

2 m 11, 2967.9

Université de Montréal

Production de cytokines pro-inflammatoires par des cellules endothéliales de
microvaisseaux cérébraux humains stimulés par *Streptococcus suis* sérotype 2

par

Nathalie Vadeboncoeur

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en sciences vétérinaires

option microbiologie

Février 2002

©Nathalie Vadeboncoeur, 2002



SF
607
U54
2002
V.010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Production de cytokines pro-inflammatoires par des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux humains stimulés par *Streptococcus suis* sérotype 2

présenté par:
Nathalie Vadeboncoeur

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Monique Doré
présidente-rapporteuse

Marcelo Gottschalk
directeur de recherche

Sylvain Quessy
membre du jury

RÉSUMÉ

Streptococcus suis représente un des pathogènes porcins les plus importants dans tous les pays où l'industrie porcine est intensive. La bactérie est aussi reconnue comme un agent de zoonose, causant des méningites, des endocardites et des septicémies. La pathogénèse des méningites dues à *S. suis* n'est que très peu connue. Il a été démontré que *S. suis* est capable d'adhérer aux cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux d'origine humaine (BMEC) mais pas aux cellules endothéliales ombilicales d'origine humaine (HUVEC). L'objectif de cette étude est d'évaluer la capacité de *S. suis* sérotype 2 à induire la production de «tumor necrosis factor alpha» (TNF- α), d'interleukine- (IL) 1, d'IL-6, d'IL-8 et de «monocyte chemotactic protein-1» (MCP-1) par des BMEC et par des HUVEC. *S. suis* est capable d'induire le relâchement d'IL-6, d'IL-8 et de MCP-1 par les BMEC mais pas par les HUVEC. L'induction de ces cytokines est dépendante de la concentration bactérienne et du temps d'incubation. La paroi cellulaire semble fortement responsable de la production de cytokines par les BMEC. La comparaison de l'induction de cytokines par plusieurs souches de *S. suis* d'origine porcine ou humaine démontre une production très hétérogène suggérant que l'origine des souches n'influence pas la réponse. La production *in situ* de cytokines par les BMEC peut être le résultat d'une adhésion spécifique de *S. suis* à ces cellules, ayant comme conséquences une augmentation du recrutement des leukocytes et une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-méningée.

Mots clés : *Streptococcus suis*; cytokine; cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux

SUMMARY

Streptococcus suis serotype 2 is a world wide agent of diseases among pigs including meningitis, septicemia and arthritis. This microorganism is also recognized as an important zoonotic agent. The pathogenesis of the meningitis caused by *S. suis* is poorly understood. We have previously shown that *S. suis* is able to adhere to human brain microvascular endothelial cells (BMEC), but not to human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). The objective of this work was to study the ability of *S. suis* serotype 2 to induce the release of the pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin- (IL) 1; IL-6 and the chemokines IL-8 and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by human BMEC and HUVEC, using an ELISA method. *S. suis* was able to stimulate the production of IL-6, IL-8 and MCP-1 by BMEC but not HUVEC, in a time- and concentration- dependent manner. Bacterial cell wall components were largely responsible for such stimulation. The human and pig origin of strains does not seem to affect the intensity of the response. Indeed, a very heterogeneous pattern of cytokine and chemokine production was observed for the different strains tested in this study. *In situ* production of cytokines and chemokines by BMEC may be the result of specific adhesion of *S. suis* to this cell type, with several consequences such as increased recruitment of leukocytes and an increase in the blood-brain barrier permeability.

Keywords: *Streptococcus suis*; cytokine; brain endothelial cells

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
RÉSUMÉ.....	iii
SUMMARY.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS.....	viii
DÉDICACE.....	x
REMERCIEMENTS.....	xi
I – INTRODUCTION.....	1
II- RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....	4
1.0 <i>Streptococcus suis</i> – aspects généraux –	5
1.1 La bactérie	5
1.2 Les sérotypes	5
1.3 Les infections causées par <i>S. suis</i>	7
2.0 Facteurs de virulence	9
2.1 Capsule	9
2.2 Protéines «Muramidase-Released Protein» (MRP) et «Extracellular Factor» (EF)	11
2.3 Hémolysine – Suilysine –	12
2.4 Adhésines	15
3.0 Pathogénèse de l'infection à <i>S. suis</i>	16
4.0 Interactions entre d'autres agents bactériens causant des méningites et les cellules de l'hôte	18
4.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	18
4.2 <i>Streptococcus</i> du groupe B (GBS)	20
4.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	21
5.0 Cytokines pro-inflammatoires – aspects généraux –	22
5.1 « Tumor Necrosis Factor- α » (TNF- α)	23

	vi
5.2 Interleukine-1 (IL-1)	23
5.3 Interleukine-6 (IL-6)	24
6.0 Chémokines – aspects généraux –	24
6.1 Interleukine-8 (IL-8)	25
6.2 «Monocyte Chemotactic Protein one» (MCP-1)	26
7.0 Rôles des cytokines dans la pathogénèse de la méningite	26
8.0 Cellules responsables de la production de cytokines et de chémokines lors d'une méningite	27
8.1 Monocytes/macrophages	27
8.2 Astrocytes	29
8.3 Cellules endothéliales	30
 III – MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS.....	32
Article : Pro-inflammatory Cytokine and Chemokine Release by Human Brain Microvascular Endothelial Cells Stimulated by <i>Streptococcus suis</i> Serotype 2	33
 IV – DISCUSSION GÉNÉRALE DES RÉSULTATS.....	58
 V – CONCLUSION.....	67
 VI – BIBLIOGRAPHIE.....	69
 VII – ANNEXE.....	xiii

LISTE DES FIGURES**MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS**

- Figure 1. Time course of production of IL-6 (A), IL-8 (B) and MCP-1 (C) by BMEC after stimulation with heat-killed *S. suis* serotype 2 (strains 89-1591 and S735; 10^9 CFU/ml).....53
- Figure 2. Time course of production of IL-6 (A), IL-8 (B) and MCP-1 (C) by HUVEC after stimulation with heat-killed *S. suis* serotype 2 (strains 89-1591 and S735; 10^9 CFU/ml).....54
- Figure 3. Comparative study of cytokine production by different *S. suis* strains.....55
- Figure 4. Comparative study of IL-6 (A), IL-8 (B) and MCP-1 (C) production by different proposed virulence factors for *S. suis* serotype 256

LISTE DES SIGLES ET DES ABÉVIATIONS

BBB : Blood brain barrier
BHM : Barrière hémato-méningée
BMEC : Brain microvascular endothelial cells
CFU: Colony-forming unit
CPS: Capsule Polysacchridique
DTT: Dithiotrheitol
EF: Extracellular factor
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay
FBS: Fetal bovine serum
Gal : Galactose
GBS : Streptocoques du groupe B
HUVEC : Human umbilical vein endothelial
ICAM-1 : Intercellular adhesion molecule-1
IgA : Immunoglobuline de type A
IgM : Immunoglobuline du type M
IL : Interleukine
IFN- γ : Interféron-gamma
LAL : *Limulus* amebocyte lysate
LCR : Liquide céphalo-rachidien
LPS : Lipopolysaccharide
Mabs : Monoclonal antibodies
MCP-1 : Monocyte chemotactic protein-1
MIP-1 : Macrophage inflammatory protein-1
MRP : Muramidase-released protein
NK : Natural killer
ORFs: Open reading frame
PAF: Platelet activating factor
PBS: Phosphate-buffered saline
PCR: Polymerase chain reaction
PMA: Phorbol myristate acetate
PmB: Polymixin-B

RANTES: Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted

RT-PCR: Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

SNC : Système nerveux central

THB : Todd-Hewitt broth

TNF- α : Tumor necrosis factor-alpha

UFC: Unité formatrice de colonie

VCAM-1: Vascular cell adhesion molecule-1

WO: Water-in-oil emulsion

DÉDICACE

À mes parents pour leur affection, leur soutien et leur enthousiasme...

Et à toi mon Amour pour ta présence si réconfortante...

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 accueillie dans son laboratoire d'abord comme stagiaire, ensuite comme étudiante. Je le remercie pour sa présence et ses judicieux conseils.

✍ Mariela Segura pour m'avoir guidée tout au long de mon projet de maîtrise. Je la remercie pour son soutien technique et ses encouragements constants.

✍ Dina Al-Numani pour nos discussions, nos rires et nos folies. Mille fois merci!

✍ La docteure Gabriela Martinez et le docteur Benoît D'Amour autant pour les discussions concernant la biologie moléculaire que pour toutes les autres portant sur des sujets très variés. Merci pour vos rires contagieux!

✍ Tous mes collègues du laboratoire pour leurs encouragements et le plaisir que j'ai eu à les côtoyer chaque jour.

✍ Tous les membres du Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, pour leur implication ou leurs encouragements.

✍ Ma famille, Patrick, mes amis pour leur soutien constant et leur présence.

Merci...!

I - INTRODUCTION

S. suis est un pathogène porcin important causant des méningites, des septicémies, de l'arthrite et des pneumonies. Jusqu'à ce jour, on dénombre 35 sérotypes de *S. suis* dont le sérotype 2 est le plus virulent et le plus prévalent (Higgins & Gottschalk, 2001). Ce microorganisme est aussi reconnu comme un agent de zoonose (Higgins & Gottschalk, 1999). Il a été isolé pour la première fois au Danemark lorsque deux cas de méningite et un cas de septicémie ont été rapportés (Jansen & van Dorsen, 1951). Depuis 1951, plus d'une centaine de cas d'infection à *S. suis* chez des humains ont été rapportés. Ce sont les personnes en contact avec les porcs ou les produits du porc qui sont le plus à risque de développer des infections à *S. suis* (Tarradas *et al.*, 2001). Ces infections se traduisent par des méningites, des septicémies et des endocardites (Higgins & Gottschalk, 1999). Les infections sont parfois mortelles mais lorsque la personne survit, elle demeure avec des séquelles temporaires (arthrite) ou permanentes (surdité) (Arends & Zanen, 1988; Walsh *et al.*, 1992).

La pathogénèse de la méningite causée par *S. suis* est très peu connue et est possiblement le résultat d'un processus complexe. Il est suggéré que la maladie causée par ce microorganisme commence par une colonisation des amygdales, puis d'une dispersion dans la muqueuse épithéliale du tractus respiratoire supérieur et d'une invasion dans la circulation sanguine ou lymphatique (Gottschalk & Segura, 2000). Le mécanisme utilisé par *S. suis* sérotype 2 pour accéder à la circulation sanguine n'est pas connu. Lorsque la bactérie se retrouve au niveau de la circulation sanguine, elle doit passer à travers ou entre les cellules formant la barrière hémato-méningée (BHM) afin de causer l'infection. La BHM est formée par la membrane arachnoïde, les cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux (BMEC) et le plexus choroïde. Cette barrière est caractérisée par la présence de jonctions serrées qui règlent les échanges de fluides et de macromolécules, de même que la circulation des cellules des deux côtés de la barrière (Huang & Jong, 2001; Tuomanen, 1996).

Le mécanisme utilisé par *S. suis* sérotype 2 pour franchir la BHM n'est pas connu. Très peu d'études portant sur les interactions entre *S. suis* et les cellules endothéliales sont disponibles. Les tests d'invasion démontrent que *S. suis* est capable d'adhérer aux BMEC mais pas de les envahir (Charland *et al.*, 2000). Cette adhérence aux BMEC peut avoir un rôle dans la pathogénèse de l'infection. En réponse à cette adhésion, il est

possible que la bactérie sécrète des médiateurs inflammatoires qui peuvent augmenter la perméabilité de la BHM.

Le but de ce projet de maîtrise est d'évaluer la capacité de *S. suis* sérotype 2 à induire la production de «tumor necrosis factor alpha» (TNF- α), d'interleukine- (IL) 1, d'IL-6, d'IL-8 et de «monocyte chemotactic protein-1» (MCP-1) par des BMEC. L'hypothèse proposée est que ces cytokines produites par les BMEC entraînent une augmentation de la perméabilité de la BHM permettant ainsi le passage de la bactérie jusqu'au niveau du SNC.

II - RECENSION DE LA LITTÉRATURE

1.0 *Streptococcus suis* - aspects généraux –

S. suis est un agent pathogène très répandu chez l'espèce porcine. Il a aussi été isolé à plusieurs reprises à partir de cas de méningite, de septicémie et d'endocardite chez des humains (Halaby *et al.*, 2000; Higgins & Gottschalk, 1989). Il existe actuellement 35 sérotypes de *S. suis* dont le sérotype 2 est reconnu comme le plus fréquent et le plus pathogène (Gottschalk & Segura, 2000).

1.1 La bactérie

S. suis est un coque Gram-positif, anaérobie facultatif, qui forme de minuscules colonies grises alpha-hémolytiques sur la majorité des milieux contenant du sang de diverses espèces animales (Higgins & Gottschalk, 1990; Kilpper-Balz & Schleifer, 1987). Un minimum de tests biochimiques est requis pour l'identification de cette bactérie. Un streptocoque alpha-hémolytique produisant de l'amylase mais pas d'acétoïne est considéré comme étant du *S. suis* (Devriese *et al.*, 1991). On retrouve cette bactérie au niveau du tractus respiratoire supérieur, plus particulièrement au niveau des amygdales et des cavités nasales, de même qu'au niveau du tractus alimentaire et génital du porc (Higgins & Gottschalk, 1999)

1.2 Les sérotypes

En 1963, de Moor isole des agents pathogènes chez des porcs malades. Ces streptocoques n'appartenant à aucun des groupes de Lancefield alors connus, il s'agissait, selon lui, de nouveaux groupes et il les désigne par les lettres R, S, RS et T (de Moor, 1963). Cependant, en 1966, Elliott *et al* démontrent que la bactérie possède de l'acide lipotéichoïque, qui est une caractéristique du groupe D de Lancefield. La bactérie étant capsulée, la capsule masquait la paroi typique du groupe D de Lancefield (Elliott, 1966). Windsor et Elliott (1975) désignent ces souches, selon leur composition, comme étant du *S. suis* sérotype 1, 2 et 1/2 (S, R et RS, respectivement) (Windsor & Elliott, 1975). Le groupe T est remplacé par le sérotype 15 plusieurs années plus tard (Gottschalk *et al.*, 1989).

Les différents sérotypes sont établis selon l'antigène capsulaire polysaccharidique que l'on retrouve chez la bactérie. Trois tests sont utilisés à cette fin : la coagglutination, la réaction capsulaire et la précipitation capsulaire (Higgins & Gottschalk, 1990). De nos jours, 35 sérotypes sont identifiés. Ces différents sérotypes ne sont pas retrouvés en proportion équivalente dans la population porcine. La majorité des souches pathogènes isolées des cas cliniques appartiennent aux sérotypes 2, 1/2, 3, 4, 6, 7, 8 et 9. Certains sérotypes tels 18, 19 et 21, sont retrouvés chez des animaux cliniquement sains (Higgins & Gottschalk, 2001). Cependant, le plus prévalent et le plus virulent est le sérotype 2 (Higgins & Gottschalk, 2001). Bien que le sérotype 1 affecte généralement les très jeunes porcelets (2 à 6 semaines d'âge), le sérotype 2 est associé aux infections des porcs de tous âges (Touil & Higgins, 1988).

Les souches de référence proviennent principalement de porcs malades. Cependant, les souches de référence des sérotypes 17, 18, 19 et 21 ont été isolées chez des porcs cliniquement sains alors que celles des sérotypes 20 et 31 proviennent de cas bovins. La souche de référence du sérotype 14 quant à elle a été isolée d'un cas humain et celle du sérotype 33 d'un cas ovin (Gottschalk *et al.*, 1989; Higgins *et al.*, 1995).

Kilpper-Balz et Schleifer (1987) démontrent, par des études d'homologie d'ADN, que *S. suis* appartient à une espèce génétiquement différente des autres membres du groupe D de Lancefield. Ce n'est donc qu'en 1987 que le nom de l'espèce *S. suis* est officialisé (Kilpper-Balz & Schleifer, 1987). En 1998, Chatelier *et al.* identifient une séquence d'ARN ribosomal 16S présente chez les souches de référence de *S. suis* sérotype 1 à 34 et 1/2. Cette analyse séquentielle des gènes d'ARN ribosomal 16S permet d'établir qu'il y a une forte similarité (94-100%) entre les souches de référence sauf en ce qui concerne les souches de référence des sérotypes 32, 33 et 34 qui sont distincts. Cette analyse phylogénétique permet de classer, grâce à un dendrogramme, tous les sérotypes de *S. suis* en un groupe majeur subdivisé en 3 sous-groupes. Ils concluent donc que *S. suis* est génétiquement distinct et n'a pas de relation phylogénique spécifique avec les autres espèces de streptocoque (Chatellier *et al.*, 1998). Durant cette même année, Rasmussen et Andersen séquencent l'ADN ribosomal 16S provenant des souches de référence de *S. suis* sérotypes 20, 22, 24, 25, 26 et 27 et

comparent leurs résultats avec les séquences d'ADN ribosomal 16S provenant des souches de référence des sérotypes 1 et 2 présents dans GenBank. L'alignement des séquences démontre que des sous-groupes peuvent être formés selon les variations observées. Basé sur ces sous-groupes, un arbre phylogénétique montrant les relations entre tous les sérotypes étudiés est construit (Rasmussen & Andersen, 1998). Les résultats de Rasmussen et Andersen confirment ceux obtenus par Chatellier *et al.* (Chatellier *et al.*, 1998).

Récemment, Brousseau *et al.* ont identifié une séquence génomique chaperonine 60 pour les 35 sérotypes des souches de référence de *S. suis*. L'arbre phylogénétique basé sur les gènes chaperonine 60 est similaire à celui obtenu avec les séquences d'ARN et d'ADN ribosomal 16S. Il est observé que les souches contenant des séquences de gènes chaperonine 60 identiques tendent à avoir des séquences d'ARN et ADN ribosomal 16S identiques. Les résultats obtenus avec les gènes chaperonine 60 supportent les découvertes précédentes concernant les sérotypes 32, 33 et 34 qui sont différents des autres sérotypes de *S. suis* (Brousseau *et al.*, 2001; Chatellier *et al.*, 1998; Rasmussen & Andresen, 1998). Cette étude de Brousseau *et al.* démontre que l'analyse de la région variable du gène chaperonine 60 procure une discrimination supérieure entre les souches fortement apparentées comparativement à l'analyse de l'ARN ou de l'ADN ribosomal 16S (Brousseau *et al.*, 2001).

1.3 Les infections causées par *S. suis*

Les premiers cas d'infections à *S. suis* ont été rapportés au début des années 1950 (Field *et al.*, 1954; Jansen & van Dorsen, 1951). Depuis, des cas d'infections à *S. suis* sont signalés dans tous les pays où l'industrie du porc est importante. Chez ces cas d'infections, le sérotype 2 est prédominant, indépendamment de l'origine géographique (Higgins & Gottschalk, 2001). Cependant, il est à noter que différentes souches de *S. suis* d'un même sérotype varient dans leur habileté à causer des méningites (Alexander, 1995).

S. suis semble présent chez la majorité des porcs qui peuvent être l'hôte d'un ou de plusieurs sérotypes et cela, sans démontrer de signes cliniques (Gottschalk *et al.*, 2001). Le pourcentage d'animaux porteurs sains par troupeau varie de 0 à 100% dépendamment des études effectuées (Dupas *et al.*, 1992). Chez ces porteurs sains, la bactérie se retrouve principalement au niveau des amygdales (Dupas *et al.*, 1992). Les porteurs sains peuvent être responsables de la transmission du microorganisme. De plus, la survie de *S. suis* dans l'environnement peut être de plusieurs jours. Des études démontrent qu'à des températures de 22-24°C, *S. suis* peut survivre jusqu'à 8 jours dans les fèces (Clifton-Hadley *et al.*, 1986). Dans les carcasses et la viande de porc, *S. suis* peut survivre jusqu'à 6 semaines à 4°C et 12 jours à 22-24°C (Clifton-Hadley *et al.*, 1986).

Les infections causées par *S. suis* touchent principalement les porcs entre 5 et 10 semaines d'âge et le premier signe clinique observé est une élévation de la température (Higgins & Gottschalk, 1999). Chez les porcs infectés par *S. suis*, on retrouve différents signes cliniques respiratoires et neurologiques. La toux est observée chez 25,4% des porcs infectés par *S. suis* sérotype 2 (Reams *et al.*, 1994). Des signes nerveux incluant l'incoordination locomotrice, le pédalage, le tremblement et les convulsions sont observés chez les porcs infectés par *S. suis* (Clifton-Hadley *et al.*, 1986). Les lésions cérébrales les plus couramment observées sont la méningite suppurative (57,7% des porcs infectés par *S. suis* sérotype 2) et/ou l'encéphalite suppurative (34,6% des porcs infectés par le sérotype 2) (Reams *et al.*, 1994). Cependant, dans certains cas, la mort survient très rapidement sans signes prémonitoires (Dupas *et al.*, 1992).

S. suis n'affecte pas seulement le porc. La bactérie a été isolée chez diverses espèces animales dont des ruminants, des chevaux, des chats, des chiens et même des oiseaux (Christley *et al.*, 2001; Devriese *et al.*, 1992; Devriese *et al.*, 1994; Hommez *et al.*, 1988). *S. suis* a aussi été isolé à plusieurs reprises chez des humains (Dupas *et al.*, 1992; Halaby *et al.*, 2000; Higgins & Gottschalk, 1989; Higgins & Gottschalk, 1999; Tarradas *et al.*, 2001b). Ce sont les personnes en contact avec les porcs ou les produits du porc qui sont le plus à risque de développer des infections à *S. suis* (Tarradas *et al.*, 2001b). Ces infections se traduisent par des méningites, des septicémies et des endocardites (Higgins & Gottschalk, 1999). Les infections sont parfois mortelles mais

lorsque la personne survit, elle demeure avec des séquelles temporaires (arthrite) ou permanentes (surdité) (Arends & Zanen, 1988; Walsh *et al.*, 1992).

2.0 Facteurs de virulence

Plusieurs facteurs de virulence sont proposés pour *S. suis*. La capsule polysaccharidique est le seul facteur qui a pu être directement associé à la virulence. Cependant, des protéines telles la «Muramidase-released protein» (MRP) et l'«Extracellular factor» (EF), la suilysine et certaines adhésines, sont aussi des facteurs de virulence potentiels (Gottschalk *et al.*, 2001).

2.1 Capsule

La capsule polysaccharidique de *S. suis* sérotype 2 est le seul facteur pouvant être directement associé à la virulence. Cependant, ce n'est pas le seul facteur impliqué dans la virulence de ce microorganisme.

Cette capsule est composée de différents sucres et d'acide sialique (Charland *et al.*, 1996). L'acide sialique est retrouvé chez plusieurs espèces bactériennes très pathogènes causant des méningites tels les streptocoques du groupe B (GBS) (Wessels *et al.*, 1989). Chez GBS, ce constituant joue un rôle anti-phagocytaire par l'inactivation de la voie alternative du complément (Kazatchkine *et al.*, 1979). Des études démontrent qu'une baisse significative de la virulence est obtenue lorsque l'acide sialique de la capsule de GBS est éliminé (Shigeoka *et al.*, 1983). Même si la composition chimique de la capsule de *S. suis* sérotype 2 ressemble à la capsule de GBS, l'acide sialique capsulaire ne semble pas influencer la virulence de *S. suis* puisqu'une concentration similaire de cette composante est retrouvée chez les souches virulentes et non-virulentes (Charland *et al.*, 1996).

À partir d'une souche virulente de *S. suis* sérotype 2, Gottschalk *et al.* ont produit 2 mutants par passages successifs dans un milieu contenant des anticorps anti-capsulaires. Ces deux mutants sont déficients d'une protéine de 44 kDa présente chez la

souche-mère. Le mutant M2 est non-capsulé alors que le mutant M42 possède une capsule incomplète. Cependant, M2 et M42 sont non-virulents chez la souris. Des études de protection effectuées à l'aide de ces mutants démontrent que des anticorps dirigés contre la capsule et contre la protéine de 44 kDa sont essentiels afin d'assurer une protection complète chez la souris (Gottschalk *et al.*, 1992).

En 1998, Charland *et al.* obtiennent à partir de la souche de référence, deux mutants non-capsulés (2A et 79) par mutagenèse à l'aide du transposon Tn916. Une virulence 100 fois inférieure à celle de la souche sauvage est observée. Les travaux démontrent que la souche-mère peut être isolée à partir de plusieurs organes de porcs infectés alors que les mutants sont rapidement éliminés de la circulation. Ces résultats indiquent que la capsule polysaccharidique peut contribuer à la dissémination de la bactérie, de même qu'à sa survie (Charland *et al.*, 1998).

Les études de phagocytose réalisées par Segura *et al.* démontrent que la souche de référence du sérotype 2 n'est pratiquement pas phagocytée par les macrophages murins même après un temps d'incubation de 90 minutes, alors que le mutant non-capsulé 2A (Charland *et al.*, 1998) est très phagocyté (Segura *et al.*, 1998). Par contre, Busque *et al.* observent un niveau de phagocytose élevé pour la souche capsulée et virulente S735 de sérotype 2. Cette étude démontre que la souche S735 est phagocytée à 61% par des monocytes porcins et à 82% par des monocytes humains (Busque *et al.*, 1998).

Smith *et al.* (1999) identifient et caractérisent un fragment d'ADN de 16 Kb contenant la majeure partie des déterminants génétiques impliqués dans la synthèse des polysaccharides de capsule de *S. suis* sérotype 2. En se basant sur les séquences déjà établies, ils identifient 14 cadres de lecture (ORFs) désignés par Orf2z, Orf2y, Orf2x et cps2A à cps2K. Douze de ces ORFs appartiennent à la même unité transcriptionnelle et onze de ces Orfs produisent des protéines démontrant des similarités avec des protéines impliquées dans la synthèse de polysaccharide de microorganismes Gram-positif autre que *S. suis*. Afin d'étudier le rôle de la capsule dans la résistance à la phagocytose ainsi que dans la virulence, ils génèrent deux mutants isogéniques dans lesquels la synthèse de la capsule est interrompue. Dans l'un des mutants (10cpsΔB), le gène cps2B est inactivé par l'insertion d'un gène de résistance antibiotique et dans l'autre (10cpsΔEF), une

partie des gènes *cps2E* et *cps2F* est remplacée par un gène de résistance antibiotique. L'absence de capsule chez les deux mutants est confirmée par microscopie électronique (Smith *et al.*, 1999). Dans un premier temps, la résistance à la phagocytose est testée. Les résultats démontrent que la souche sauvage est résistante à la phagocytose. Par contre, plus de 99% des mutants non-capsulés sont ingérés par des macrophages porcins après 90 minutes d'exposition. De plus, 90 à 98% des mutants ingérés sont tués en 90 minutes. Dans un deuxième temps, les propriétés de virulence de la souche-mère ainsi que celles des mutants *10cpsΔB* et *10cpsΔEF* sont étudiées. Ils ont effectué des infections expérimentales sur des porcelets nouveaux-nés libres de pathogènes. Tous les porcelets inoculés avec la souche-mère sont morts au cours de l'expérience, ou ont été euthanasiés dû à la présence de sérieux signes cliniques. Par contre, les porcs inoculés avec les mutants non-capsulés n'ont démontré aucun signe de maladie et ils ont tous survécu jusqu'à la fin des expériences (Smith *et al.*, 1999). Ces résultats confirment les études effectuées par Charland *et al.* et Segura *et al.* concernant le rôle de la capsule dans la protection contre la phagocytose et dans les propriétés de virulence de *S. suis* sérotype 2 (Charland *et al.*, 1996; Segura *et al.*, 1998).

2.2 Protéines « Muramidase-Released Protein » (MRP) et « Extracellular Factor » (EF)

La MRP est une protéine de paroi que l'on retrouve dans le surnageant après un traitement de la bactérie avec de la muramidase. EF est une protéine que l'on retrouve uniquement dans le surnageant. Ces deux protéines sont des marqueurs de virulence chez les souches européennes qui possèdent un profil MRP⁺ et EF⁺. Cependant, la majorité des souches virulentes nord-américaines ne les possèdent pas. De plus, des études démontrent qu'un mutant MRP⁻ et EF⁻ demeure virulent (Smith *et al.*, 2001). Cela indique que ces protéines ne sont pas associées à la virulence ou encore que d'autres facteurs peuvent compenser. Il existe des variantes de ces deux protéines, soit, un EF* de plus haut poids moléculaire que l'on retrouve plus particulièrement chez des souches humaines de même que chez des souches non-virulentes d'origine porcine, une MRP* de poids moléculaire plus élevé, isolée de cas de pneumonie porcine, et

finalement une MRP de poids moléculaire plus bas, retrouvée chez des souches canadiennes et européennes (Vecht *et al.*, 1991; Vecht *et al.*, 1996).

Récemment, Wisselink *et al.* ont créé un vaccin combinant les protéines EF et MRP dans un adjuvant de type «émulsion eau dans huile» (WO). Leurs résultats démontrent que le vaccin MRP+EF/WO a un effet protecteur plus élevé qu'un vaccin contenant seulement l'une des deux protéines ou qu'un vaccin contenant du *S. suis* sérotype 2 (ayant un profil MRP(+) EF(+)) tué à la formaline. Tous sauf un des porcs vaccinés avec le vaccin MRP+EF/WO ont survécu aux infections expérimentales avec du *S. suis* sérotype 2 de phénotype MRP(+) EF(+) (Wisselink *et al.*, 2001). Cependant, comme la majorité des souches nord-américaines ne possèdent pas ces marqueurs de virulence, ce vaccin ne pourrait pas prévenir les infections dues à *S. suis* dans certains pays, principalement en Amérique du Nord.

2.3 Hémolysine -Suilysine-

Les hémolysines sont souvent impliquées comme facteur de virulence dans plusieurs types d'infection dont celles causées par *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Pasterella haemolytica* et *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Jacobs *et al.*, 1994). Plusieurs souches de *S. suis* produisent une hémolysine. Cette hémolysine, nommée suilysine, a été identifiée, purifiée et caractérisée (Gottschalk *et al.*, 1995b; Jacobs *et al.*, 1994). De poids moléculaire variant de 54 kDa (Jacobs *et al.*, 1994) à 65 kDa (Gottschalk *et al.*, 1995b) selon les méthodes de purification, la suilysine cause la lyse d'érythrocytes de plusieurs espèces animales. Sa partie N-terminale a été séquencée et l'alignement de cette séquence avec celles de streptolysine O, de listeriolysine O, d'alvéolysine et de pneumolysin révèle plusieurs similarités (Jacobs *et al.*, 1994). L'hémolysine de *S. suis* fait partie de la famille des toxines activées au thiol, aussi connues sous le nom de toxines cytolitiques liant le cholestérol (Gottschalk *et al.*, 1995b; Jacobs *et al.*, 1994). Ces toxines sont reliées antigénétiquement (Jacobs *et al.*, 1994). Cette famille de toxines a pour caractéristique d'être sensible à des agents oxydants, activée par des agents réducteurs et inhibée par une faible concentration de cholestérol (Gottschalk *et al.*, 1995b; Jacobs *et al.*, 1994). Le

mécanisme d'action de la suilysine est de former des pores transmembranaires d'environ 7nm de diamètre sur la cellule touchée (Gottschalk *et al.*, 1995b).

Gottschalk *et al.* ont testé l'effet de plusieurs traitements sur l'activité hémolytique de la suilysine. Leurs résultats démontrent que la température affecte l'activité hémolytique de la suilysine. L'incubation du surnageant à 60°C pour une heure ou à 100°C pour 30 minutes abolit complètement l'activité de la suilysine. L'activité hémolytique est aussi complètement abolie par l'ajout de protéinase K alors que l'ajout de CaCl₂, de MgCl₂, de ZnCl₂ ou de EGTA ne l'influence pas. Le cholestérol inhibe entièrement l'activité de la suilysine. Le traitement du surnageant avec de l'oxygène réduit l'action de cette hémolysine qui peut être restaurée par l'ajout de DTT. Les résultats obtenus lors de changement de pH démontrent que l'activité hémolytique est présente à un pH situé entre 4 et 8 (Gottschalk *et al.*, 1995b).

En 1998, Segers *et al.* clonent le gène *sly* codant pour la suilysine à partir de la souche p1/7 de *S. suis* sérotype 2. Leurs analyses confirment l'appartenance de la suilysine au groupe des toxines activées au thiol (Segers *et al.*, 1998). Leurs résultats démontrent aussi que c'est avec la pneumolysine de *S. pneumoniae* que la suilysine est la plus phylogénétiquement reliée et a le plus de séquences d'acides aminés identiques. Cependant, elle comporte aussi des différences majeures. La pneumolysine est une protéine intracellulaire alors que la suilysine est extracellulaire (Segers *et al.*, 1998).

Afin de déterminer le rôle de la suilysine dans la pathogénèse des souches européennes de *S. suis* sérotype 2, Allen *et al.* ont récemment généré et caractérisé un mutant (S7c) obtenu par un remplacement allélique du gène *sly* et ils ont comparé ce mutant avec la souche-mère. Contrairement à la souche-mère, le mutant est non-hémolytique, non-cytolytique pour les monocytes en culture, avirulent dans un modèle murin d'infection mais seulement légèrement atténué dans un modèle porcin d'infection systémique. Ces expériences démontrent qu'une fois parvenue dans la circulation, la suilysine n'est pas nécessaire à l'apparition des signes cliniques. Allen *et al.* attribuent plutôt un rôle à la suilysine dans l'augmentation de la gravité des signes cliniques et dans l'augmentation de la capacité à coloniser les organes. Leurs résultats indiquent

aussi que la suilysine n'est pas nécessaire à une infection des méninges (Allen *et al.*, 2001).

À ce jour, l'importance de la suilysine en tant que facteur de virulence n'est pas confirmée. Les études de Segers *et al.* démontrent que seulement 63% des isolats de *S. suis* sérotype 2 provenant de cas cliniques expriment la suilysine (Segers *et al.*, 1998). De plus, le gène *sly* est retrouvé chez 95% des souches européennes de *S. suis* sérotype 2 mais seulement chez 7% des souches nord-américaines (Segers *et al.*, 1998).

Berthelot-Hérault *et al.* ont étudié la production des protéines EF, MRP ainsi que de la suilysine par des souches de *S. suis* collectées en France chez des porcs malades et chez des porcs cliniquement sains. Leurs résultats démontrent que la majorité des souches de sérotype 2 isolées de cas cliniques présentent les phénotypes MRP(+) EF(-) Hém(-) (46%) et MRP(+) EF(+) Hém(+) (28%). Le phénotype MRP(+) EF(-) Hém(-) est retrouvé chez 67% des souches de *S. suis* sérotype 2 provenant d'isolats de porcs cliniquement sains. Leurs résultats suggèrent donc que les protéines MRP, EF et la suilysine ne sont pas suffisantes pour expliquer la virulence des souches françaises de *S. suis* (Berthelot-Hérault *et al.*, 2000). Récemment, Tarradas *et al.* ont étudié la production de protéines MRP, EF et de suilysine par des souches espagnoles de *S. suis* de différents sérotypes isolées de porcs malades et cliniquement sains. Leurs résultats démontrent que 47% des souches de *S. suis* provenant de cas cliniques produisent de la suilysine. La fréquence de production de suilysine par les souches isolées chez des porcs malades est approximativement le double de celle des souches isolées chez des porcs cliniquement sains. De plus, les résultats de cette étude démontrent que les souches isolées de porcs cliniquement sains ont une plus faible capacité à exprimer les protéines MRP et EF (Tarradas *et al.*, 2001a). Cependant, leurs résultats, comme ceux de Berthelot-Hérault *et al.*, suggèrent que la production de protéines MRP, EF et de suilysine n'est pas suffisante pour expliquer la virulence des souches espagnoles de *S. suis*.

2.4 Adhésines

Les adhésines ont été l'un des premiers facteurs de virulence proposés pour *S. suis*, puisque celles-ci permettent l'adhérence de la bactérie aux cellules de l'hôte. En 1996, une adhésine est identifiée, purifiée, caractérisée et nommée adhésine P (Tikkanen *et al.*, 1996). Chez *S. suis*, les adhésines sont responsables de l'héماغlutination spécifique à certains sucres. Cette propriété d'héماغlutination est attribuée à l'adhérence spécifique au Gal α 1-4 Gal qui est présent dans les glycoprotéines servant d'antigène au groupe sanguin P (Haataja *et al.*, 1993). Certaines adhésines sont sensibles à la trypsine et reconnaissent le galactose et/ou le N-acétylgalactosamine, alors que d'autres reconnaissent l'acide sialique. Cependant, comme l'héماغlutination est variable d'un sérotype à l'autre et à l'intérieur d'un même sérotype, et qu'il n'y a pas de corrélation entre l'héماغlutination, l'origine des souches ou la virulence, les adhésines ne sont pas un facteur de virulence reconnu pour *S. suis*.

Chez les souches de *S. suis* sérotype 2, autant virulentes que non-virulentes, Quessy *et al.* (1997) découvrent la présence d'une protéine de 39 kDa liant l'albumine. Cette protéine possède une forte homologie avec une protéine de *Streptococcus pyogenes* (SDH) qui semble être impliquée dans la colonisation de cette bactérie (Quessy *et al.*, 1997). Afin de déterminer le rôle de cette protéine dans l'adhésion de *S. suis*, Brassard *et al.* (2001) génèrent, par mutation à l'aide du transposon Tn916, trois souches mutantes de *S. suis* n'exprimant pas la protéine de 39 kDa. Ces trois mutants (m17, m20 et m59) sont utilisés pour effectuer des tests d'adhésion cellulaire sur des cellules embryonnaires de trachée bovine et sur des anneaux de trachée porcine. Les trois mutants démontrent une diminution significative d'adhérence lors des tests d'adhésion lorsqu'ils sont comparés avec la souche parentale. Les résultats obtenus suggèrent que la protéine liant l'albumine est impliquée dans les premières étapes de l'infection lors de l'adhésion de *S. suis* au niveau du tractus respiratoire supérieur (Brassard *et al.*, 2001). De plus, une protéine de stress liant les IgG a été identifiée chez *S. suis*. Cette protéine pourrait avoir un rôle dans la pathogénèse de l'infection causée par *S. suis* (Benkirane *et al.*, 1997).

3.0 Pathogénèse de l'infection à *S. suis*

La pathogénèse de la méningite causée par *S. suis* est très peu connue et est possiblement le résultat d'un processus complexe. Il est suggéré que la maladie causée par ce microorganisme commence par une colonisation des amygdales, suivie d'une dispersion dans la muqueuse épithéliale du tractus respiratoire supérieur et d'une invasion dans la circulation sanguine ou lymphatique (Gottschalk & Segura, 2000). Seulement quelques études concernant les interactions entre *S. suis* et les cellules épithéliales sont disponibles. Northon *et al.* rapportent que les souches virulentes de *S. suis* peuvent, dans certaines conditions, envahir une lignée cellulaire d'origine humaine (Norton *et al.*, 1999). D'un autre côté, Lalonde *et al.* ne démontrent aucune invasion de *S. suis* et cela, en utilisant différentes lignées cellulaires d'origine humaine ou porcine (Lalonde *et al.*, 2000). Cependant, la cytotoxicité de la suilysine est démontrée dans les deux études. Un taux relativement élevé d'adhérence est observé pour différentes souches et différentes lignées cellulaires testées par Lalonde *et al.* (Lalonde *et al.*, 2000). Le mécanisme utilisé par *S. suis* sérotype 2 pour accéder à la circulation sanguine n'est pas connu. Lorsque la bactérie se retrouve au niveau de la circulation sanguine, elle doit passer à travers ou entre les cellules formant la barrière hémato-méningée (BHM) afin de causer l'infection. La BHM est formée par la membrane arachnoïde, les cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux (BMEC) et le plexus choroïde. Cette barrière est caractérisée par la présence de jonctions serrées qui règlent les échanges de fluides et de macromolécules, de même que la circulation des cellules des deux côtés de la barrière (Huang & Jong, 2001; Tuomanen, 1996).

Plusieurs mécanismes peuvent permettre à une bactérie de passer la BHM et d'atteindre le système nerveux central (SNC). La majorité des pathogènes bactériens causant des méningites tels *S. pneumoniae*, *E. coli* et GBS, sont connus pour interagir directement (bactéries libres) avec les cellules de la BHM (Tuomanen, 1996). Il est aussi généralement accepté que les interactions bactéries-cellules endothéliales sont principalement caractérisées par l'adhésion spécifique de la bactérie avec comme conséquences l'invasion, la toxicité et/ou l'augmentation de la perméabilité. Par exemple, lors de l'adhésion de GBS à la surface des cellules endothéliales de la BHM, il

y a création de vacuoles qui permettent le transport de la bactérie dans le cytoplasme (Nizet *et al.*, 1997). L'adhésion de *Haemophilus influenzae* à la surface de ces mêmes cellules entraîne une augmentation de la perméabilité de la BHM permettant le passage de la bactérie au niveau des jonctions serrées (Tuomanen, 1996). De plus, l'adhésion de *L. monocytogenes* (Drevets, 1998; Drevets *et al.*, 1995), de *S. pneumoniae* (Cundell *et al.*, 1995b; Cundell *et al.*, 1996), ou de GBS (Nizet *et al.*, 1997) aux cellules endothéliales constituant la BHM entraîne la destruction de ces cellules par des hémolysines produites par les bactéries.

Mais encore une fois, le nombre d'études portant sur les interactions entre les BMEC et *S. suis* est très limité. Contrairement aux autres pathogènes causant la méningite, les tests d'invasion démontrent que *S. suis* est capable d'adhérer aux BMEC mais pas de les envahir (Charland *et al.*, 2000). Cette adhérence aux BMEC peut avoir un rôle dans la pathogénèse de l'infection. En réponse à cette adhésion, il est possible que la bactérie sécrète des facteurs toxiques qui peuvent augmenter la perméabilité de la BHM. Pour les souches qui produisent la suilysine, l'hémolysine peut endommager les cellules de la BHM et augmenter la perméabilité de cette dernière (Charland *et al.*, 2000).

Un pathogène bactérien peut aussi traverser la BHM associé aux leukocytes ou bien à l'intérieur de ces derniers (Tuomanen, 1996). Cette hypothèse est suggérée pour *S. suis*. Une première théorie, la théorie du cheval de Troie, suggère que la bactérie soit transportée par les monocytes de façon intracellulaire jusqu'au SNC (Williams & Blakemore, 1990a). Cependant, un nombre très faible de monocytes contenant des bactéries est retrouvé lors d'une bactériémie due à *S. suis*. En fait, Williams et Blackemore ont retrouvé moins de 2% de monocytes contenant des bactéries lors d'une bactériémie due à *S. suis* (Williams & Blakemore, 1990b). Une variante de cette théorie suggère que la bactérie soit très fortement associée à la surface du monocyte et transportée ainsi jusqu'au niveau du SNC, puisqu'un taux relativement élevé d'adhésion de *S. suis* aux cellules phagocytaires (sans phagocytose) est observé (Segura *et al.*, 1998). Une troisième théorie suggère que la bactérie voyage librement (Gottschalk & Segura, 2000).

Tel que mentionné à la section 2.1, quelques études sur la phagocytose de *S. suis* ont été effectuées. Les études de Busque *et al.* réalisées à l'aide de la cytométrie en flux indiquent que la souche de référence de *S. suis* sérotype 2 est retrouvée chez 98% des phagocytes humains et chez 82% des monocytes humains. Par cette même technique, *S. suis* est retrouvé chez 82% des granulocytes porcins et chez 61% des monocytes porcins (Busque *et al.*, 1998). Par ailleurs, les études de phagocytose utilisant diverses techniques de coloration démontrent un pourcentage de phagocytose variant de 7 à 30% (Brazeau *et al.*, 1996; Charland *et al.*, 1996; Williams & Blakemore, 1990a). La variabilité des résultats est probablement due aux différentes techniques utilisées. De plus, les études de Segura *et al.* réalisées par la technique de compte viable ne démontrent pas de phagocytose (Segura *et al.*). Cependant, comme déjà mentionné, un niveau relativement élevé d'adhésion de *S. suis* aux macrophages (sans phagocytose) est observé (Gottschalk & Segura, 2000). Cette forte adhésion aux macrophages appuie la théorie du cheval de Troie modifiée. Cette adhésion pourrait aussi influencer la perméabilité de la BHM par la production de cytokines pro-inflammatoires et de chémokines (Gottschalk & Segura, 2000; Segura *et al.*, 1998).

4.0 Interactions entre d'autres agents bactériens Gram-positif causant des méningites et les cellules de l'hôte

4.1 *S. pneumoniae*

Depuis l'arrivée du vaccin contre *H. influenzae*, *S. pneumoniae* est le pathogène le plus commun causant des méningites chez l'adulte. Pour causer une méningite, *S. pneumoniae* doit coloniser les muqueuses épithéliales du nasopharynx de l'hôte, entrer et survivre dans le système vasculaire, traverser la BHM et se multiplier dans le liquide céphalo-rachidien (LCR). Cela implique que la bactérie est capable d'échapper aux multiples mécanismes de défense de l'hôte (Spellerberg & Tuomanen, 1994). Le site primaire de colonisation est la muqueuse épithéliale. Pour échapper aux IgA sécrétées par les cellules plasmatiques, la bactérie sécrète des protéases qui clivent la région riche en proline des IgA, ce qui les rend non-fonctionnelles (Quadriarello & W.M., 1992). L'adhérence de *S. pneumoniae* aux cellules du tractus respiratoire supérieur est

dépendante de la présence de N-acétylglucosamine β 1-4 galactose ou de N-acétylgalactosamine β 1-4 galactose se trouvant sur les cellules épithéliales nasopharyngées et pulmonaires (Spellerberg & Tuomanen, 1994). Le mécanisme par lequel le pathogène passe de la muqueuse à la circulation sanguine n'est pas bien connu. La bactérie peut pénétrer à travers ou entre les cellules épithéliales. Une fois la bactérie entrée au niveau du système vasculaire, elle échappe à la cascade du complément grâce à la présence de sa capsule polysaccharidique. Une des fonctions majeures de la capsule est la prévention de la phagocytose par les polymorphonucléaires. À ce stade, *S. pneumoniae* doit pénétrer la BHM afin d'induire une méningite (Ring *et al.*, 1998). Pour ce faire, *S. pneumoniae* peut interagir directement avec les cellules de la BHM. *S. pneumoniae* possède une hémolysine appelée pneumolysine qui active directement le complément et est toxique pour plusieurs types de cellules (Rubins *et al.*, 1992).

Le « platelet activating factor » (PAF) est une cytokine produite par les macrophages, les neutrophiles et les cellules endothéliales en réponse à un dommage cellulaire. Lorsque le PAF est lié à son récepteur, il assure la perméabilité de la BHM. C'est l'activité inflammatoire (cytokines) des cellules humaines (macrophages, neutrophiles, cellules endothéliales) qui entraîne l'expression des récepteurs PAF à la surface des cellules endothéliales. Cependant, la structure de la paroi cellulaire de *S. pneumoniae* et celle de PAF ont plusieurs composantes communes (déterminants de bioréactivité). L'attachement de la phosphorylcholine de *S. pneumoniae* aux récepteurs PAF fait augmenter l'adhérence de la bactérie, laquelle est complétée par l'invasion des cellules endothéliales de la BHM de l'hôte. Il est à noter que seules les souches virulentes de *S. pneumoniae* induisent les récepteurs PAF (Cundell *et al.*, 1995b; Cundell *et al.*, 1996; Quadriarello & W.M., 1992).

Des expériences démontrent que l'activation des cellules endothéliales avec de la thrombine ou du « Tumor Necrosis Factor- α » (TNF- α) cause une augmentation de l'invasion de *S. pneumoniae* de 20 à 40 fois (Cundell & Tuomanen, 1994). Des études démontrent aussi que l'adhérence de *S. pneumoniae* aux cellules endothéliales est augmentée de 81%, de 190% et de 90% lorsque les cellules sont activées avec de la thrombine, du TNF- α et de l'Interleukine-1 (IL-1), respectivement (Cundell &

Tuomanen, 1994). Une fois pénétré dans le LCR, *S. pneumoniae* induit la production locale de cytokines qui participent au recrutement des leukocytes au niveau du LCR (Cundell *et al.*, 1995a).

4.2 *Streptococcus* du groupe B (GBS)

GBS est la cause la plus commune de méningite chez le nouveau-né, et les enfants qui survivent à l'infection peuvent présenter des séquelles majeures tels des retards mentaux, de la quadraplégie, de l'hydrocéphalie, des dysfonctions hypothalamiques et de la surdité (Chin & Fitzhardinge, 1985). La première voie d'entrée pour GBS chez le fœtus est au niveau des poumons lors d'aspiration de liquide amniotique infecté (Rubins *et al.*, 1992). Par la suite la bactérie peut entrer dans la circulation sanguine et se disséminer dans le corps de l'hôte. Pour causer la pathogénèse de la méningite, GBS doit être capable de franchir la BHM. Pour ce faire, la bactérie s'attache à la membrane des cellules endothéliales constituant la BHM. Suite à cette adhésion, il y a création de vacuoles qui permettent le transport de GBS jusqu'à la membrane basale de l'espace subarachnoïde où il y a exocytose (Nizet *et al.*, 1997). GBS sécrète aussi de la β -hémolysine qui peut endommager significativement les cellules endothéliales et contribuer à augmenter la perméabilité de la BHM. Récemment, Pritzlaff *et al.* ont étudié l'activité β -hémolytique/cytolytique de GBS. Afin de déterminer le locus codant pour cette activité β -hémolytique/cytolytique, ils ont généré des mutants à partir de trois souches sauvages de GBS dans lesquelles ils ont effectué une insertion au niveau du gène *cylB*, *cylE*, *cylF* ou *cylH*. Les mutants ayant une insertion au niveau du gène *cylB*, *cylF* ou *cylH* conservent leur activité β -hémolytique/cytolytique alors que ceux ayant une insertion au niveau du gène *cylE* sont non-hémolytiques et non-cytolytiques. L'hypothèse que le gène *cylE* est le gène responsable de l'expression de la β -hémolysine/cytolysine de GBS est émise (Pritzlaff *et al.*, 2001). L'invasion des BMEC par GBS est donc la première étape de la méningite chez le nouveau-né, permettant à la bactérie circulante d'accéder au SNC par transcytose ou par endommagement des cellules endothéliales de la BHM. Suite à l'entrée de la bactérie au niveau du SNC, il y a une production locale de cytokines pro-inflammatoires promouvant la migration des

leukocytes et entraînant le développement d'exsudat inflammatoire, l'augmentation de la pression intracrânienne et l'augmentation de l'afflux sanguin (Nizet *et al.*, 1997).

4.3 *L. monocytogenes*

L. monocytogenes est un bâtonnet Gram-positif, intracellulaire facultatif, qui accède au cytoplasme des cellules de l'hôte grâce à sa cytolysine appelée listériolysine O, formant des pores transmembranaires. Une fois à l'intérieur des cellules de l'hôte, il y a une multiplication intracytoplasmique de la bactérie, accompagnée d'un recrutement des filaments d'actine et d'une dispersion cellule-à-cellule. Le résultat final d'une infection à *L. monocytogenes* chez l'humain est une méningite ou une méningo-encéphalite, ce qui suggère que la bactérie soit capable de traverser la BHM (Das *et al.*, 2001; Greiffenberg *et al.*, 2000). Lors du passage à travers la BHM, la bactérie interagit entre autres, avec les cellules endothéliales. En 1997, Greiffenberg *et al.* utilisent des cellules endothéliales ombilicales d'origine humaine (HUVEC) fraîchement isolées pour mettre au point un modèle d'interaction *Listeria*-cellules endothéliales. Ils confirment la capacité de *L. monocytogenes* à envahir les HUVEC et démontrent l'importance des microfilaments d'actine dans l'invasion par la bactérie (Greiffenberg *et al.*, 1997).

Il a récemment été démontré que *L. monocytogenes* est capable d'envahir les HUVEC par deux mécanismes différents. La bactérie peut infecter directement les HUVEC ou entrer dans la cellule par un mécanisme hétérogène de dispersion cellule-à-cellule à partir des macrophages infectés aux cellules endothéliales (Drevets, 1998; Drevets *et al.*, 1995).

Le rôle joué par les macrophages dans l'invasion du SNC par *L. monocytogenes* et dans la dissémination de la bactérie a été établi. Chez des souris souffrant de bactériémie due à *L. monocytogenes*, environ 30% des bactéries sont associées aux leukocytes. La microscopie démontrent que 22,2% des monocytes et que 1,6% des neutrophiles du sang prélevé chez ces souris, étaient infectés par *L. monocytogenes*. Les cellules

phagocytaires semblent donc faciliter l'invasion de la bactérie au niveau du SNC (Drevets, 1999).

Les infections à *L. monocytogenes* entraînent plusieurs altérations du métabolisme cellulaire de l'hôte incluant la production de cytokines pro-inflammatoires, l'activation de la transcription de certains facteurs, la stimulation de la synthèse de médiateurs lipidiques, l'induction de l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules comme P-sélectine, E-sélectine, ICAM-1 et VCAM-1 (Drevets, 1998). Par exemple, la capacité de *L. monocytogenes* ainsi que de la listériolysine à induire le relâchement d'IL-6 et d'IL-8 par les cellules endothéliales de l'hôte a été démontré récemment (Rose *et al.*, 2001).

5.0 Cytokines pro-inflammatoires – aspects généraux –

Les cellules du système immunitaire sécrètent une variété de glycoprotéines qui régulent les réponses immunitaires. Le terme générique pour désigner ces protéines régulatrices est cytokine (Tizard, 1995). Le système immunitaire produit donc des cytokines et d'autres facteurs humoraux pour protéger l'hôte lors d'inflammation, d'invasion microbienne ou de blessures (Cerami, 1992). Dans la majorité des cas, ce réseau complexe de défense réussit à restaurer l'homéostasie mais parfois, la surproduction de médiateurs immunorégulateurs peut causer des détériorations chez l'hôte (Cerami, 1992).

Les cytokines agissent de façon autocrine et/ou paracrine sur les cellules. Cependant, elles peuvent aussi agir comme signal endocrine. Une cytokine peut avoir de multiples fonctions immunologiques et ces fonctions peuvent mimer en partie d'autres cytokines. Il est aussi à noter que les interactions cytokine-cytokine peuvent résulter en un effet additif, antagoniste ou synergique dans le maintien des fonctions physiologiques telles que la faim, la température corporelle et le sommeil de même que l'anorexie et les manifestations neurologiques lors de maladies aiguës ou chroniques (Turrin & Plata-Salaman, 2000).

Le TNF- α et l'IL-1 sont sécrétés très rapidement en réponse à un stimulus inflammatoire. L'initiation de l'inflammation lors de méningite par la modulation de la BHM est attribuée à ces deux cytokines pro-inflammatoires. Le TNF- α et l'IL-1 induisent l'expression de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales de la BHM facilitant ainsi l'invasion du SNC par les pathogènes bactériens. L'IL-6 est aussi une cytokine pro-inflammatoire produite très rapidement lors d'inflammation. L'IL-6 joue un rôle essentiel dans les mécanismes de défense de l'hôte autant par la maturation et l'activation des leucocytes que par la production d'immunoglobulines et de cytokines pro-inflammatoires (Curfs *et al.*, 1997). Comme mentionné à la section 5.4, plusieurs études ont été effectuées concernant la capacité de certaines bactéries à induire la production de ces cytokines pro-inflammatoires par les monocytes, les macrophages, les astrocytes de même que les cellules endothéliales.

5.1 « Tumor Necrosis Factor- α » (TNF- α)

TNF- α est un important médiateur paracrine et autocrine de l'inflammation et des fonctions immunes. Il est sécrété très rapidement et de façon prédominante par les monocytes en réponse à des stimuli inflammatoires tels que le lipopolysaccharide (LPS) et autres produits bactériens, les virus, les cytokines, les complexes immuns, les champignons et les mycoplasmes. La résistance aux infections est dépendante du TNF- α mais, d'un autre côté, le TNF- α est aussi impliqué dans la pathogénèse de certaines maladies, puisqu'une production excessive peut causer des réactions inflammatoires et des dommages tissulaires. Le TNF- α est responsable de la fièvre et des symptômes de choc toxique. Il active aussi plusieurs types de cellules : macrophages, lymphocytes, neutrophiles, éosinophiles et cellules endothéliales. De plus, le TNF- α induit la production d'IL-6 et d'IL-1 et l'expression de molécules d'adhésion (VCAM-1 et E-sélectine) (Curfs *et al.*, 1997).

5.2 Interleukine -1 (IL-1)

L'IL-1 est l'activateur majeur des lymphocytes. Il est produit très rapidement lors d'inflammation. L'IL-1 augmente la production de lymphocytes B et la production

d'immunoglobulines. En synergie avec l'IL-2 et l'Interféron- γ (IFN- γ), l'IL-1 active les lymphocytes B, les lymphocytes T et les cellules «Natural Killer» (NK). L'IL-1 stimule aussi la production de d'autres cytokines pro-inflammatoires tels que le TNF- α et l'IL-6 de même que la production de facteurs de croissance. De plus, il active l'expression d'ICAM, de VCAM et de E-sélectine sur les cellules endothéliales et par le fait même, stimule l'adhérence des leucocytes à leur surface (Curfs *et al.*, 1997; Krishnaswamy *et al.*, 1999).

5.3 Interleukine-6 (IL-6)

L'IL-6 joue un rôle important dans les mécanismes de défense de l'hôte. L'IL-6 est produit tôt lors d'inflammation (immédiatement après l'IL-1 et le TNF- α) et possède plusieurs activités pro-inflammatoires telles que la maturation et l'activation des neutrophiles, la maturation des macrophages, la différenciation et le maintien des cellules NK, et la production d'IL-1 et de TNF- α . Il stimule aussi la croissance et la différenciation des lymphocytes B et des lymphocytes T et la sécrétion d'immunoglobulines par les lymphocytes B activés. L'IL-6 agit comme cofacteur avec l'IL-1 pour la synthèse d'IgM et avec l'IL-5 pour la synthèse d'IgA. De plus, il stimule la production de plaquettes et le maintien des lymphocytes T cytotoxiques (Curfs *et al.*, 1997; Tizard, 1995).

6.0 Chémokines – aspects généraux –

Les chémokines peuvent être considérées comme des cytokines pro-inflammatoires avec des propriétés chimotactiques. Elles sont impliquées dans l'initiation et la propagation des réponses inflammatoires caractérisées par la séquestration de cellules inflammatoires au site d'infection. Les chémokines ont été divisées en deux groupes basés sur la similarité structurale de leurs premières séquences d'acides aminés. Dans le groupe des CXC ou alpha-chémokines, les deux premières cystéines sont séparées par un acide aminé supplémentaire. Les membres de cette famille sont principalement des chémoattractants pour les neutrophiles. Dans le groupe des CC ou bêta-chémokines, les deux premières cystéines sont conservées et adjacentes

l'une à l'autre. Les membres de la famille des β -chémokines possèdent une spécificité pour les macrophages et les lymphocytes T et quelques-unes sont des facteurs chémotactiques pour les éosinophiles et les basophiles (Curfs *et al.*, 1997; Glabinski & Ransohoff, 1999).

L'IL-8 est le membre le plus important de la famille α alors que les plus importants de la famille β sont le MIP-1, le MCP et RANTES (Tizard, 1995).

Les chémokines telles que l'IL-8 et le MCP-1 sont essentielles à la pathogénèse de la méningite. Ces facteurs chémotactiques permettent le recrutement des leukocytes au niveau du SNC (Spellerberg & Tuomanen, 1994). Les neutrophiles et les macrophages ainsi recrutés sont une source importante de cytokines et de chémokines produites localement (Spellerberg & Tuomanen, 1994). Certaines méningites, comme celle causée par *Neisseria meningitidis*, sont caractérisées par une accumulation de neutrophiles au niveau de l'espace subarachnoïde (Lapinet *et al.*, 2000). Cela suggère un rôle important de l'IL-8 dans le développement de la méningite causée par ce pathogène bactérien. Il est aussi à noter le rôle des monocytes dans le transport de certains agents bactériens causant des méningites d'où l'importance de MCP-1. Comme en ce qui concerne les cytokines pro-inflammatoires, plusieurs études ont été effectuées concernant la capacité de certaines bactéries à induire la production de chémokines par les monocytes, les macrophages, les astrocytes de même que les cellules endothéliales (section 5.4).

6.1 Interleukine-8 (IL-8)

L'IL-8 est un important facteur chémotactique pour les neutrophiles qui apparaît relativement tard dans la réponse inflammatoire. Il active les neutrophiles, induit leur dégranulation (enzymes lysosomales) et la relâche de leukotriènes par ces derniers. L'IL-8 agit aussi sur les basophiles, les éosinophiles et les lymphocytes. L'IL-8 entraîne la relâche d'histamine par les basophiles et possède une activité chémotactique pour les lymphocytes et les éosinophiles. De plus, l'IL-8 induit l'adhérence des macrophages aux cellules endothéliales (Curfs *et al.*, 1997; Krishnaswamy *et al.*, 1999).

6.2 « Monocyte chemotactic protein one » (MCP-1)

Le MCP-1 est un important facteur chémotactique pour les monocytes. Les effets de MCP-1 sur les monocytes incluent le chémotactisme, l'adhésion, le relâchement d'anion superoxyde, l'activité de l'acide arachidonique, la phagocytose et la mort intracellulaire. Le MCP-1 régule la production de cytokines par les monocytes et l'expression de molécules d'adhésion sur les macrophages permettant leur infiltration. Le MCP-1 agit aussi sur les basophiles en stimulant la relâche d'histamine (Curfs *et al.*, 1997; Krishnaswamy *et al.*, 1999).

7.0 Rôles des cytokines dans la pathogénèse de la méningite

Pour causer une méningite, le pathogène doit coloniser la muqueuse épithéliale du nasopharynx, entrer et survivre dans le système vasculaire, traverser la BHM et se multiplier dans le LCR (Spellerberg & Tuomanen, 1994). L'entrée de la bactérie dans le LCR va conditionner l'ensemble de la cascade athophysologique de la méningite par la production de cytokines. Cette production de cytokines a lieu localement et est indépendante de la production systémique. Il n'y a pas de franchissement de la BHM possible pour les médiateurs inflammatoires puisque le sang et le LCR sont complètement indépendants quant à leur production de cytokines (Nassif, 1996).

Dans des conditions normales, les leucocytes ne sont pas capables d'interagir avec les cellules endothéliales de la BHM. Cependant, les cytokines pro-inflammatoires (entre autre l'IL-1 et le TNF- α qui vont agir de façon synergique) produites en réponse à la stimulation bactérienne augmentent l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales et permettent ainsi l'adhérence à l'endothélium et la transmigration (Nassif, 1996). La production locale de cytokines pro-inflammatoires dans le LCR entraîne une augmentation de la perméabilité de la BHM par le relâchement des jonctions serrées, une diminution de l'afflux sanguin local, une augmentation de la pression intracrânienne et le recrutement de leucocytes. Les sources de cytokines dans le LCR incluent les macrophages méningés, les cellules endothéliales microvasculaires et les astrocytes (Spellerberg & Tuomanen, 1994).

Pour certains pathogènes, la production de cytokines est nécessaire au franchissement de la BHM. Dans le cas de *S. pneumoniae*, la réponse inflammatoire de l'hôte permet l'expression d'un nouveau récepteur à la surface des cellules endothéliales, entraînant l'adhésion et l'invasion des cellules par la bactérie (Cundell *et al.*, 1995b; Cundell *et al.*, 1996). La méningite causée par *N. meningitidis* est caractérisée par une accumulation de neutrophiles dans l'espace subarachnoïde. La capacité de *N. meningitidis* à induire l'expression et la production de TNF- α , d'IL-1 β , d'IL-8, de MIP et d'IFN- γ par les neutrophiles a été démontrée. La production de cytokines et de chémokines par les neutrophiles peut donc jouer un rôle important dans la pathogénèse des méningites (Lapinet *et al.*, 2000).

8.0 Cellules responsables de la production de cytokines et de chémokines lors d'une méningite

Comme mentionné précédemment, lors d'une méningite, il y a une production locale de cytokines pro-inflammatoires au niveau du SNC qui va augmenter la perméabilité de la BHM, augmenter la pression intracrânienne et recruter des leucocytes. Ces cytokines se trouvant dans le LCR proviennent des monocytes et des macrophages, des cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux et des astrocytes (Spellerberg & Tuomanen, 1994).

8.1 Monocytes/macrophages

Les monocytes/macrophages jouent un rôle important dans la pathogénèse des méningites bactériennes. Par leurs fonctions phagocytaires, ils permettent à certains pathogènes (qui y survivent) de passer outre les barrières de défense de l'hôte et d'atteindre le SNC. Dans d'autre cas, le pathogène peut adhérer très fortement à la surface du monocyte et s'en servir comme moyen de transport pour atteindre la BHM et la franchir (Tizard, 2000; Tuomanen, 1996).

Les monocytes/macrophages sont aussi une des sources majeures de cytokines et de chémokines. Entre autres, les macrophages sont les principaux producteurs de TNF- α et d'IL-1 (Tizard, 2000). Étant donné l'importance des cytokines dans le développement des méningites bactériennes, ces cellules sont cruciales.

Plusieurs études ont été effectuées concernant la capacité de certains pathogènes causant des méningites à induire la production de cytokines pro-inflammatoires et de chémokines par les monocytes et les macrophages d'origine murine et humaine. Des études démontrent que GBS est capable d'induire la production d'IL-6, d'IL-1 et de TNF- α par des monocytes humains (Vallejo *et al.*, 1996; von Hunolstein *et al.*, 1997). La capacité de *S. pneumoniae* à induire des cytokines pro-inflammatoires a été étudiée. Les résultats révèlent une production de TNF- α et d'IL-6 par des monocytes humains stimulés par cette bactérie (Heumann *et al.*, 1994).

Des études ont aussi été effectuées concernant l'induction de cytokines pro-inflammatoires par des phagocytes stimulés par *S. suis*. Segura *et al.* ont étudié l'induction d'IL-6 et de TNF- α par des macrophages murins dans différentes conditions. Les résultats démontrent la capacité de *S. suis* à induire la production d'IL-6 et de TNF- α . Lors de ces expérimentations, du LPS purifié a servi de contrôle positif et les niveaux de production obtenus par stimulation avec la bactérie ont été similaires à ceux obtenus avec le contrôle positif. La production de cytokines est dépendante de la concentration bactérienne. De plus, lors d'une co-stimulation avec de l'acétate de phorbol myristate (PMA), une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires a été observée. La production de cytokines par les macrophages stimulés avec différents facteurs de virulence proposés pour *S. suis* sérotype 2 a aussi été étudiée. Les résultats révèlent que la capsule, les protéines EF et MRP, de même que la suilysine ne sont pas des facteurs pro-inflammatoires importants alors que la paroi cellulaire purifiée est capable d'induire une production importante de cytokines. Les niveaux de production observés avec la paroi cellulaire purifiée sont similaires à ceux observés lors de stimulation avec la bactérie entière (Segura *et al.*, 1999).

Segura *et al.* se sont ensuite intéressés à la production de cytokines pro-inflammatoires par des monocytes humains stimulés par *S. suis* sérotype 2. Les résultats obtenus démontrent la capacité de *S. suis* à induire la production d'IL-1, d'IL-6, de TNF- α , d'IL-8 et de MCP-1 par des monocytes humains. Cette production de cytokines est dépendante de la concentration bactérienne et du temps d'incubation. Une augmentation significative des niveaux de production est observée lors d'une pré-stimulation des cellules avec de l'IFN- γ . De plus, le pré-traitement avec des anticorps monoclonaux anti-CD14 suggère un rôle important de ce récepteur dans la production d'IL-1, d'IL-6 et de TNF- α . La production d'IL-8 et de MCP-1 semble plutôt indépendante du CD-14. L'utilisation d'anticorps anti-TNF et anti-IL-1 a révélé que ces deux cytokines pro-inflammatoires sont impliquées dans l'amplification de la cascade de production de cytokines induites par *S. suis* (Segura *et al.*, 2002).

8.2 Astrocytes

Les astrocytes constituent une partie de la BHM. Ils représentent la majorité des cellules gliales du SNC (Ehrlich *et al.*, 1998). On a longtemps pensé que les astrocytes étaient seulement un support cytosquelettique aux neurones. Par la suite, on leur a associé un rôle dans la régulation de la concentration extracellulaire de K⁺ (Aschner, 1998). Des études démontrent que les astrocytes interagissent avec les cellules endothéliales au niveau du maintien de la BHM, de ses fonctions et de son intégrité (Klein *et al.*, 2000). Entre autres, les astrocytes sont responsables de l'induction des jonctions serrées entre les cellules endothéliales (Aschner, 1998). Les astrocytes étant placés stratégiquement à l'interface entre la circulation sanguine et le SNC, ils sont prêts à influencer aussi bien l'entrée de cellules au niveau du SNC que l'activité de ces cellules une fois à l'intérieur (Aschner, 1998).

En réponse à l'invasion par un microorganisme, le SNC monte son propre système de défense à l'aide des cellules se trouvant localement (cellules microgliales et astrocytes). Les astrocytes sont capables de sécréter une variété de cytokines et de chémokines, d'où leur importance dans la médiation et le maintien des réponses immunitaires et inflammatoires au niveau du SNC (Aschner, 1998).

Des études démontrent que lorsque les astrocytes sont exposés à de l'IL-1 β et/ou du TNF- α , une grande quantité d'IL-8 et d'IL-6 est produite de même qu'une faible quantité d'IL-1 α et d'IL-1 β (Aloisi *et al.*, 1992). D'autres études confirment la production d'IL-6 et d'IL-8 par ce type de cellules (Janabi *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1993). De plus, une production de MCP-1 par les astrocytes, suite à un traitement avec du TNF- α ou de l'IL-1 β , a été démontrée (Oh *et al.*, 1999; Weiss *et al.*, 1998) Weiss *et al.* ont démontré l'importance du rôle de MCP-1, produit par les astrocytes, dans la migration des monocytes et des lymphocytes à travers la BHM. Leurs résultats démontrent que MCP-1 induit la migration de monocytes à travers une co-culture de cellules endothéliales et d'astrocytes, suggérant un rôle important de cette chémokine produite par les astrocytes dans la migration des monocytes et des lymphocytes à travers la BHM (Weiss *et al.*, 1998).

8.3 Cellules endothéliales

On a longtemps pensé que les cellules endothéliales n'avaient qu'un rôle passif dans l'inflammation. Cependant, des études démontrent que les cellules endothéliales sont fortement impliquées dans le processus inflammatoire autant par leur sécrétion de médiateurs inflammatoires que par la modulation de l'adhésion des leucocytes à leur surface (Krishnaswamy *et al.*, 1999). Les cellules endothéliales sont stratégiquement placées à l'interface entre la circulation sanguine et les tissus cérébraux. Il n'est donc pas surprenant que ces cellules, qui servent de porte d'entrée pour la circulation de molécules et de cellules, jouent un rôle actif dans l'homéostasie, les réactions inflammatoires et immunitaires (Krishnaswamy *et al.*, 1999; Mantovani *et al.*, 1992; Mantovani *et al.*, 1997).

Comme mentionné précédemment, la BHM isole le SNC du reste de l'organisme. Cette BHM inclut les cellules endothéliales cérébrovasculaires jointes par des jonctions serrées. Lorsqu'une bactérie interagit avec ces cellules, il y a production de cytokines et de chémokines qui vont mener à une augmentation de la perméabilité de la BHM (Glabinski & Ransohoff, 1999).

Des études démontrent que lorsque les cellules endothéliales sont stimulées avec certains pathogènes, elles sont capables de produire des cytokines telles que l'IL-1 et l'IL-6 et des chémokines telles que l'IL-8 et le MCP-1. Par exemple, *L. monocytogenes* est capable de stimuler la production d'IL-6 et d'IL-8 par des HUVEC. Cependant, dans les mêmes conditions, les cellules n'expriment pas de TNF- α et d'IL-1 β (Greiffenberg *et al.*, 1997; Kayal *et al.*, 1999). La capacité d'autres pathogènes, tels *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus bovis*, à induire la production de cytokines et de chémokines par des cellules endothéliales a aussi été étudiée. Il est démontré que *S. aureus* est capable d'induire la production de MCP-1, d'IL-1 β et d'IL-6 par des HUVEC (Tekstra *et al.*, 1999; Yao *et al.*, 2000) et que *S. bovis* est capable d'adhérer aux cellules endothéliales (HUVEC) puis d'induire l'expression et la sécrétion d'IL-8 (Ellmerich *et al.*, 2000).

Dans plusieurs études, les symptômes de la méningite ont été associés à la synthèse de cytokines induites par le pathogène causant l'infection. Par exemple, lors d'une infection causée par *S. pneumoniae*, l'activité inflammatoire de l'hôte (cytokines) entraîne l'expression d'un nouveau récepteur à la surface des cellules endothéliales. Seulement les souches virulentes induisent ce récepteur (Cundell *et al.*, 1995b; Cundell *et al.*, 1996).

III - MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

Article

**Pro-inflammatory Cytokine and Chemokine Release by
Human Brain Microvascular Endothelial Cells Stimulated by
Streptococcus suis Serotype 2**

Soumis à *Infection and Immunity*

NOTE

**Pro-inflammatory Cytokine and Chemokine Release by
Human Brain Microvascular Endothelial Cells Stimulated by
Streptococcus suis Serotype 2**

NATHALIE VADEBONCOEUR, MARIELA SEGURA, DINA AL-NUMANI ,
GHYSLAINE VANIER, AND MARCELO GOTTSCHALK*

Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP), Faculté de
médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada

Running title: *S. suis* induction of endothelial cell cytokines

*Corresponding author. Mailing address: GREMIP, Faculté de médecine vétérinaire,
Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, C.P. 5000, St-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6,
Canada. Phone: 450- 773-8521, ext. 8374. Fax: 450-778-8108. E-mail:
gottschm@medvet.umontreal.ca.

ABSTRACT

Streptococcus suis serotype 2 is a world wide agent of diseases among pigs including meningitis, septicemia and arthritis. This microorganism is also recognized as an important zoonotic agent. The pathogenesis of the meningitis caused by *S. suis* is poorly understood. We have previously shown that *S. suis* is able to adhere to human brain microvascular endothelial cells (BMEC), but not to human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). The objective of this work was to study the ability of *S. suis* serotype 2 to induce the release of the pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin- (IL) 1; IL-6 and the chemokines IL-8 and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) by human BMEC and HUVEC, using a sandwich ELISA. *S. suis* was able to stimulate the production of IL-6, IL-8 and MCP-1 by BMEC but not HUVEC, in a time- and concentration- dependent manner. Bacterial cell wall components were largely responsible for such stimulation. The human and pig origin of strains does not seem to affect the intensity of the response; indeed, a very heterogeneous pattern of cytokine and chemokine production was observed for the different strains tested in this study. *In situ* production of cytokines and chemokines by BMEC may be the result of specific adhesion of *S. suis* to this cell type, with several consequences such as increased recruitment of leukocytes and an increase in the blood-brain-barrier permeability.

Streptococcus suis causes many swine diseases including meningitis, septicemia, arthritis and pneumonia. Of the 35 official serotypes described to date, serotype 2 is the most virulent and the most commonly isolated from diseased pigs. This microorganism is also recognized as an agent of zoonosis. *S. suis* was first isolated from human cases of meningitis and septicemia in 1968 (24). Since then, over 200 cases of human infection by *S. suis* have been reported, especially among persons in close contact with pigs or pig products. *S. suis* mainly causes meningitis in humans, where hearing loss is the most frequent sequela (15).

The pathogenesis of meningitis caused by *S. suis* is poorly understood and is probably a multistep process. It is not known how bacteria, present at low levels on mucosal surfaces, are able to cross these epithelial barriers to reach the bloodstream (13). Once there, bacteria can travel inside monocytes (48) or free in circulation, as demonstrated by several studies during the last decade (4, 13, 34). In fact, the presence of a polysaccharidic capsule (CPS) protects bacteria against phagocytosis (3). The mechanisms by which *S. suis* crosses the blood-brain barrier (BBB) into the subarachnoid space to cause meningitis are unknown. Other meningeal pathogens including *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* K1 and group B *Streptococcus* (GBS), are known to interact directly with the BBB as free bacteria (44). This barrier, responsible for maintaining biochemical homeostasis within the central nervous system, is characterized by intercellular tight junctions that regulate fluid, macromolecule and cell traffic across the layer (43). The BBB is composed of the arachnoid membrane, the brain microvascular endothelial cells (BMEC) and the choroid plexus. The primary site of breakdown of the BBB in most bacterial meningitis appears to be the BMEC (42).

It is generally accepted that bacterial interactions with BMEC are mainly characterized by specific attachment and consequent invasion, toxicity and increased permeability (13). *S. suis* serotype 2 has been shown to adhere to human BMEC, but unlike other meningeal pathogens, invasion does not occur. The adhesion appears to be related to the cell type, as *S. suis* does not adhere to human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) (5). Adhesion of *S. suis* to BMEC may have different consequences which may lead to increased permeability of the BBB. For example, some strains produce a toxin (suilysin) (12, 17), that was reported as being toxic for BMEC (5).

However, only European strains of *S. suis* produce this hemolysin (12). In fact, production of toxic factors by the majority of virulent North American strains, that might lead to cell damage and BBB increased permeability, has not been described so far (13). This suggests that the pathogenesis of meningitis produced by suilysin-positive or suilysin-negative strains may differ (13).

Increased BBB permeability may also be induced by inflammatory mediators that might be produced following adhesion of bacteria to cells. Recent work in our laboratory show that *S. suis* is not only able to interact with monocytes/macrophages, but is also able to induce the release of several proinflammatory cytokines and chemokines, such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin- (IL) 1, IL-6, IL-8 and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) (29, 30). However, the source of proinflammatory cytokines in cerebrospinal fluid during meningitis may be microglial and endothelial cells as well as migrating leukocytes (13). Recent studies show that proinflammatory cytokines are produced by BMEC that are stimulated either by other cytokines (such as TNF- α or IL-1) or by a direct interaction with microbial pathogens (7). Cytokines and adhesion molecules expressed by endothelial cells are known to be key players in regulating the recruitment of leukocytes to the sites of inflammation (16). The objective of this work was to study the ability of *S. suis* serotype 2 to induce the release of the pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1, IL-6 and the chemokines IL-8 and MCP-1, by human BMEC and HUVEC.

S. suis capsular type 2 virulent strains 89-1591 and S735 (from Canada and The Netherlands, respectively), isolated from diseased pigs (25), were included in this study. The isogenic unencapsulated mutant 2A, derived from strain S735 and obtained by Tn916 transposition, was also used (3). Bacteria, maintained as stock cultures in 50% glycerol-Todd-Hewitt broth (THB; Difco Lab., Detroit, MI) at -80°C, were grown overnight on bovine blood agar plates at 37°C and isolated colonies were used as inocula for THB, that were incubated for 18 h at 37°C. Working cultures for endothelial cell stimulation were produced by inoculating 10 ml of these cultures in 200 ml of THB at 37°C with agitation until they reached the mid-log phase (6 h incubation-time; optical density at 540 nm of 0.4-0.5). Bacteria were washed twice in phosphate-buffered saline

(PBS) pH 7.4, and diluted to approximately 10^9 CFU/ml in PBS. A more accurate determination of the CFU/ml in the final suspension was made by plating on THB-agar. Bacteria were then killed by heat treatment at 60°C for 45 min (minimal experimental condition required for killing of *S. suis*) (29). Subcultures of the heat-treated suspension on blood agar plates were incubated at 37°C for 48 h to confirm the absence of viable organisms. Killed bacterial preparations were stored at 4°C and re-suspended in cell culture media just before stimulation assays.

Human brain microvascular endothelial cell line (BMEC), originating from a brain biopsy of an adult human female with epilepsy was kindly provided by Dr. K. Kim, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD. Cells had been immortalized by transfection with simian virus 40 large T antigen and were shown to maintain their morphologic and functional characteristics (39). Cells were grown in RPMI 1640 medium (Gibco, Burlington, VT) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Gibco), 10% Nu-serum IV supplement (Becton Dickinson, Bedford, MA), L-glutamin (ICN Biomedical Inc., Aurora, OH) and penicillin-streptomycin (5,000 U/ml) (Gibco). Flasks (Falcon) and 24-well tissue culture plates (Becton Dickinson) were precoated with rat tail collagen to support the cells (5). HUVEC derived from human umbilical cord were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC CRL-1730). Cells were grown in F-12K medium (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, endothelial cell growth supplement (30 µg/ml) (Becton Dickinson) and penicillin-streptomycin (5,000 U/ml). Flasks and 24-well tissue culture plates were pre-coated with 1% gelatin to support the cells. Both types of endothelial cells were incubated at 37°C, with 5% CO₂ in a humid atmosphere. Cells were used before passage 35 for all experiments.

For stimulation assays, 48 h cultures of BMEC or HUVEC cells in flasks were trypsinized and diluted in culture media at 10^5 cells/ml, and 1 ml of this suspension was distributed in 24-well plates and incubated to confluence. At confluence, medium was removed and heat-killed *S. suis* strains (1 ml) or different concentrations of purified virulence factors (see below) were added at appropriate dilutions made in culture media. Endothelial cells stimulated with lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli*

0127:B8 (Sigma-Aldrich) (10 µg/ml for BMEC and 1 µg/ml for HUVEC) served as a positive control. Cells incubated in medium alone served as controls for spontaneous cytokine release. Cytokine induction plates were incubated at 37°C, 5% CO₂ in a humid atmosphere. At different time intervals (see below), culture supernatants were harvested from individual wells, and the supernatants aliquoted and frozen at -20°C until cytokine determinations were performed. Each test of BMEC or HUVEC stimulation was repeated at least three times. All solutions and bacterial preparations used in this study were tested for the presence of endotoxin by a *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) gel-clot test (Pyrotell STV, Cape Cod, Falmouth, MA) with a sensitivity limit of 0.03 EU/ml. In some experiments, endotoxin contamination during stimulation of endothelial cells was controlled by parallel assays with Polymixin B (PmB; 10 µg/ml). Results from the LAL test and/or data from PmB treatment demonstrated no significant levels of endotoxin contamination from different bacterial preparations (data not shown). Cell culture medium contained less than 0.03 EU/ml. Absence of cell toxicity at all bacterial concentrations as well as with purified bacterial components was confirmed by the lactate dehydrogenase cellular injury assay, as previously described (5).

IL-1, TNF-α, IL-6, IL-8 and MCP-1 were measured by sandwich ELISA, using pair matched monoclonal antibodies (Mabs) from R&D Systems (Minneapolis, MN), according to the manufacturer's recommendations. Standard curves were included in each ELISA plate (Nunc, VWR, Ville Mont Royal, Quebec, Canada) as twofold dilutions of recombinant (R&D Systems) human IL-6 (1,500 to 3 pg/ml), IL-8 (600 to 5 pg/ml), MCP-1 (500 to 8 pg/ml), IL-1 (300 to 5 pg/ml) or TNF-α (3,000 to 188 pg/ml). Supernatant dilutions giving optical density readings in the linear portion of the appropriate standard curve were used to determine the level of each cytokine in the samples. Standard and sample dilutions were added in duplicate wells to each ELISA plate. All analyses were performed at least four times for each individual endothelial cell stimulation assay. Results were derived from linear regression calculations and expressed in pg/ml of cytokine. Differences were analyzed for significance by using the Student's unpaired *t* test (two-tailed *P* value), with a *P* value < 0.05 considered as significant.

TNF- α and IL-1 have been proposed as initiators of meningeal inflammation by modulation of the BBB (28, 37). The BMEC tested in this study were not able to produce IL-1 or TNF- α after stimulation with high doses of LPS or *S. suis*, even if pre-stimulated with interferon-gamma (not shown). Furthermore, no mRNA signal corresponding to any of these cytokines could be detected by RT-PCR after LPS stimulation of BMEC (unpublished observations). Similarly, no production of either cytokine by the HUVEC used, stimulated with *S. suis*, could be demonstrated in the present study. It has been shown that oral viridans streptococci are able to induce IL-6 and IL-8, but not TNF- α or IL-1, from stimulated endothelial cells (46) and *Neisseria meningitidis*-stimulated endothelial cells induce the production of TNF- α only in the presence of monocytes (40). Other reports indicate that IL-1 production (or gene expression) occurs in endothelial cells stimulated with bacteria or LPS (2, 23, 50). Since the cells used in this study did not produce any of these cytokines with the positive control used, no conclusion on a possible IL-1 and TNF- α induction by *S. suis* could be made. Interestingly, both cytokines are significantly upregulated when human monocytes are activated by *S. suis* (30).

Previous studies have shown that stimulated endothelial cells are able to produce IL-6 and different chemokines (2, 26, 27, 36, 46, 50). Unstimulated BMEC yielded low basal levels of IL-6, IL-8 and MCP-1 expression. These basal values were subtracted to correct data obtained after *S. suis* or LPS stimulation throughout this work. The production of cytokines and chemokines by BMEC stimulated with *S. suis* varied with incubation time. Both *S. suis* 89-1591 and S735 strains were able to induce high levels of IL-6, low levels of MCP-1 and intermediate levels of IL-8 from stimulated BMEC and no significant difference in production was observed between the two strains ($P > 0.05$). Maximal release of IL-6 was achieved between 12 and 48 h of incubation with bacteria. On the other hand, LPS stimulation lead to a gradual increase of IL-6 with time, reaching its highest level at 48 h of incubation (Fig. 1A). Similar kinetics for IL-8 and MCP-1 production were observed with both bacteria and LPS, with maximal release observed after 48 h of incubation (Fig. 1B-C). However, cytokine levels released by cells stimulated with LPS were significantly higher ($P < 0.001$). Endothelial cells have been shown to release cytokines and chemokines with (18, 33, 35) or without (26) pre-

activation with IL-1 and/or TNF- α . Since the BMEC used in this study did not produce either cytokine, the observed levels of IL-6, IL-8 and MCP-1 should be considered TNF- α - and IL-1-independent. A possible amplifying role of IL-1 and TNF- α in vivo should not be ruled out. The BBB is a complex system that involves dynamic interplay of BMEC with perivascular cells such as astrocytes and macrophages. Our system focused only on the capacity of BMEC to produce proinflammatory cytokines and chemokines and did not attempt to capture the full complexity of these interactions.

As done for BMEC, basal production of the cytokine and chemokines by HUVEC was subtracted from experimental results. Although a strong response was observed with LPS, *S. suis* was not able to induce any upregulation of IL-6, IL-8 or MCP-1 from *S. suis* stimulated HUVEC (Fig. 2A-C). HUVEC response appeared to be more sensitive to LPS than BMEC, as a much higher level of production was observed even though the concentration of LPS used for HUVEC induction was 10 times lower than that used for BMEC. A possible explanation for the sensitivity of BMEC to *S. suis* is that the induction of cytokines is the result of bacteria-cell adhesion. As indicated previously, *S. suis* is able to adhere to BMEC but not to HUVEC (5). It has already been shown for other bacterial species that adhesion is needed to stimulate cytokine production in cells (49). For example, *Streptococcus bovis* is able to induce IL-8 expression after adhesion to endothelial cells (8) and only adherent *N. meningitidis* induces the expression of TNF- α by endothelial cells (40). Similarly, the cytokine-stimulatory activity of the capsular polysaccharide of *Staphylococcus aureus* on endothelial cells resulted from ligand-receptor interactions (36). Interestingly, *S. suis* is not able to invade BMEC (5). Similarly, activation and induction of cytokine production in endothelial cells stimulated with *Listeria monocytogenes* occur without cellular invasion (27). *S. suis* is also able to adhere to, but is not ingested, by monocytes, and this interaction induces the release of large amounts of pro-inflammatory cytokines (30).

The effect of bacterial concentration on cytokine production was determined. Cell-culture supernatants were harvested after 24 h of stimulation to evaluate IL-6 production, and after 48 h to measure IL-8 and MCP-1 induction and BMEC were exposed to different concentrations of heat-killed *S. suis* strains 89-1591 or S735.

Cytokine induction varied directly with bacterial concentration, and only a high concentration of bacteria was able to induce cytokine production. In fact, a concentration greater than 2.5×10^8 CFU/ml was needed to obtain cytokine release (data not shown). This is in agreement with results observed with human monocytes and murine macrophages (29, 30). Interestingly, the presence of clinical signs and symptoms in diseased animals correlates with high levels of bacteria in the bloodstream (1).

Despite the fact that *S. suis* serotype 2 is usually associated with severe occupational disease in humans (15), studies using strains of human origin are limited. Since cells used in this and earlier studies (5, 21) are of human origin, it was relevant to compare the ability of porcine strains to induce cytokine release with those recovered from serious cases of human disease. Porcine and human strains of *S. suis* used in this study are listed in Table 1. Differences between the human and porcine origin group of strains and differences among strains within the same group were analyzed for significance by using general linear models (GLM), followed by Tukey-Kramer post-hoc tests for differences between strains. The SAS software (SAS, Cary, NC) was used for these analyses. A very heterogeneous pattern of cytokine production was observed, with no tendency for human strains to induce higher cytokine levels (Fig. 3). Tukey-Kramer post-hoc tests revealed significant differences between strains within each group. In fact, no consistent effect on cytokine production could be attributed to the origin of the strains, specially for those of human origin ($P < 0.01$). Similar observations have been reported for *S. suis* interaction with human monocytes, for oral viridans streptococci and for *S. aureus* (30, 46, 50). The observed variability may be due to the degree of exposure and/or type of components of the bacterial surface, such as bacterial cell wall, which can stimulate cytokine release from endothelial cells. Despite the epidemiological fact that pigs may be the sole source of human infections (6, 41), cases of *S. suis* infection in individuals not associated with the porcine industry have also been reported (22). Thus, the clinical relevance of potential species-specific differences in reactivity to bacterial strains still remains unclear.

The ability of virulent and non virulent strains of *S. suis* to induce IL-6, IL-8 and MCP-1 was also compared. The concept of virulence for *S. suis* is currently debated in the literature (11, 13). In this study, we considered a strain as “virulent” or “non-

virulent” depending on the presence or absence of clinical disease after experimental infections in piglets (Table 1). In this work, no association was observed between the cytokine response and the virulence of the strain. This is in agreement with results reported by Segura *et al.* (30). Similarly, there were no observed differences in the adhesion to different types of host cells, including BMEC, between virulent and non-virulent strains (unpublished observations). Unlike other important streptococcal species, information on *S. suis* virulence factors as well as on surface expressed molecules is limited (13). It has been shown in other bacterial species, such as *Rhodococcus equi*, that virulence is not necessarily correlated with the level of cytokine production (9). In the case of *S. suis*, it has been suggested that only virulent strains are able to survive at high numbers in the bloodstream and induce disease (13). Recent research indicates that, unlike non-virulent strains, virulent *S. suis* strains are able to survive in circulation at high concentrations for more than 6 days (1).

Different bacterial structures and products have been potentially implicated in the pathogenesis of the *S. suis* infection (13, 38), but understanding of the effect that these proposed virulence factors have on cytokine release is limited. It has previously been shown that the cell wall of *S. suis* is the main component responsible for cytokine induction, and that presence of CPS differently affects IL-6 and TNF- α production by murine macrophages (29). In the present study, BMEC were stimulated with different concentrations of CPS or cell wall, purified as previously described (30,32). Furthermore, cytokine induction by *S. suis* strain S735 was compared to that by its unencapsulated mutant 2A (3). *S. suis* purified cell wall material was able to induce IL-6 and IL-8 production by BMEC. At a concentration of 500 $\mu\text{g/ml}$ of cell wall, the cytokine production level was roughly equivalent to half of that produced by whole bacteria. It has been postulated that unencapsulated bacteria cause inflammation by exposing the underlying cell wall or by secreting cell wall material during growth (45). Similarly, antigens extracted from the cell wall of *S. bovis* induce different cytokines from endothelial, epithelial and phagocytic cells (8). The possible role of cell wall components on the upregulation of IL-6 and IL-8 was confirmed by the use of an unencapsulated mutant. In fact, the unencapsulated mutant was able to induce higher levels of IL-6 and IL-8, than the encapsulated parent S735 strain ($P < 0.001$) (Fig. 4 A-

B). In the present study, the capacity of the unencapsulated mutant to induce higher levels of IL-6 and IL-8 was probably not the result of greater adhesion of bacteria to cells, since both encapsulated and unencapsulated strains adhere similarly to BMEC (5).

Results indicating that the capsule itself has no effect on the upregulation of these cytokines were confirmed by testing different concentrations of purified CPS. Concentrations as high as 100 $\mu\text{g/ml}$ did not induce significant levels of cytokine release compared to either negative control or whole bacteria (Fig. 4 A and B). This is in agreement with results previously observed with murine macrophages (29). Several *in vitro* and *in vivo* studies with purified CPS or with unencapsulated mutants failed to demonstrate a major role for capsular polysaccharide of pathogenic gram-positive cocci in cytokine induction (14). In the case of *S. suis*, however, the capsule may indirectly contribute to cytokine induction. In fact, the polysaccharide capsule is probably responsible for the progression of the disease by allowing *S. suis* to evade host defense mechanisms such as phagocytosis (31). As shown in this and previous works (29, 30), a high concentration of bacteria is needed to up-regulate the production of proinflammatory cytokines. Thus, only well encapsulated bacteria may be protected and survive at high concentrations in the bloodstream to reach the BBB and stimulate cells.

Since it has been shown that several toxins can stimulate or modulate the inflammatory mediator cascade (20), the cytokine induction by the extracellular hemolysin (suilysin), a possible virulence factor among European strains (12, 17), was determined. *S. suis* suilysin, purified as previously described (17), was kindly provided by Dr T. Jacobs (Intervet, Boxmeer, The Netherlands). The suilysin was reactivated by addition of 0.001% 2-mercaptoethanol (2-ME) to cell culture medium during BMEC stimulation. Concentrations used in this study were not toxic for the cells (data not shown). A high IL-6 and IL-8 response was obtained with purified suilysin (Fig. 4 A-B). Rose et al. (27) have recently demonstrated that listeriolysin, a hemolysin produced by *L. monocytogenes*, is largely responsible for endothelial cytokine upregulation. The production of suilysin by European strains may contribute to a higher local inflammatory response. The fact that virulent European suilysin-positive strains present a higher virulence potential than virulent North American suilysin-negative strains has already been proposed (10). Furthermore, it has been shown that a suilysin-negative

mutant was not virulent for mice and less virulent for pigs than its hemolytic parent strain (5). In the present study, heat-killed washed bacterial suspensions (free of suilysin) were used as stimuli for BMEC. Thus, the inherent capacity of suilysin-positive strains to induce cytokines in BMEC may have been underestimated.

The induction kinetics for MCP-1 production following stimulation with purified components of *S. suis* was somehow different from that obtained for IL-6 and IL-8. BMEC were insensitive to purified CPS but extremely responsive to low concentrations of cell wall (Fig. 4C). In fact, purified cell wall concentrations as low as 1 μg induced a MCP-1 level similar to that obtained with whole bacteria. However, no activation was obtained with the unencapsulated mutant. Interestingly, purified cell wall was produced from the same mutant (30). It may be hypothesized that the surface expression of MCP-1 stimulating components has been affected in the mutant and cell wall purification methods could make these components available for BMEC stimulation. As previously observed with *S. suis* stimulated macrophages, bacterial molecules responsible for stimulating the up-regulation of different cytokines are probably different and present in the cell wall (29). Finally, no significant upregulation of MCP-1 could be observed after stimulation of cells with suilysin (Fig. 4C).

The fact that *S. suis* activated vascular endothelium expresses several different cytokines supports the contention that these active molecules act as secondary immune response modulators. Cytokines released by the BBB may act to modulate their activity or that of nearby cells, such as astrocytes and glial cells. These pro-inflammatory cytokines may play an important role in initiating changes in permeability or adhesion properties of the same BMEC that allow the immune cells to infiltrate the central nervous system in cases of meningitis caused by *S. suis*.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Dr. M. Kobisch (Centre National d'Études Vétérinaires et Alimentaires, Ploufragan, France), Dr. U. Vecht (DLO-Institute for Animal Science and Health, Lelystad, The Netherlands), Dr. T. Alexander (University of Cambridge, England), Dr. L. Brasme (Centre Hospitalier Universitaire de Reims, France), Dr. G. Grise (Hôpital des Feugrois, Elbeuf, France), Dr. B. Cattier (Centre Hospitalier Universitaire Bretonneau, Tours, France), Dr. B. François (Dupuytren Hospital, Limoges Cedex, France), and Dr. P. Norton (Institute for Animal Health, Compton, United Kingdom) for providing some of the *S. suis* type 2 strains used in this study.

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

REFERENCES

1. **Berthelot-Hérault, F., R. Cariolet, A. Labbé, M. Gottschalk, J. Y. Cardinal, and M. Kobisch.** 2001. Experimental infection of specific pathogen free piglets with French strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. *Can. J. Vet. Res.* **65**:196-200.
2. **Bourdoulous, S., A. Bensaid, D. Martinez, C. Sheikboudou, I. Trap, A. D. Strosberg, and P. O. Couraud.** 1995. Infection of bovine brain microvessel endothelial cells with *Cowdria ruminantium* elicits IL-1 beta, -6, and -8 mRNA production and expression of an unusual MHC class II DQ alpha transcript. *J. Immunol.* **154**:4032-4038.
3. **Charland, N., J. Harel, M. Kobisch, S. Lacasse, and M. Gottschalk.** 1998. *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology* **144**:325-332.
4. **Charland, N., M. Kobisch, B. Martineau-Doize, M. Jacques, and M. Gottschalk.** 1996. Role of capsular sialic acid in virulence and resistance to phagocytosis of *Streptococcus suis* capsular type 2. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **14**:195-203.
5. **Charland, N., V. Nizet, C. E. Rubens, K. S. Kim, S. Lacouture, and M. Gottschalk.** 2000. *Streptococcus suis* serotype 2 interactions with human brain microvascular endothelial cells. *Infect. Immun.* **68**:637-643.
6. **Chatellier, S., M. Gottschalk, R. Higgins, R. Brousseau, and J. Harel.** 1999. Relatedness of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from different geographic origins as evaluated by molecular fingerprinting and phenotyping. *J. Clin. Microbiol.* **37**:362-366.
7. **Cho, N., S. Seong, M. Choi, and I. Kim.** 2001. Expression of chemokine genes in human dermal microvascular endothelial cell lines infected with *Orientia tsutsugamushi*. *Infect. Immun.* **69**:1265-1272.
8. **Ellmerich, S., N. Djouder, M. Scholler, and J. P. Klein.** 2000. Production of cytokines by monocytes, epithelial and endothelial cells activated by *Streptococcus bovis*. *Cytokine* **12**:26-31.

9. **Giguère, S., and J. F. Prescott.** 1998. Cytokine induction in murine macrophages infected with virulent and avirulent *Rhodococcus equi*. *Infect. Immun.* **66**:1848-1854.
10. **Gottschalk, M., R. Higgins, M. Jacques, K. R. Mittal, and J. Henrichsen.** 1989. Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.* **27**:2633-2636.
11. **Gottschalk, M., R. Higgins, and S. Quessy.** 1999. Dilemma of the virulence of *Streptococcus suis* strains. *J. Clin. Microbiol.* **37**:4202-4203.
12. **Gottschalk, M., S. Lacouture, and J. D. Dubreuil.** 1995. Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin. *Microbiology* **141**:189-195.
13. **Gottschalk, M., and M. Segura.** 2000. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet. Microbiol.* **76**:259-272.
14. **Heumann, D., C. Barras, C. Severien, M. P. Glauser, and A. Tomasz.** 1994. Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes. *Infect. Immun.* **62**:2715-2721.
15. **Higgins, R., and M. Gottschalk.** 1998. Streptococcal diseases. In A. D. Leman, B. E. Straw, W. L. Mengeling, S. D'Allaire, and D. J. Taylor (ed.), *Diseases of swine*, 8th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
16. **Imhof, B. A., and D. Dunon.** 1995. Leukocyte migration and adhesion. *Adv. Immunol.* **58**:345-416.
17. **Jacobs, A. A. C., P. L. W. Loeffen, A. J. G. van der Berg, and P. K. Storm.** 1994. Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (sullysin) of *Streptococcus suis*. *Infect. Immun.* **62**:1741-1748.
18. **Jirik, F. R., T. J. Podor, T. Hirano, T. Kishimoto, D. J. Loskutoff, D. A. Carson, and M. Lotz.** 1989. Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. *J. Immunol.* **142**:144-147.
19. **Kobisch, M., M. Gottschalk, P. Morvan, R. Cariolet, G. Bénévent, and J. P. Joly.** 1995. Experimental infection of SPF piglets with *Streptococcus suis* serotype 2. *Journées Rech. Porcine en France* **27**:97-102.

20. **Koning, W., S. Kasimir, T. Hensler, J. Scheffer, B. Koning, J. Hilger, J. Brom, and M. Koller.** 1992. Release of inflammatory mediators by toxin stimulated immune system cells and platelets. *Zbl. Bakt. Suppl.* **23**:385-394.
21. **Lalonde, M., M. Segura, S. Lacouture, and M. Gottschalk.** 2000. Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines. *Microbiology* **146**:1913-1921.
22. **Leelarasamee, A., C. Nilakul, S. Tien-Grim, S. Srifuengfung, and W. SUSAENGRAT.** 1997. *Streptococcus suis* toxic-shock syndrome and meningitis. *J. Med. Assoc. Thai.* **80**:63-68.
23. **Miossec, P., D. Cavender, and M. Ziff.** 1986. Production of interleukin 1 by human endothelial cells. *J. Immunol.* **136**:2486-2491.
24. **Perch, B., E. Kjems, P. Slot, and K. B. Pedersen.** 1981. Biochemical and serological properties of R, S and RS streptococci. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **B89**:167-171.
25. **Quessy, S., J. D. Dubreuil, M. Caya, and R. Higgins.** 1995. Discrimination of virulent and avirulent *Streptococcus suis* capsular type 2 isolates from different geographical origins. *Infect. Immun.* **63**:1975-1979.
26. **Reyes, T. M., Z. Fabry, and C. L. Coe.** 1999. Brain endothelial cell production of a neuroprotective cytokine, interleukin-6, in response to noxious stimuli. *Brain Res.* **851**:215-220.
27. **Rose, F., S. A. Zeller, T. Chakraborty, E. Domann, T. Machleidt, W. Seeger, F. Grimminger, and U. Sibelius.** 2001. Human endothelial cell activation and mediator release in response to *Listeria monocytogenes* virulence factors. *Infect. Immun.* **69**:897-905.
28. **Saukkonen, K., S. Sande, C. Cioffe, S. Wolpe, B. Sherry, A. Cerami, and E. Tuomanen.** 1990. The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental gram-positive meningitis. *J. Exp. Med.* **171**:439-448.
29. **Segura, M., J. Stankova, and M. Gottschalk.** 1999. Heat-killed *Streptococcus suis* capsular type 2 strains stimulate tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by murine macrophages. *Infect. Immun.* **67**:4646-4654.

30. **Segura, M., N. Vadeboncoeur, and M. Gottschalk.** 2002. CD14-dependent and -independent cytokine and chemokine production by human monocytes stimulated by *Streptococcus suis* capsular type 2. Clin. Exp. Immunol. *in press*.
31. **Segura, M. A., P. Cleroux, and M. Gottschalk.** 1998. *Streptococcus suis* and group B Streptococcus differ in their interactions with murine macrophages. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **21**:189-195.
32. **Sepulveda, E. M. D., E. Altman, M. Kobisch, S. Dallaire, and M. Gottschalk.** 1996. Detection of antibodies against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a purified capsular polysaccharide antigen-based indirect ELISA. Vet. Microbiol. **52**:113-125.
33. **Sica, A., J. M. Wang, F. Colotta, E. Dejana, A. Mantovani, J. J. Oppenheim, C. G. Larsen, C. O. C. Zachariae, and K. Matsushima.** 1990. Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-1 and Tumor Necrosis Factor. J. Immunol. **144**:3034-3038.
34. **Smith, H. E., H. J. Wisselink, N. Stockhofe-Zurwieden, U. Vecht, and M. M. Smits.** 1997. Virulence markers of *Streptococcus suis* type 1 and 2. Adv. Exp. Med. Biol. **418**:651-655.
35. **Soderquist, B., J. Kallman, H. Holmberg, T. Vikerfors, and E. Kihlstrom.** 1998. Secretion of IL-6, IL-8 and G-CSF by human endothelial cells in response to *Staphylococcus aureus* exotoxins. APMIS **106**:1157-1164.
36. **Soell, M., M. Diab, G. Haan-Archipoff, A. Beretz, C. Herbelin, B. Poutrel, and J. P. Klein.** 1995. Capsular polysaccharide types 5 and 8 of *Staphylococcus aureus* bind specifically to human epithelial (KB) cells, endothelial cells, and monocytes and induce release of cytokines. Infect. Immun. **63**:1380-1386.
37. **Sprenger, H., A. Rosler, P. Tonn, H. J. Brame, G. Huffmann, and D. Gensa.** 1996. Chemokines in the cerebrospinal fluid of patients with meningitis. Clin. Immunol. Immunopathol. **80**:155-161.
38. **Staats, J. J., I. Feder, O. Okwumabua, and M. M. Chengappa.** 1997. *Streptococcus suis*: past and present. Vet. Res. Commun. **21**:381-407.
39. **Stins, M. F., N. V. Prasadarao, J. Zhou, M. Ardit, and K. S. Kim.** 1997. Bovine brain microvascular endothelial cells transfected with SV40-large T antigen: development of an immortalized cell line to study pathophysiology of CNS disease. In Vitro Cell. Dev. Biol. **33**:243-247.

40. **Taha, M. K.** 2000. *Neisseria meningitidis* induces the expression of the TNF-alpha gene in endothelial cells. *Cytokine* **12**:21-25.
41. **Tarradas, C., I. Luque, D. De Andrès, Y. E. Abdel-Aziz Shahein, P. Pons, F. Gonzalez, C. Borge, and A. Perea.** 2001. Epidemiological relationship of human and swine *Streptococcus suis* isolates. *J. Vet. Med.* **B 48**:347-355.
42. **Townsend, G. C., and W. M. Scheld.** 1995. Microbe-endothelium interactions in blood-brain barrier permeability during bacterial meningitis: Although bacterial pathogens can directly disrupt the barrier, a role for host factors is still under study. *ASM News* **61**:294-298.
43. **Tuomanen, E.** 1993. Breaching the blood-brain barrier. *Sci. Am.* **268**:80-84.
44. **Tuomanen, E.** 1996. Entry of pathogens into the central nervous system. *FEMS Microbiol. Rev.* **18**:289-299.
45. **Tuomanen, E., A. Tomasz, B. Hengstler, and O. Zak.** 1985. The relative role of bacterial cell wall and capsule in the induction of inflammation in pneumococcal meningitis. *J. Infect. Dis.* **151**:535-540.
46. **Vernier, A., M. Diab, M. Soell, G. Haan-Archipoff, A. Beretz, D. Wachsmann, and J. P. Klein.** 1996. Cytokine production by human epithelial and endothelial cells following exposure to oral viridans streptococci involves lectin interactions between bacteria and cell surface receptors. *Infect. Immun.* **64**:3016-3022.
47. **Vetch, U., J. P. Arends, E. J. van der Molen, and L. A. van Leengoed.** 1989. Differences in virulence between two strains of *Streptococcus suis* type II after experimentally induced infection of newborn germ-free pigs. *Am. J. Vet. Res.* **50**:1037-1043.
48. **Williams, A. E., and W. F. Blakemore.** 1990. Pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus suis* type 2. *J. Infect. Dis.* **162**:474-481.
49. **Wilson, S. L., and D. A. Drevets.** 1998. *Listeria monocytogenes* infection and activation of human brain microvascular endothelial cells. *J. Infect. Dis.* **178**:1658-1666.
50. **Yao, L., V. Bengualid, F. D. Lowy, J. J. Gibbons, V. B. Hatcher, and J. W. Berman.** 1995. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces cytokine gene expression. *Infect. Immun.* **63**:1835-1839.

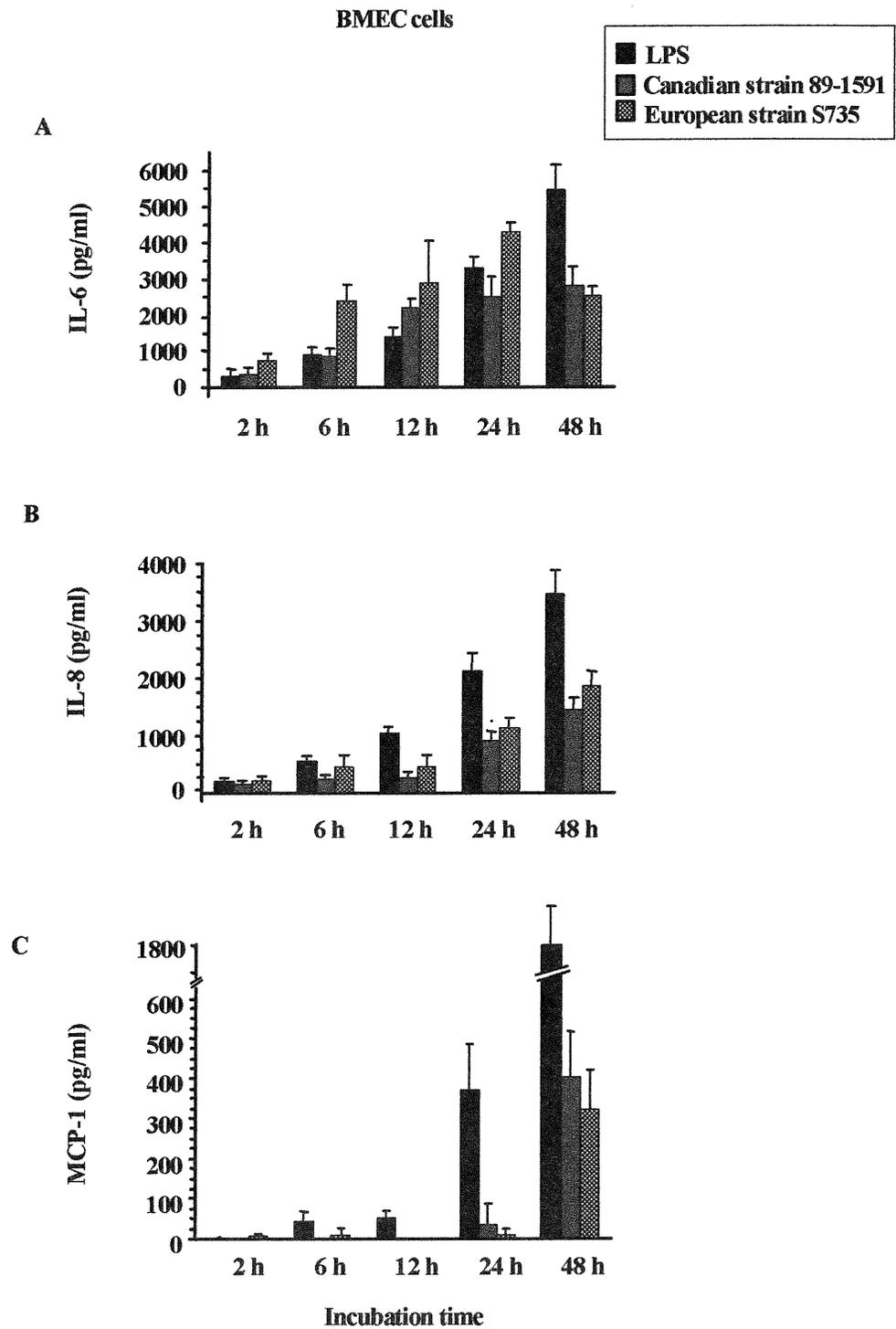
LEGENDS

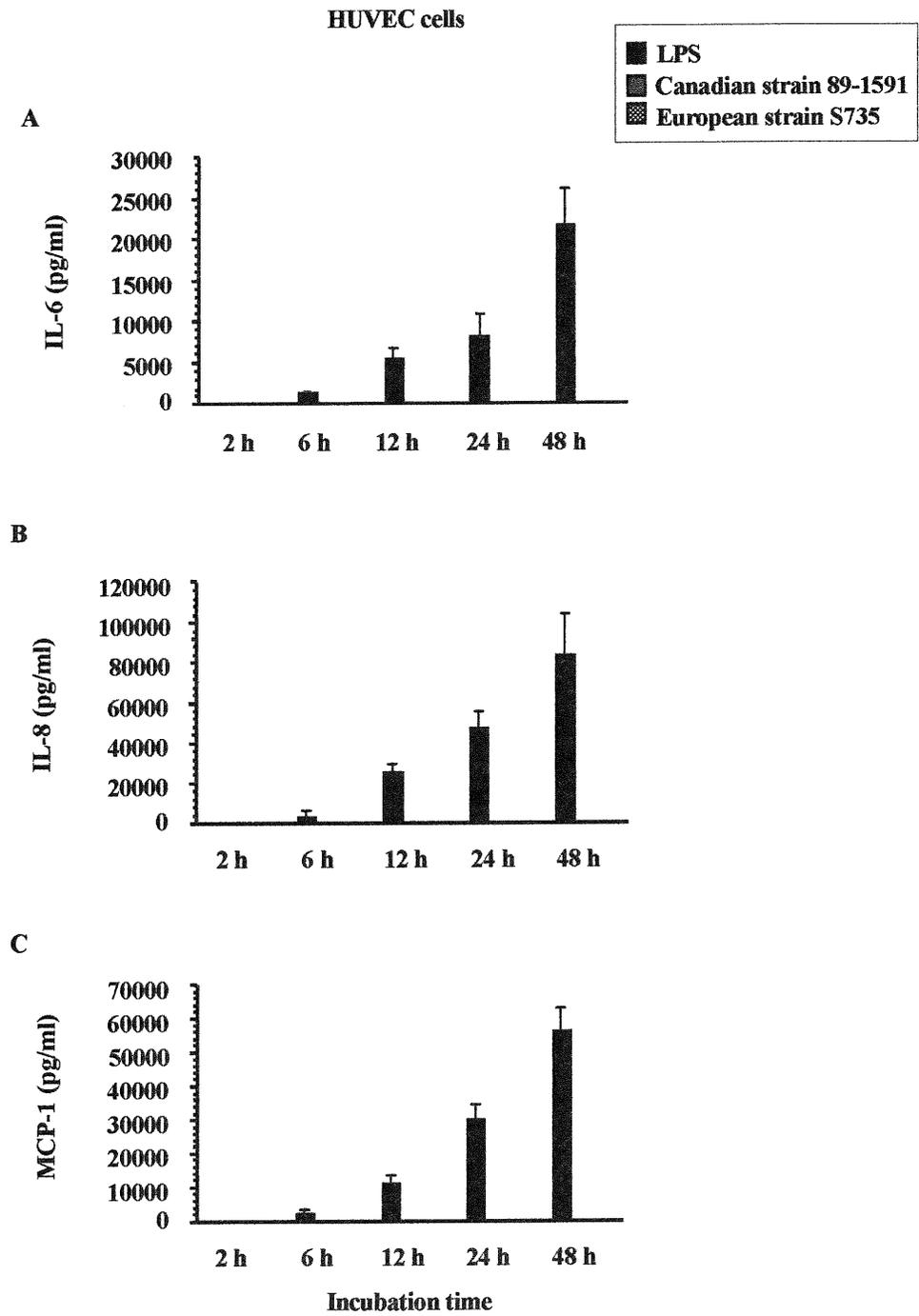
FIG. 1. Time course of production of IL-6 (A), IL-8 (B) and MCP-1 (C) by BMEC after stimulation with heat-killed *S. suis* serotype 2 (strains 89-1591 and S735; 10^9 CFU/ml). Purified LPS (10 μ g/ml) was used as a positive control. Culture supernatants were harvested at different time intervals and assayed for cytokine production by ELISA. Data are expressed as mean \pm standard deviations (in pg/ml). Values for basal cytokine expression (cell culture medium alone) were corrected from data obtained after *S. suis* or LPS stimulation.

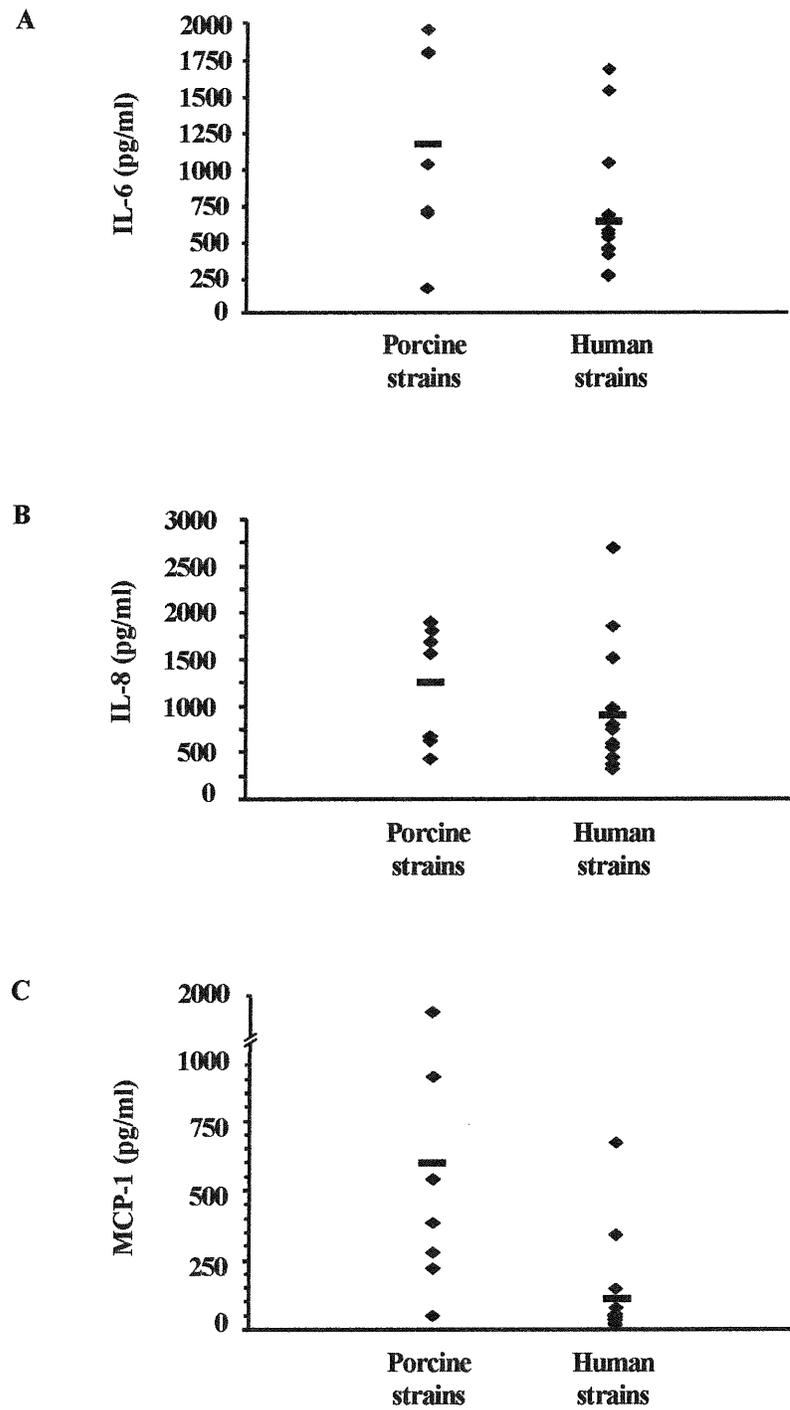
FIG. 2. Time course of production of IL-6 (A), IL-8 (B) and MCP-1 (C) by HUVEC after stimulation with heat-killed *S. suis* serotype 2 (strains 89-1591 and S735; 10^9 CFU/ml). Purified LPS (1 μ g/ml) was used as a positive control. Culture supernatants were harvested at different time intervals and assayed for cytokine production by ELISA. Data are expressed as mean \pm standard deviations (in pg/ml). Values for basal cytokine expression (cell culture medium alone) were corrected from data obtained after *S. suis* or LPS stimulation.

FIG. 3. Comparative study of cytokine production by different *S. suis* strains. BMEC were stimulated by heat-killed (10^9 CFU/ml) *S. suis* serotype 2 strains from human or porcine origin (Table 1). IL-6 (A), after 24 h incubation, and IL-8 (B) and MCP-1 (C) after 48 h incubation, were measured by ELISA titration of stimulated cell supernatants. Lines represent average cytokine production by each group of strains.

FIG. 4. Comparative study of IL-6 (A), IL-8 (B) and MCP-1 (C) production by different proposed virulence factors for *S. suis* serotype 2. BMEC were stimulated with different concentrations of purified polysaccharide capsule, cell wall or hemolysin; in addition, the cytokine induction by *S. suis* strain S735 was compared to that obtained with its unencapsulated mutant 2A. Data are expressed as mean \pm standard deviations (in pg/ml). Values for basal cytokine expression (cell culture medium alone) were corrected from data obtained after stimulation.

Figure 1. Vadeboncoeur *et al.*

Figure 2. Vadeboncoeur *et al.*

Figure 3. Vadeboncoeur *et al.*

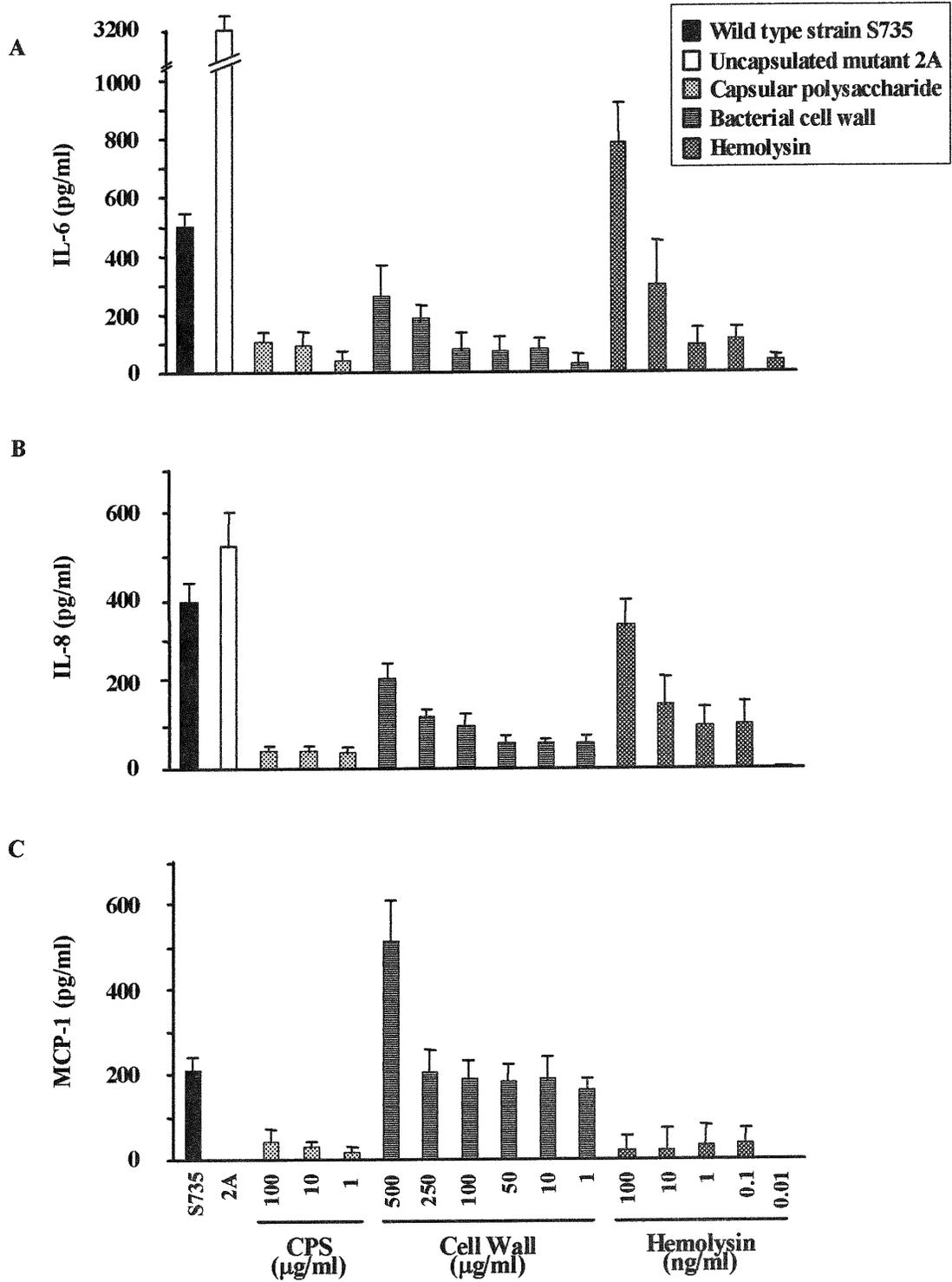


Figure 4. Vadeboncoeur *et al.*

TABLE 1. *S. suis* capsular type 2 strains of porcine and human origins used in this study

Strain	Origin	Virulence ^a	Geographic origin
31533	Diseased pig	V	France
S735 ^{b c}	Diseased pig	V	The Netherlands
D282	Diseased pig	V	The Netherlands
94-623	Pig, healthy carrier	NV	France
TD10	Pig, healthy carrier	NV	UK
89-1591 ^b	Diseased pig	V	Canada
90-1330	Diseased pig	NV	Canada
89-999	Diseased pig	V	Canada
Reims	Human; spondylodiscitis	NT	France
EUD95	Human; meningitis	NT	France
Biotype 2	Human; endocarditis	NT	France
HUD Limoge	Human; septic shock	NT	France
FRU95	Human; meningitis	NT	France
LEF95	Human; meningitis	NT	France
96-52466	Human; arthritis	NT	France
H11/1	Human; meningitis	V	UK
AR770353	Human; meningitis	NT	The Netherlands
AR770297	Human; meningitis	NT	The Netherlands
91-1804	Human; endocarditis	NT	Canada
94-3037	Human; meningitis	NT	Canada
98-3634	Human; endocarditis	NT	Canada
99-734723688	Human; septicaemia	NT	Canada

^a As indicated in the literature by using experimental porcine models (19, 25, 47). V: virulent; NV: non virulent; NT: never tested. Strain H11/1: P. Norton, personal communication.

^b Strains used as reference in the present work.

^c ATCC 43765 *S. suis* type 2 reference strain.

IV - DISCUSSION GÉNÉRALE DES RÉSULTATS

La pathogénèse des infections dues à *S. suis* sérotype 2 est très peu connue et il est probable qu'elle soit la résultante d'un procédé complexe comportant plusieurs étapes. Des études démontrent que la bactérie peut voyager à l'intérieur des monocytes (Williams & Blakemore, 1990a) ou librement dans la circulation sanguine (Charland *et al.*, 1996; Gottschalk & Segura, 2000; Smith *et al.*, 1997) et que la présence de la capsule polysaccharidique la protège de la phagocytose (Charland *et al.*, 1998). Toutefois, le mécanisme utilisé par *S. suis* sérotype 2 pour accéder à la circulation sanguine n'est pas connu. Lorsque la bactérie se retrouve au niveau de la circulation sanguine, elle doit passer à travers ou entre les cellules formant la BHM afin de causer l'infection. La BHM, constituée de la membrane arachnoïde, des BMEC et du plexus choroïde, est responsable du maintien de l'homéostasie au niveau du SNC (Tuomanen, 1996).

Plusieurs mécanismes peuvent permettre à une bactérie de passer la BHM et d'atteindre SNC. La majorité des pathogènes bactériens causant des méningites sont connus pour interagir directement (bactéries libres) avec les cellules de la BHM (Tuomanen, 1996). Il est aussi généralement accepté que les interactions bactéries-cellules endothéliales sont principalement caractérisées par l'adhésion spécifique de la bactérie avec comme conséquences l'invasion, la toxicité et/ou l'augmentation de la perméabilité. Néanmoins, le mécanisme utilisé par *S. suis* sérotype 2 pour franchir la BHM n'est pas connu. Très peu d'études portant sur les interactions entre *S. suis* et les cellules endothéliales sont disponibles. Les tests d'invasion démontrent que *S. suis* est capable d'adhérer aux BMEC mais pas de les envahir (Charland *et al.*, 2000). Cette adhérence aux BMEC peut avoir un rôle dans la pathogénèse de l'infection. En réponse à cette adhésion, il est possible que la bactérie sécrète des facteurs toxiques qui peuvent augmenter la perméabilité de la BHM.

L'augmentation de la perméabilité de la BHM peut aussi être causée par des médiateurs inflammatoires produits suite à l'adhésion de la bactérie aux BMEC. Des études effectuées dans notre laboratoire démontrent que *S. suis* est capable d'interagir avec les monocytes/macrophages et d'induire le relâchement de plusieurs cytokines et chémokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8 et le MCP-1 (Segura *et al.*, 1999; Segura *et al.*, 2002). Les cytokines pro-inflammatoires retrouvées

au niveau du LCR lors d'une méningite peuvent provenir des leukocytes ayant migrés mais aussi des astrocytes et des cellules endothéliales (Gottschalk & Segura, 2000). Il est démontré qu'une production importante de cytokines pro-inflammatoires par les BMEC est observée lorsque celles-ci sont stimulées avec d'autres cytokines ou avec des pathogènes bactériens (Cho *et al.*, 2001).

Bien que l'initiation de l'inflammation lors de méningite est attribuée à l'IL-1 et au TNF- α , (Saukkonen *et al.*, 1990; Spellerberg & Tuomanen, 1994), les résultats obtenus lors de cette étude indiquent que les BMEC que nous avons utilisées ne sont pas capables d'induire ces deux cytokines pro-inflammatoires après stimulation avec une forte dose de LPS ou directement avec *S. suis* et cela, même après une pré-stimulation avec de l'interféron gamma (résultats non publiés). Nous avons aussi testé la production d'IL-1 et de TNF- α par des cellules primaires. Des résultats similaires à ceux obtenus avec la ligné cellulaire ont été observés (résultats non publiés). Des études effectuées par RT-PCR confirment qu'aucun ARNm codant pour l'IL-1 ou le TNF- α n'est détecté après une stimulation de nos BMEC avec du LPS (A. Prat et J. Antel, Institut de Neurologie de Montréal, communications personnelles, 2001). De plus, selon nos résultats, aucune production d'IL-1 et de TNF- α par des HUVEC n'est observée.

Il est rapporté que *S. oral viridans* est capable d'induire le relâchement d'IL-6 et d'IL-8 mais non d'IL-1 et de TNF- α par des cellules endothéliales (Vernier *et al.*, 1996). D'autres études démontrent que des cellules endothéliales stimulées avec *N. meningitidis* sont capables de produire du TNF- α seulement en présence de monocytes (Taha, 2000). Par ailleurs, d'autres études démontrent la capacité des cellules endothéliales de produire de l'IL-1 lors de stimulation avec du LPS ou des bactéries (Bourdoulous *et al.*, 1995; Miossec *et al.*, 1986; Yao *et al.*, 1995). Considérant que lors de la présente étude, aucune production d'IL-1 et de TNF- α n'a été observée après stimulation des BMEC avec divers contrôles positifs, il nous est impossible d'établir des conclusions concernant la capacité de *S. suis* sérotype 2 à induire ces deux cytokines pro-inflammatoires. Cependant, des études réalisées dans notre laboratoire démontrent la capacité de *S. suis* à induire la production d'IL-1 et de TNF- α par des monocytes humains (Segura *et al.*, 2002). Il est donc possible que l'IL-1 et le TNF- α joue un rôle d'amplification lors d'une

infection causée par *S. suis*. La BHM est un système complexe qui implique des interactions entre les BMEC, les astrocytes et les monocytes/macrophages.

Plusieurs études antérieures relatent un relâchement d'IL-6 et de différentes chémokines par des cellules endothéliales (Reyes *et al.*, 1999; Rose *et al.*, 2001; Soell *et al.*, 1995; Vernier *et al.*, 1996; Yao *et al.*, 1995). Selon les résultats de notre étude, *S. suis* est capable d'induire la production d'IL-6, d'IL-8 et de MCP-1 par des BMEC. Ces cytokines sont essentielles à la pathogénèse de la méningite. Entre autres, l'IL-6 possède plusieurs activités pro-inflammatoires telles que la maturation et l'activation des neutrophiles, la maturation des macrophages et la production d'IL-1 et de TNF- α (Curfs *et al.*, 1997). L'IL-8 et le MCP-1 permettent le recrutement des leukocytes au niveau du SNC. Les neutrophiles et les macrophages ainsi recrutés sont une source importante de cytokines produites localement. Les cellules endothéliales des microvaisseaux et les astrocytes sont aussi des sources de cytokines au niveau du SNC. Cette production locale de cytokines pro-inflammatoires et de chémokines va entre autres, augmenter la perméabilité de la BHM (Spellerberg & Tuomanen, 1994). De plus, les monocytes jouent un rôle dans le transport de certains pathogènes bactériens causant des méningites (Tuomanen, 1996). L'hypothèse que *S. suis* puisse traverser la BHM associé aux leukocytes ou à l'intérieur de ces derniers a été suggérée (Gottschalk & Segura, 2000; Segura *et al.*, 1998; Williams & Blakemore, 1990a).

Nous avons aussi effectué des études de production de cytokines avec des HUVEC. Une forte production d'IL-6, d'IL-8 et de MCP-1 a été observée lorsque les cellules ont été stimulées avec du LPS. Cependant, lors de stimulation avec *S. suis*, aucune production de cytokines n'a été détectée. Selon nos résultats, les HUVEC sont plus sensibles au LPS que les BMEC. Des études démontrent que *S. suis* est capable d'adhérer aux BMEC mais pas aux HUVEC (Charland *et al.*, 2000). L'adhésion de *S. suis* aux BMEC est une explication possible de cette production de cytokines. De plus, comme il est rapporté, l'adhésion cellulaire de certains pathogènes bactériens est essentielle à la production de cytokines (Wilson & Drevets, 1998). Par exemple, *S. bovis* et *N. meningitidis* induisent la production de cytokines seulement après avoir adhéré aux cellules de l'hôte (Ellmerich *et al.*, 2000; Taha, 2000). Il est intéressant de noter que *S. suis* n'est pas capable d'envahir les BMEC et les HUVEC (Charland *et al.*, 2000). Il a

récemment été rapporté que *L. monocytogenes* induit une production de cytokines par des cellules endothéliales sans invasion cellulaire (Rose *et al.*, 2001). De plus, *S. suis* est capable d'adhérer aux monocytes sans être ingéré et cette interaction résulte en une forte production de cytokines pro-inflammatoires (Segura *et al.*, 2002).

S. suis a été isolé à plusieurs reprises à partir de cas de méningite, de septicémie et d'endocardite chez des humains (Higgins & Gottschalk, 1999). Cependant, les études utilisant des souches d'origine humaine sont très limitées. Considérant que les cellules utilisées lors de notre étude sont d'origine humaine, nous avons effectué une étude comparative entre la capacité d'induction de cytokines par des souches d'origine porcine et par des souches d'origine humaine. Nos résultats démontrent une production très hétérogène de cytokines et aucune tendance pour les souches d'origine humaine à induire un niveau de cytokines supérieur à celui obtenu avec les souches d'origine porcine. Cette hétérogénéité est probablement due au degré d'exposition et/ou au type de composants présents à la surface des bactéries et qui possèdent la capacité d'induire le relâchement de cytokines par les cellules endothéliales. De plus, puisque ce sont les personnes en contact avec les porcs et les produits du porc qui sont le plus à risque de développer des infections dues à *S. suis*, il a été suggéré que la bactérie puisse se transmettre de l'animal à l'humain (Chatellier *et al.*, 1999; Tarradas *et al.*, 2001b). Ainsi, les souches isolées à partir de cas humains auraient en fait une origine porcine. Cela pourrait expliquer pourquoi nos souches d'origine humaine ne démontrent pas de tropisme pour les cellules endothéliales humaines. Cependant, il est important de noter que même si des implications épidémiologiques du porc dans les cas d'infection à *S. suis* chez l'humain ont été démontrées, quelques cas d'infection chez des personnes ne travaillant pas dans l'industrie porcine ont été rapportés (Leelarasamee *et al.*, 1997).

De plus, nous avons comparé la capacité de souches virulentes et de souches non-virulentes de *S. suis* à induire la production d'IL-6, d'IL-8 et de MCP-1. Selon nos résultats, aucune association entre la production de cytokines et la virulence de la souche n'a pu être établie. Des résultats similaires ont été obtenus lors d'études avec des monocytes (Segura *et al.*, 2002). Il est relaté que pour d'autres espèces bactériennes, la virulence n'est pas nécessairement reliée au niveau de production de cytokines (Giguère & Prescott, 1998). Des études démontrent que, contrairement aux souches non-virulentes

de *S. suis* qui sont rapidement éliminées, les souches virulentes sont capables de se maintenir à une forte concentration dans la circulation sanguine durant plus de six jours (Berthelot-Hérault *et al.*, 2001). Il a donc été suggéré que seules les souches virulentes de *S. suis* sont capables de survivre en quantité suffisante dans la circulation sanguine pour induire l'infection (Gottschalk & Segura, 2000). Il est intéressant de mentionner que selon nos résultats, et ceux d'études antérieures (Segura *et al.*, 1999; Segura *et al.*, 2002), une forte concentration bactérienne est nécessaire à l'induction de cytokines pro-inflammatoires.

Plusieurs facteurs de virulence sont proposés pour *S. suis* sérotype 2 (Gottschalk & Segura, 2000; Staats *et al.*, 1997). Néanmoins, l'effet de ces facteurs de virulence potentiels sur la production de cytokine est très peu connu. Il est démontré que la paroi cellulaire est principalement responsable de l'induction de cytokines par les macrophages murins et que la présence de capsule affecte la production d'IL-6 et de TNF- α par ces même cellules (Segura *et al.*, 1999). Nous avons donc étudié la production de cytokines par différentes concentrations de paroi cellulaire ou de CPS.

Selon nos résultats, la paroi cellulaire est capable d'induire le relâchement d'IL-6 et d'IL-8 par les BMEC. Il a été suggéré que les inflammations causées par des bactéries non-capsulées seraient dues à l'exposition de la paroi cellulaire ou à la sécrétion de composants de la paroi lors de la croissance bactérienne (Tuomanen, 1996). Il est démontré que des antigènes de paroi de *S. bovis* sont capables d'induire la production de différentes cytokines par des cellules endothéliales, épithéliales et phagocytaires (Ellmerich *et al.*, 2000). Le rôle de la paroi cellulaire de *S. suis* dans l'induction de cytokines a été confirmée par l'utilisation du mutant non-capsulé 2A (Charland *et al.*, 1998) qui induit un niveau supérieur d'IL-6 et d'IL-8 par les BMEC lorsque comparé à la souche capsulée parentale. Il est aussi démontré que pour certains pathogènes bactériens, des composantes de la paroi cellulaire sont responsables de l'adhésion aux cellules de l'hôte (Andersson *et al.*, 1988). En ce qui concerne *S. suis*, la paroi semble responsable de l'adhésion aux cellules épithéliales puisque 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 de cellules épithéliales testées par Lalonde *et al.* (Lalonde *et al.*, 2000). Des résultats similaires sont rapportés pour des mutants spontanés

acapsulés de *S. suis* serotype 2 (Salasia *et al.*, 1995). Cependant, la capacité du mutant 2A à induire un niveau plus élevé d'IL-6 et d'IL-8 que celui obtenu avec la souche parentale n'est probablement pas due à un niveau supérieur d'adhésion aux BMEC puisque des études démontrent que le mutant 2A et la souche parentale possèdent un niveau d'adhésion similaire (Charland *et al.*, 2000).

Selon nos résultats, la capsule n'est pas responsable de l'induction de cytokines par les BMEC. Des résultats similaires sont rapportés concernant les macrophages murins (Segura *et al.*, 1999). Néanmoins, la capsule de *S. suis* peut contribuer indirectement à l'induction de cytokines. La capsule peut contribuer à la dissémination de la bactérie de même qu'à sa survie en la protégeant de la phagocytose (Charland *et al.*, 1996).

Les hémolysines sont souvent impliquées comme facteur de virulence dans plusieurs types d'infection. L'hémolysine de *S. suis* est nommée suilysine et son mode d'action est de former des pores transmembranaires sur les cellules cibles (Gottschalk *et al.*, 1995a; Jacobs *et al.*, 1994). Il a été suggéré qu'une fois adhérent aux cellules endothéliales, *S. suis* pourrait sécréter de l'hémolysine qui aurait comme conséquences d'endommager les cellules de la BHM et d'augmenter la perméabilité de cette dernière. La toxicité de l'hémolysine pour les BMEC a été démontrée (Charland *et al.*, 2000). Des études récentes rapportent qu'une fois la bactérie parvenue dans la circulation, la suilysine n'est pas nécessaire à l'infection des méninges. Il a été suggéré que la suilysine aurait plutôt un rôle dans l'augmentation de la gravité des signes cliniques et dans l'augmentation de la capacité à coloniser les organes (Allen *et al.*, 2001). Il est à noter que, dans notre étude, des bactéries tuées à la chaleur et lavées (donc libres de suilysine) ont été utilisées pour stimuler la production de cytokines par les BMEC.

Il a récemment été démontré que la listériolysine de *L. monocytogenes* est majoritairement responsable de la production de cytokines par les cellules endothéliales (Rose *et al.*, 2001). Nous avons donc évalué le rôle de la suilysine de *S. suis* dans l'induction de cytokines. Dans cette étude, de la suilysine purifiée selon les protocoles établis (Jacobs *et al.*, 1994) et réactivée par l'addition de 2-mercaptoéthanol a été utilisée pour stimuler les BMEC. Selon les résultats obtenus lors de cette étude, la suilysine est

capable d'induire une forte production d'IL-6 et d'IL-8 par les BMEC. On peut donc suggérer que la suilysine de *S. suis* contribue à amplifier la réponse inflammatoire de l'hôte. De plus, il est démontré qu'un mutant hémolysine-négative n'est plus virulent chez la souris et moins virulent que la souche-mère chez le porc (Allen *et al.*, 2001).

Les résultats que nous avons obtenus concernant la production de MCP-1 lors de stimulation avec différents composants purifiés de *S. suis* présentent des variations par rapport à ceux obtenus pour la production d'IL-6 et d'IL-8. Les cellules utilisées lors de cette étude n'ont pas été activées par la capsule purifiée mais étaient extrêmement sensibles à la paroi cellulaire purifiée. Une très faible concentration de paroi cellulaire (1µg/ml) a induit un niveau de production de MCP-1 similaire à celui obtenu lors de stimulation avec la bactérie entière. Cependant, aucune production de MCP-1 n'a été observée lors de stimulation des BMEC avec le mutant 2A. Il est intéressant de noter que la paroi cellulaire purifiée a été produite à partir de ce mutant (Segura *et al.*, 2002). Ces observations suggèrent que la conformation du mutant 2A ne permet pas l'expression des facteurs induisant le relâchement de MCP-1. Par contre, il est possible que lors de la purification, les méthodes utilisées permettent aux molécules de la paroi responsables de l'induction de MCP-1 d'être disponibles de nouveau. De plus, bien que les gènes responsables de la production de la capsule du mutant 2A ne sont pas affectés, ceux responsables de la production de la paroi cellulaire pourrait avoir été modifiés. Des études démontrent que la capsule purifiée de *S. suis* n'influence pas la production d'IL-6 par les monocytes murins mais l'absence de capsule (utilisation du mutant 2A) entraîne une augmentation de la production de TNF- α , suggérant que les molécules de la paroi étant responsables de l'induction de ces deux cytokines sont différentes (Segura *et al.*, 1999). Finalement, selon nos résultats, la suilysine n'est pas capable d'induire le relâchement de MCP-1 par les BMEC.

Le fait que *S. suis* est capable d'induire le relâchement de plusieurs cytokines supporte l'hypothèse que ces médiateurs immunorégulateurs peuvent agir comme modulateur de la réponse immunitaire de l'hôte lors d'infection causée par *S. suis*. Ces cytokines produites par la BHM pourraient permettre une augmentation de la perméabilité de la BHM, une augmentation de la pression intracrânienne et le

recrutement des leukocytes. Pour certains pathogènes bactériens, la production de cytokines est nécessaire au franchissement de la BHM comme par exemple lors d'infection à *S. pneumoniae* où la réponse inflammatoire de l'hôte va permettre l'expression d'un nouveau récepteur à la surface des cellules endothéliales, entraînant l'adhésion et l'invasion des cellules par la bactérie (Cundell *et al.*, 1995b; Cundell *et al.*, 1996). Les cytokines induites par *S. suis* pourraient elles aussi induire la présentation de nouveaux récepteurs à la surface des cellules endothéliales comme dans le cas de *S. pneumoniae*.

Des études démontrent qu'une pré-activation des cellules endothéliales avec des cytokines pro-inflammatoires augmente l'adhésion et l'invasion cellulaire par certains pathogènes bactériens tel que *S. aureus* et *S. pneumoniae* (Cheung *et al.*, 1991; Cundell *et al.*, 1995b). Par ailleurs, les auteurs d'une étude portant sur l'invasion des cellules endothéliales humaines par *Actinobacillus actinomycetemcomitans* rapportent qu'une pré-incubation avec du TNF- α n'influence pas l'invasion (Schenkein *et al.*, 2000). Nous avons donc étudié l'effet de certaines cytokines produites lors de méningite sur l'invasion des BMEC par *S. suis*. Nous avons effectué une pré-incubation de 24h des BMEC avec de l'IL-1, de l'IL-6, de l'IL-8, du TNF- α , du MCP-1 ou une combinaison d'IL-1 et de TNF- α . Comme mentionné précédemment, bien que le TNF- α et l'IL-1 ne sont pas produits par nos BMEC lors de stimulation avec *S. suis*, ils le sont par d'autres cellules de l'hôte tel que les monocytes/macrophages (Segura *et al.*, 1999; Segura *et al.*, 2002). Les BMEC sont donc en présence de ces cytokines pro-inflammatoires lors de méningite due à *S. suis*. Selon les résultats obtenus lors de cette étude, aucune pré-incubation des BMEC n'a favorisé l'invasion (ANNEXE 1). Ces observations appuient l'hypothèse que le mécanisme utilisé par *S. suis* pour accéder au SNC est différent de celui utilisé par des pathogènes tels que GBS ou *S. pneumoniae* qui envahissent les cellules endothéliales (Charland *et al.*, 2000).

V - CONCLUSIONS

S. suis sérotype 2 est capable d'induire la production d'IL-6, d'IL-8 et de MCP-1 par des BMEC alors qu'aucune production par des HUVEC (stimulées avec *S. suis*) n'est observée. Nous pouvons donc suggérer que la stimulation sélective de *S. suis* aux cellules BMEC est la conséquence de l'adhésion des bactéries aux cellules.

La production de cytokines par des BMEC stimulées par *S. suis* est temps et dose- dépendante et une concentration bactérienne élevée semble nécessaire.

La comparaison de l'induction de cytokines par plusieurs souches de *S. suis* d'origine porcine et humaine démontre une production très hétérogène. Nous ne pouvons donc établir aucune relation entre l'origine des souches, leur provenance géographique ou leur virulence.

Selon les résultats obtenus durant ce projet, nous pouvons suggérer que les cytokines produites par les BMEC entraînent une augmentation de la perméabilité de la BHM permettant ainsi le passage de la bactérie jusqu'au niveau du SNC.

VI - BIBLIOGRAPHIE

Alexander, T. (1995). *Streptococcus suis*: Pathogenesis and host response. *Allen D. Lemay Swine Conference*, 49-53.

Allen, A. G., Bolitho, S., Lindsay, H., Khan, S., Bryant, C., Norton, P., Ward, P., Leigh, J., Morgan, J., Riches, H., Eastty, S. & Maskell, D. (2001). Generation and characterization of a defined mutant of *Streptococcus suis* lacking suilysin. *Infect Immun* **69**, 2732-2735.

Aloisi, F., Care, A., Borsellino, G., Gallo, P., Rosa, S., Bassani, A., Cabibbo, A., Testa, U., Levi, G. & Peschle, C. (1992). Production of hemolymphopoietic cytokines (IL-6, IL-8, colony-stimulating factors) by normal human astrocytes in response to IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* **149**, 2358-2366.

Andersson, B., Beachey, E. H., Tomasz, A., Tuomanen, E. & Svanborg-Eden, C. (1988). A sandwich adhesin on *Streptococcus pneumoniae* attaching to human oropharyngeal epithelial cells in vitro. *Microb. Pathog.* **4**, 267-278.

Arends, J. P. & Zanen, H. (1988). Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *Rev Infect Dis* **10**, 131-137.

Aschner, M. (1998). Astrocytes as mediators of immune and inflammatory responses in the CNS. *Neurotoxicology* **19**, 269-281.

Benkirane, R., Gottschalk, M. & Dubreuil, J. D. (1997). Identification of a *Streptococcus suis* 60-kDa heat-shock protein using Western blotting. *FEMS Microbiol Lett* **153**, 379-385.

Berthelot-Hérault, F., Morvan, H., Kéribin, A. M., Gottschalk, M. & Kobisch, M. (2000). Production of muramidase-released protein (MRP), extracellular factor (EF) and suilysin by field isolates of *Streptococcus suis* capsular types 2, 1/2, 9, 7, and 3 isolated from swine in France. *Vet Res* **31**, 473-479.

Berthelot-Hérault, F., Cariolet, R., Labbé, A., Gottschalk, M., Cardinal, J. Y. & Kobisch, M. (2001). Experimental infection of specific pathogen free piglets with French strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. *Can J Vet Res* **65**, 196-200.

Bourdoulous, S., Bensaid, A., Martinez, D., Sheikboudou, C., Trap, I., Strosberg, A. D. & Couraud, P. O. (1995). Infection of bovine brain microvessel endothelial cells with *Cowdria ruminantium* elicits IL-1 beta, -6, and -8 mRNA production and expression of an unusual MHC class II DQ alpha transcript. *J Immunol* **154**, 4032-4038.

Brassard, J., Gottschalk, M. & Quessy, S. (2001). Decrease of the adhesion of *Streptococcus suis* serotype 2 mutants to embryonic bovine tracheal cells and porcine tracheal rings. *Can J Vet Res* **65**, 156-160.

Brazeau, C., Gottschalk, M., Vincelette, S. & Martineau-Doizé, B. (1996). In vitro phagocytosis and survival of *Streptococcus suis* capsular type 2 inside murine macrophages. *Microbiology* **142**, 1231-1237.

Brousseau, R., Hill, J. E., Préfontaine, G., Goh, S. H., Harel, J. & Hemmingsen, S. M. (2001). *Streptococcus suis* serotype characterized by analysis of chaperonin 60 gene sequences. *Appl Environ Microbiol* **67**, 4828-4833.

Busque, P., Higgins, R., Senechal, S., Marchand, R. & Quessy, S. (1998). Simultaneous flow cytometric measurement of *Streptococcus suis* phagocytosis by polymorphonuclear and mononuclear blood leukocytes. *Vet Microbiol* **63**, 229-238.

Cerami, A. (1992). Inflammatory cytokines. *Clin Immunol Immunopathol* **62**, S3-10.

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

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. E., Kim, K. S., 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.

Chatellier, S., Harel, J., Zhang, Y., Gottschalk, M., Higgins, R., Devriese, L. A. & Brousseau, R. (1998). Phylogenetic diversity of *Streptococcus suis* strains of various serotypes as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison. *Int J Sys Bacteriol* **48**, 581-589.

Cheung, A. L., Koomey, J. M., Lee, S., Jaffe, E. A. & Fischetti, V. A. (1991). Recombinant human tumor necrosis factor alpha promotes adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured human endothelial cells. *Infect Immun* **59**, 3827-3831.

Chin, K. C. & Fitzhardinge, P. M. (1985). Sequelae of early-onset group B hemolytic *streptococcal* neonatal meningitis. *J Pediatr* **106**, 819-822.

Cho, N., Seong, S., Choi, M. & Kim, I. (2001). Expression of chemokine genes in human dermal microvascular endothelial cell lines infected with *Orientia tsutsugamushi*. *Infect. Immun.* **69**, 1265-1272.

Christley, R. M., Hodgson, D. R., Rose, R. J., Wood, J. L. N., Reid, S. W. J., Whitear, K. G. & Hodgson, J. L. (2001). A case-control study of respiratory disease in thoroughbred racehorses in Sydney, Australia. *Equine Vet J* **33**, 256-264.

Clifton-Hadley, F. A., Alexander, T. I. L. & Enright, M. (1986). The epidemiology, diagnosis, treatment and control of *Streptococcus suis* type 2 infection. *Proc Ann Meet Am Assoc Swine Pract*, 471-491.

Cundell, D., Masure, H. R. & Tuomanen, E. I. (1995a). The molecular basis of pneumococcal infection: a hypothesis. *Clin Infect Dis* **21 Suppl 3**, S204-211.

Cundell, D. R. & 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.

Cundell, D. R., Gerard, N. P., Gerard, C., Idanpaan-Heikkila, I. & Tuomanen, E. I. (1995b). *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* **377**, 435-438.

Cundell, D. R., Gerard, C., Idanpaan-Heikkila, I., Tuomanen, E. I. & Gerard, N. P. (1996). PAF receptor anchors *Streptococcus pneumoniae* to activated human endothelial cells. *Adv Exp Med Biol* **416**, 89-94.

Curfs, J. H., Meis, J. F. & Hoogkamp-Korstanje, J. A. (1997). A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev* **10**, 742-780.

Das, A., Asatryan, L., Reddy, M. A., Wass, C. A., Stins, M. F., Joshi, S., Bonventre, J. V. & Kim, K. S. (2001). Differential role of cytosolic phospholipase A2 in the invasion brain microvascular endothelial cells by *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *J Infect Dis* **184**, 732-737.

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.

Devriese, L. A., Cruz-Colque, J. I. C., de Herdt, P. & Haesebrouck, F. (1992). Identification and composition of the tonsillar and anal *enterococcal* and *streptococcal* flora of dogs and cats. *J Appl Bacteriol* **73**, 421-425.

Devriese, L. A., Ceyskens, K., Hommez, J., Kilpper-Balz, R. & Schleifer, K. H. (1991). Characteristics of different *Streptococcus suis* ecovars and description of a simplified identification method. *Vet Microbiol* **26**, 141-150.

Devriese, L. A., Haesebrouck, F., de Herdt, P., Dom, P., Ducatelle, R., Desmidt, M., Messier, S. & Higgins, R. (1994). *Streptococcus suis* infections in birds. *Avian Pathol* **23**, 721-724.

Drevets, D. A. (1998). *Listeria monocytogenes* virulence factors that stimulate endothelial cells. *Infect Immun* **66**, 232-238.

Drevets, D. A. (1999). Dissemination of *Listeria monocytogenes* by infected phagocytes. *Infect Immun* **67**, 3512-3517.

Drevets, D. A., Sawyer, R. T., Potter, T. A. & Campbell, P. A. (1995). *Listeria monocytogenes* infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. *Infect Immun* **63**, 4268-4276.

Dupas, D., Vignon, M. & Geraut, C. (1992). *Streptococcus suis* meningitis. A severe noncompensated occupational disease. *J Occup Med* **34**, 1102-1105.

Ehrlich, L. C., Hu, S., Sheng, W. S., Sutton, R. L., Rockswold, G. L., Peterson, P. K. & Chao, C. C. (1998). Cytokine regulation of human microglial cell IL-8 production. *J Immunol* **160**, 1944-1948.

Elliott, S. D. (1966). *Streptococcal* infection in young pigs. I. An immunochemical study of the causative agent (PM *Streptococcus*). *J Hyg (Lond)* **64**, 205-212.

Ellmerich, S., Djouder, N., Scholler, M. & Klein, J. P. (2000). Production of cytokines by monocytes, epithelial and endothelial cells activated by *Streptococcus bovis*. *Cytokine* 12, 26-31.

Field, H. I., Buntain, D. & Done, J. t. (1954). Studies on piglet mortality. I. *Streptococcal* meningitis and arthritis. *Vet Rec* 66, 453-455.

Giguère, S. & Prescott, J. F. (1998). Cytokine induction in murine macrophages infected with virulent and avirulent *Rhodococcus equi*. *Infect. Immun.* 66, 1848-1854.

Glabinski, A. R. & Ransohoff, R. M. (1999). Sentries at the gate: chemokines and the blood-brain barrier. *J Neurovirol* 5, 623-634.

Gottschalk, M. & Segura, M. (2000). The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet Microbiol* 76, 259-272.

Gottschalk, M., Kobisch, M. & Berthelot-Hérault, F. (2001). L'infection à *Streptococcus suis* chez le porc: revue générale. *Journées recherche porcine en France* 33, 269-276.

Gottschalk, M., Higgins, R., Jacques, M. & Dubreuil, D. (1992). Production and characterization of two *Streptococcus suis* capsular type 2 mutants. *Vet Microbiol* 30, 59-71.

Gottschalk, M., Kolberg, J., Charland, N. & Jacques, M. (1995a). *Streptococcus pneumoniae* types 19A and 19F and *Streptococcus suis* capsular type 8 share common capsular epitopes. *J Clin Microbiol* 33, 2492-2495.

Gottschalk, M., Higgins, R., Jacques, M., Mittal, K. R. & Henrichsen, J. (1989). Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol* 27, 2633-2636.

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

Greiffenberg, L., Goebel, W., Kim, K. S., Daniels, J. & Kuhn, M. (2000). Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: an electron microscopic study. *Infect Immun* **68**, 3275-3279.

Greiffenberg, L., Sokolovic, Z., Schnittler, H. J., Spory, A., Bockmann, R., Goebel, W. & Kuhn, M. (1997). *Listeria monocytogenes*-infected human umbilical vein endothelial cells: internalin-independent invasion, intracellular growth, movement, and host cell responses. *FEMS Microbiol Lett* **157**, 163-170.

Haataja, S., Tikkanen, K., Liukkonen, J., Francois-Gerard, C. & 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.

Halaby, T., Hoitsma, E., Hupperts, R., Spanjaard, L., Luirink, M. & Jacobs, J. (2000). *Streptococcus suis* meningitis, a poacher's risk. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19**, 943-945.

Heumann, D., Barras, C., Severin, A., Glauser, M. P. & Tomasz, A. (1994). Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes. *Infect Immun* **62**, 2715-2721.

Higgins, R. & Gottschalk, M. (1989). L'infection à *Streptococcus suis*: Une zoonose méconnue. *Med Vet Queb* **19**, 161-166.

Higgins, R. & Gottschalk, M. (1990). An update on *Streptococcus suis* identification. *J Vet Diagn Invest* **2**, 249-252.

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

Higgins, R. & Gottschalk, M. (2001). Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in 2000. *Can Vet J* **42**, 223.

Higgins, R., Gottschalk, M., Boudreau, M., Lebrun, A. & Henrichsen, J. (1995). Description of six new capsular types (29-34) of *Streptococcus suis*. *J Vet Diagn Invest* **7**, 405-406.

Hommez, J., Wullepit, P., Cassimon, P., Castryck, F., Ceysen, K. & Devriese, L. A. (1988). *Streptococcus suis* and other streptococcal species as a cause of extramammary infection in ruminants. *Vet Rec* **123**, 626-627.

Huang, S. H. & Jong, A. Y. (2001). Cellular mechanisms of microbial proteins contributing to invasion of the blood-brain barrier. *Cell Microbiol* **3**, 277-287.

Jacobs, A. A. C., Loeffen, P. L. W., van der Berg, A. J. G. & Storm, P. K. (1994). Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*. *Infect Immun* **62**, 1741-1748.

Janabi, N., Hau, I. & Tardieu, M. (1999). Negative feedback between prostaglandin and alpha- and beta-chemokine synthesis in human microglial cells and astrocytes. *J Immunol* **162**, 1701-1706.

Jansen, E. J. & van Dorsen, C. A. (1951). Meningoencephalitis bij varkens door streptococcen. *Tijdschr Diergeneeskd* **76**, 815-832.

Kayal, S., Lilienbaum, A., Poyart, C., Memet, S., Israel, A. & Berche, P. (1999). Listeriolysin O-dependent activation of endothelial cells during infection with *Listeria monocytogenes*: activation of NF-kappa B and upregulation of adhesion molecules and chemokines. *Mol Microbiol* **31**, 1709-1722.

Kazatchkine, M. D., Fearon, D. T. & Austen, K. F. (1979). Human alternative complement pathway: membrane-associated sialic acid regulates the competition between B and beta I H for cell-bound C3b. *J Immunol* **122**, 75-81.

Kilpper-Balz, R. & Schleifer, K. H. (1987). *Streptococcus suis* sp. nov., nom. rev. *Int J Syst Bacteriol* **37**, 160-162.

Klein, B. D., White, H. S. & Callahan, K. S. (2000). Cytokine and intracellular signaling regulation of tissue factor expression in astrocytes. *Neurochem Int* **36**, 441-449.

Krishnaswamy, G., Kelley, J., Yerra, L., Smith, J. K. & Chi, D. S. (1999). Human endothelium as a source of multifunctional cytokines: molecular regulation and possible role in human disease. *J Interferon Cytokine Res* **19**, 91-104.

Lalonde, M., Segura, M., Lacouture, S. & Gottschalk, M. (2000). Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines. *Microbiology* **146**, 1913-1921.

Lapinet, J. A., Scapini, P., Calzetti, F., Perez, O. & Cassatella, M. A. (2000). Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta (IL-1beta), IL-8, macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and gamma interferon-inducible protein 10 by human neutrophils stimulated with group B meningococcal outer membrane vesicles. *Infect Immun* **68**, 6917-6923.

Lee, S. C., Liu, W., Dickson, D. W., Brosnan, C. F. & Berman, J. W. (1993). Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *J Immunol* **150**, 2659-2667.

Leclarasamee, A., Nilakul, C., Tien-Grim, S., Srifuengfung, S. & Susaengrat, W. (1997). *Streptococcus suis* toxic-shock syndrome and meningitis. *J. Med. assoc. Thai.* **80**, 63-68.

- Mantovani, A., Bussolino, F. & Dejana, E. (1992).** Cytokine regulation of endothelial cell function. *Faseb J* **6**, 2591-2599.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Vecchi, A., Introna, M. & Allavena, P. (1997).** Cytokine activation of endothelial cells: new molecules for an old paradigm. *Thromb Haemost* **78**, 406-414.
- Miossec, P., Cavender, D. & Ziff, M. (1986).** Production of interleukin 1 by human endothelial cells. *J Immunol* **136**, 2486-2491.
- Nassif, X. (1996).** Physiologie des méningites purulentes. *Médecine des Maladies Infectieuses*. **26**, 1016-1021.
- 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.
- Oh, J. W., Schwiebert, L. M. & Benveniste, E. N. (1999).** Cytokine regulation of CC and CXC chemokine expression by human astrocytes. *J Neurovirol* **5**, 82-94.
- Perch, B., Kjems, E., Slot, P. & Pedersen, K. B. (1981).** Biochemical and serological properties of R, S and RS *streptococci*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **B89**, 167-171.
- Pritzlaff, C. A., Chang, J. C., Kuo, S. P., Tamura, G. S., Rubens, C. E. & Nizet, V. (2001).** Genetic basis for the beta-haemolytic/cytolytic activity of group B *Streptococcus*. *Mol Microbiol* **39**, 236-247.
- Quadriarello, V. & W.M., S. (1992).** Bacterial meningitis: pathogenesis, pathophysiology, and progress. *N Engl J Med* **7**, 864-872.

Quessy, S., Busque, P., Higgins, R., Jacques, M. & Dubreuil, J. D. (1997). Description of an albumin binding activity for *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Microbiol Lett* **147**, 245-250.

Rasmussen, S. R. & Andresen, L. O. (1998). 16S rDNA sequence variations of some *Streptococcus suis* serotype. *Int J Sys Bacteriol* **48**, 1063-1065.

Reams, R. Y., Glickman, L. T., Harrington, D. D., Thacker, H. L. & 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. *1994* **6**, 326-334.

Reyes, T. M., Fabry, Z. & Coe, C. L. (1999). Brain endothelial cell production of a neuroprotective cytokine, interleukin-6, in response to noxious stimuli. *Brain Res.* **851**, 215-220.

Ring, A., Weiser, J. N. & Tuomanen, E. I. (1998). *Pneumococcal* trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *J Clin Invest* **102**, 347-360.

Rose, F., Zeller, S. A., Chakraborty, T., Domann, E., Machleidt, T., Kronke, M., Seeger, W., Grimminger, F. & Sibelius, U. (2001). Human endothelial cell activation and mediator release in response to *Listeria monocytogenes* virulence factors. *Infect Immun* **69**, 897-905.

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

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

Saukkonen, K., Sande, S., Cioffe, C., Wolpe, S., Sherry, B., Cerami, A. & Tuomanen, E. (1990). The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental gram-positive meningitis. *J. Exp. Med.* **171**, 439-448.

Schenkein, H. A., Barbour, S. E., Berry, C. R., Kipps, B. & Tew, J. G. (2000). Invasion of human vascular endothelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* via the receptor for platelet-activating factor. *Infect Immun* **68**, 5416-5419.

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

Segura, M., Stankova, J. & Gottschalk, M. (1999). 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., Vadeboncoeur, N. & Gottschalk, M. (2002). CD14-dependent and -independent cytokine and chemokine production by human monocytes stimulated by *Streptococcus suis* capsular type 2. *Clin Exp Immunol* **sous presse**.

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

Shigeoka, A. O., Rote, N. S., Santos, J. I. & 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. E., Wisselink, H. J., Stockhofe-Zurwieden, N., Vecht, U. & Smits, M. M. (1997). Virulence markers of *Streptococcus suis* type 1 and 2. *Adv Exp Med Biol* **418**, 651-655.

Smith, H. E., Buijs, H., Wisselink, H. J., Stockhofe-Zurwieden, N. & Smits, M. A. (2001). Selection of virulence-associated determinants of *Streptococcus suis* serotype 2 by in vivo complementation. *Infect Immun* **69**, 1961-1966.

Smith, H. E., Damman, M., J. v. d. V., Wagenaar, F., Wisselink, H. J., Stockhofe-Zurwieden, N. & Smith, 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.

Soell, M., Diab, M., Haan-Archipoff, G., Beretz, A., Herbelin, C., Poutrel, B. & Klein, J. P. (1995). Capsular polysaccharide types 5 and 8 of *Staphylococcus aureus* bind specifically to human epithelial (KB) cells, endothelial cells, and monocytes and induce release of cytokines. *Infect Immun* **63**, 1380-1386.

Spellerberg, B. & Tuomanen, E. I. (1994). The pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Ann Med* **26**, 411-418.

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

Taha, M. K. (2000). *Neisseria meningitidis* induces the expression of the TNF-alpha gene in endothelial cells. *Cytokine* **12**, 21-25.

Tarradas, C., Borge, C., Arenas, A., Maldonado, A., Astroga, R., Miranda, A. & Luque, I. (2001a). Suilysin production by *Streptococcus suis* strains isolated from diseased and healthy carrier pigs in Spain. *Vet Rec* **148**, 183-184.

Tarradas, C., Luque, I., De Andrès, D., Abdel-Aziz Shahein, Y. E., Pons, P., Gonzalez, F., Borge, C. & Perea, A. (2001b). Epidemiological relationship of human and swine *Streptococcus suis* isolates. *J Vet Med B* **48**, 347-355.

Tekstra, J., Beekhuizen, H., Van De Gevel, J. S., Van Benten, I. J., Tuk, C. W. & Beelen, R. H. (1999). Infection of human endothelial cells with *Staphylococcus aureus*

induces the production of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and monocyte chemotaxis. *Clin Exp Immunol* **117**, 489-495.

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.

Tizard, I. R. (1995). Cytokines and the immune system. In *Veterinary immunology: An introduction*, pp. 141-150. Edited by W. S. S. Company. Philadelphia: A harcourt Health Sciences Company.

Tizard, I. R. (2000). Innate immunity: macrophages. In *veterinary immunology: An introduction*, pp. 26-35. Edited by A. H. H. S. Company. Philadelphia: W.B. Saunder Company.

Touil, F. & Higgins, R. (1988). Les infections à *Streptococcus suis* chez l'espèce porcine: revue de la littérature. *Med Vet Queb* **18**, 25-33.

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

Turrin, N. P. & Plata-Salaman, C. R. (2000). Cytokine-cytokine interactions and the brain. *Brain Res Bull* **51**, 3-9.

Vallejo, J. G., Baker, C. J. & Edwards, M. S. (1996). Roles of the bacterial cell wall and capsule in induction of tumor necrosis factor alpha by type III group B *streptococci*. *Infect Immun* **64**, 5042-5046.

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.

Vecht, U., Wisselink, H. J., Stockhofe-Zurwieden, N. & Smith, H. E. (1996). Characterization of virulence of the *Streptococcus suis* serotype 2 reference strain Henrichsen S 735 in newborn gnotobiotic pigs. *Vet Microbiol* **51**, 125-136.

Vernier, A., Diab, M., Soell, M., Haan-Archipoff, G., Beretz, A., Wachsmann, D. & Klein, J. P. (1996). Cytokine production by human epithelial and endothelial cells following exposure to *oral viridans streptococci* involves lectin interactions between bacteria and cell surface receptors. *Infect Immun* **64**, 3016-3022.

von Hunolstein, C., Totolian, A., Alfarone, G., Mancuso, G., Cusumano, V., Teti, G. & Orefici, G. (1997). Soluble antigens from group B *streptococci* induce cytokine production in human blood cultures. *Infect Immun* **65**, 4017-4021.

Walsh, B., Williams, A. E. & Satsangi, J. (1992). *Streptococcus suis* type 2: pathogenesis and clinical disease. *Rev Med Microbiol* **3**, 65-71.

Weiss, J. M., Downie, S. A., Lyman, W. D. & Berman, J. W. (1998). Astrocyte-derived monocyte-chemoattractant protein-1 directs the transmigration of leukocytes across a model of the human blood-brain barrier. *J Immunol* **161**, 6896-6903.

Wessels, M. R., Rubens, C. E., Benedi, V. J. & Kasper, D. L. (1989). Definition of a bacterial virulence factor: sialylation of the group B *streptococcal* capsule. *Microbiology* **86**, 8983-8987.

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

Williams, A. E. & Blakemore, W. F. (1990b). Pathology of *Streptococcal* meningitis following intravenous intracisternal and natural routes of infection. *Neuropathol Appl Neurobiol* **16**, 345-356.

Wilson, S. L. & Drevets, D. A. (1998). *Listeria monocytogenes* infection and activation of human brain microvascular endothelial cells. *J Infect Dis* **178**, 1658-1666.

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

Wisselink, H. J., Vecht, U., Stockhofe-Zurwieden, N. & Smith, H. E. (2001). Protection of pigs against challenge with virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains by a muramidase-released protein and extracellular factor vaccine. *Vet Rec* **148**, 473-477.

Yao, L., Bengualid, V., Berman, J. W. & Lowy, F. D. (2000). Prevention of endothelial cell cytokine induction by a *Staphylococcus aureus* lipoprotein. *FEMS Immunol Med Microbiol* **28**, 301-305.

Yao, L., Bengualid, V., Lowy, F. D., Gibbons, J. J., Hatcher, V. B. & Berman, J. W. (1995). Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces cytokine gene expression. *Infect Immun* **63**, 1835-1839.

VII - ANNEXE

Pourcentage d'invasion des BMEC pré-incubées 24h avec différentes cytokines par la souche 89-1591 de *S. suis* sérotype 2

Cytokine utilisée pour la pré-incubation	Concentration de cytokine utilisée (ng/ml)	Test # 1 % d'invasion	Test # 2 % d'invasion	Test # 3 % d'invasion	Test # 4 % d'invasion	Test # 5 % d'invasion	Test # 6 % d'invasion	% moyen d'invasion
IL-1	1	0.12	0.01	0.17	0.01			0.07
	5	0.05	0.02	0.16	0.02			
	10	0.16	0.01	0.09	0.01	0.02	0.12	
IL-6	1	0.08	0.01	0.09	0.01			0.05
	5	0.07	0.01	0.13	0.02			
	10	0.05	0.01	0.08	0.03	0.01	0.09	
IL-8	1		0.02	0.07	0.06			0.08
	5		0.01	0.05	0.05			
	10		0.01	0.01	0.02	0.01	0.07	
TNF- α	1		0.01	0.16	0.01			0.06
	5		0.02	0.15	0.01			
	10		0.02	0.07	0.01	0.01	0.05	
MCP-1	1	0.09		0.11	0.03			0.06
	5	0.08		0.14	0.02			
	10	0.08		0.03	0.02	0.01	0.07	
TNF- α + IL-1	10					0.02	0.09	0.06
Contrôle		0.03	0.01	0.05	0.01	0.02	0.06	0.03

% d'invasion par rapport à l'inoculum de départ = $\frac{\text{ufc finale invasion}}{\text{ufc inoculum de départ}} \times 100$