Hoffman, L.H. et McGee, Z.A.** 1983. Interaction of *Neisseria meningitidis* with human nasopharyngeal mucosa: attachment and entry into columnar epithelial cells. *J. Infect. Dis.* **148**: 369-76.

- Stephens, D.S., Spellman, P.A. et Swartley, J.S.** 1993. Effect of the ( $\alpha$ 2  $\rightarrow$  8)-linked polysialic acid capsule on adherence of *Neisseria meningitidis* to human mucosal cells. *J. Infect. Dis.* **167**: 475-479.
- St.Geme, J.W. et Falkow, S.** 1990. *Haemophilus influenzae* adheres to and enters cultured human epithelial cells. *Infect. Immun.* **58**: 4036-4044.
- St.Geme, J.W. et Falkow, S.** 1991. Loss of capsule expression by *Haemophilus influenzae* type b results in enhanced adherence to and invasion of human cells. *Infect. Immun.* **59**: 1325-1333.
- Stins, M.F., Prasadarao, N.V., Ibric, I., Wass, C.A. et Kim, K.S.** 1994. Binding characteristics of S fimbriated *Escherichia coli* to isolated brain microvascular endothelial cells. *Am. J. Pathol.* **145**: 1228-1236.
- Stins, M.F., Gilles, F. et Kim, K.S.** 1997. Selective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells. *J. Neuroimmunol.* **76**: 81-90.
- Swe, T.** 1976. A study of spontaneous and experimental streptococcal meningitis and arthritis in the pig. M. Phil., Dissertation, Univ. London. R.V.C.
- Tamura, G.S., Kuypers, J.M., Smith, S., Raff, H. et Rubens, C.E.** 1994. Adherence of group B Streptococci to cultured epithelial cells: roles of environmental factors and bacterial surface components. *Infect. Immun.* **62**: 2450-2458.
- Tauber, M. G.** 1989. Brain edema, intracranial pressure and cerebral blood flow in bacterial meningitis. *Pediatr. Infect. Dis.* **8**: 915-917.
- Teti, G., Tomasello, F., Chiofalo, M.S., Orefici, G. et Mastroeni, P.** 1987. Adherence of group B Streptococci to adult and neonatal epithelial cells mediated by lipoteichoic acid. *Infect. Immun.* **55**: 3057-3064.
- Tikkanen, K., Haataja, S., François-Gerard, C. et Finne, J.** 1995. Purification of a galactosyl- $\alpha$ 1-4-galactose-binding adhesin from the Gram-positive meningitis-associated bacterium *Streptococcus suis*. *J. Biol. Chem.* **270**: 28874-28878.
- Tikkanen, K., Haataja, S. et Jinne, J.** 1996. The galactosyl  $-(\alpha$ 1-4)-galactose-bonding adhesin of *Streptococcus suis*: occurrence in strains of different Hemagglutination activities and induction of opsonic antibodies. *Infect. Immun.* **64**: 3659-3665.
- Touil, F. et Higgins, R.** 1988. Les infections à *Streptococcus suis* chez l'espèce porcine: revue de littérature. *Méd. Vét. Québec.* **18**: 25-33.

- Tuomanen, E.** 1996. Entry of pathogens into the central nervous system. *FEMS Microbiol. Rev.* **18**: 289-299.
- Tunkel, A.R. et Scheld, W.M.** 1993. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**: 118-136.
- Vecht, U., Wisselink, H.J., Jellema, M.L. et Smith, H.E.** 1991. Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. *Infect. Immun.* **59**: 3156-3162.
- Vecht, Un, Wisselink, H.J., Reek, F.H., Stockhofe-Zurwieden, N. et Smith, H.E.** 1996. Diagnosis of several capsular serotypes of *Streptococcus suis* by phenotype and PCR and the relation with virulence for pigs. Présenté à 14<sup>th</sup> International Pig Veterinary Congress, Bologne, Italie, 7-10 juillet 1996.
- Walsh, B., Williams, A.E. et Satsangi, J.** 1992. *Streptococcus suis* type 2: pathogenesis and clinical disease. *Rev. Med. Microbiol.* **3**: 65-71.
- Wessels, M.R., Pozsgay, C., Kasper, D.L. et Jennings, H.J.** 1987. Structure and immunochemistry of an oligosaccharide repeating unit of the capsular polysaccharide of type III group B *Streptococcus*. *J. Biol. Chem.* **262**: 8262-8267.
- Wibawan, W.T., Lämmler, C. et Pasaribu, H.** 1992. Role of hydrophobic surface proteins in mediating adherence of group B streptococci to epithelial cells. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 1237-1242.
- Williams, A.E., Blakemore, W.F. et Alexander, T.J.L.** 1988. A murine model of *Streptococcus suis* type 2 meningitis in the pig. *Res. Vet. Sci.* **45**: 394-399.
- Williams, A.E.** 1989. Studies on the pathogenesis of *S. suis* type 2 in the pig. PhD dissertation, Univ. Cambridge, Dept. Clin. Vet. Med.
- Williams, A.E.** 1990. Relationship between intracellular survival in macrophages and pathogenicity of *S. suis* type 2 isolates. *Microbial. Patho.* **8**: 189-196.
- Williams, A.E. et Blakemore, W.F.** 1990a. Pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus suis* type 2. *J. Infect. Dis.* **162**: 474-481.
- Williams, A.E. et Blakemore, W.F.** 1990b. Pathology of streptococcal meningitis following intracisternal and natural routes of infection. *Neuropath. Appl. Neurobiol.* **16**: 345-356.
- Williams, A.E. et Blakemore, W.F.** 1990c. Monocyte-mediated entry of pathogens into the central nervous system. *Neuropath. Appl. Neurobiol.* **16**: 377-392.

**Windsor, R.S. et S.D. Elliott.** 1975. Streptococcal infections in young pigs. IV. An outbreak of streptococcal meningitis in weaned pigs. *J. Hyg. Camb.* **75**: 69-78.