

2m 11.2572.7

Université de Montréal

Étude portant sur la pathogénèse de l'infection causée par
Streptococcus suis sérotype 2 chez la souris.

par

Mélanie Fugère

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 pathologie et microbiologie vétérinaires

Avril, 1997

© Mélanie Fugère, 1997



P. 4820 11 m8

SF

607

U54

1998

V.001

Université de Montréal

Les documents de la bibliothèque de l'Université de Montréal sont déposés dans les collections de la bibliothèque de l'Université de Montréal.

par
/Bibliothèque

Université de Montréal
Bibliothèque de l'Université de Montréal

Université de Montréal
Bibliothèque de l'Université de Montréal
Bibliothèque de l'Université de Montréal
Bibliothèque de l'Université de Montréal

1998

Université de Montréal



Université de Montréal
Faculté des études supérieures
Ce mémoire intitulé:

Étude portant sur la pathogénèse de l'infection causée par
Streptococcus suis sérotype 2 chez la souris.

présenté par:
Mélanie Fugère

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Présidente du jury:	Dre Christiane Girard
Directrice de recherche:	Dre Béatrice Martineau-Doizé
Codirecteur de recherche:	Dr Marcelo Gottschalk
Membre du jury:	Dr Serge Messier

Mémoire accepté le: 16 FEV 1998

SOMMAIRE

Streptococcus suis sérotype 2 est une bactérie causant d'énormes pertes économiques à l'industrie porcine chaque année. En effet, *S. suis* est associé à diverses maladies porcines, et occasionnellement cause des maladies chez d'autres espèces dont l'homme.

Actuellement, la pathogénèse de l'infection à *S. suis* est mal connue. Nous savons que *S. suis* est phagocyté à moins de 10% par des macrophages péritonéaux murins et que les souches virulentes sont capables de survivre au moins trois heures à l'intérieur de ceux-ci. Il est possible que *S. suis* pénètre dans le cerveau en étant à l'intérieur de monocytes.

Les objectifs de la présente étude sont donc: *in vivo*, chez la souris, de vérifier si effectivement *S. suis* pénètre dans le cerveau en étant à l'intérieur de monocytes et *in vitro*, d'étudier deux mécanismes possibles de survie intracellulaire.

In vivo, des infections ont été réalisées en inoculant par voie intra-péritonéale 1×10^7 UFC/mL de la souche virulente, 31533. Les cerveaux ont été prélevés et examinés en microscopie optique et électronique de façon séquentielle. Des comptes viables dans le sang ont aussi été effectués. *In vitro*, le dosage de l'anion superoxyde par la méthode de réduction du cytochrome C a été effectué ainsi que le dosage

de l'oxyde nitrique en présence et en absence de LPS. Pour ces deux dosages quatre souches de *S. suis* tuées par la chaleur ont été utilisées, deux virulentes (31533 et 1591) et deux non virulentes (623 et 1330), ainsi que des macrophages péritonéaux de souris.

Les résultats obtenus, *in vivo*, ne corroborent pas l'hypothèse de l'entrée dans le cerveau via les monocytes. *In vitro*, il est clair que l'oxyde nitrique ne semble pas jouer un rôle dans la survie intracellulaire de *S. suis*. Par contre, *S. suis* inhibe la production d'anion superoxyde ce qui peut laisser supposer que c'est en court-circuitant la voie de la flambée respiratoire que les souches virulentes et non virulentes réussissent à survivre à l'intérieur des macrophages.

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
SOMMAIRE	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES FIGURES	xii
REMERCIEMENTS	xv
1- INTRODUCTION	1
2- REVUE DE LA LITTÉRATURE	4
2.1 Généralité sur <i>Streptococcus suis</i>	5
2.2 Identification de <i>Streptococcus suis</i>	5
2.2.1 Sérotypie	6
2.3 Facteurs de virulence	7
2.3.1 Capsule	7
2.3.2 Protéines MRP et EF	8
2.3.3 Hémolysine	9
2.3.4 Hémagglutinine.....	9
2.3.5 Fimbriae	10

2.4 Maladies causées par <i>Streptococcus suis</i>	10
2.5 <i>Streptococcus suis</i> chez l'homme	11
2.6 Voies possibles d'entrées pour <i>Streptococcus suis</i>	11
2.6.1 Dans la circulation sanguine	11
2.6.2 Dans le cerveau	12
2.6.3 Comment font les bactéries pour traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) ?.....	13
2.7 Pathologie de la méningite	13
2.8 Modèle murin	14
2.9 Survie intracellulaire	16
2.10 Oxyde nitrique (NO)	17
2.10.1 Historique	17
2.10.2 Description	19
2.10.3 Oxyde nitrique synthases (NOS)	19
2.10.3.1 Induction des NOS	20
2.10.3.2 Oxyde nitrique synthase inductible (i-NOS) ..	21
2.10.4 Comment l'oxyde nitrique détruit les bactéries ? ..	21
2.10.5 Rôle antibactérien	22
2.10.5.1 Production d'oxyde nitrique.....	23
2.10.5.2 Destruction des bactéries.....	24
2.10.6 Rôle antiparasitaire	25
2.10.7 Autres fonctions	25
2.10.8 Présence chez l'homme	26
2.10.9 NO chez le porc	27
2.10.10 L'implication de l'oxyde nitrique dans la méningite	28

2.11 Rôle de l'oxygène	28
2.11.1 Mécanisme dépendant de l'oxygène (Flambée respiratoire)	29
2.11.2 Mécanismes développés par les microorganismes pour se protéger de la flambée respiratoire	30
2.11.3 Bactéries survivant aux radicaux toxiques de l'oxygène	30
3- MATÉRIEL ET MÉTHODES	34
3.1 Caractérisation et origine des souches utilisées	35
3.2 Caractérisation des souches 31533 et 623	35
3.2.1 Courbe de croissance	35
3.2.2 Phagocytose	36
3.2.2.1 Préparation des macrophages	36
3.2.2.2 Préparation des bactéries	37
3.2.2.3 Opsonisation des bactéries	37
3.2.2.4 Essais de phagocytose avec des bactéries vivantes	37
3.2.3 Essais de phagocytose avec des bactéries mortes	39
3.2.4 Essais de virulence chez la souris	39
3.3 Protocoles d'infection <i>in vivo</i>	40
3.3.1 Prélèvement des cerveaux	40
3.3.2 Prélèvements bactériens	41
3.3.3 Protocole infection <i>in vivo</i> #1	41
3.3.4 Protocole infection <i>in vivo</i> #2	41
3.3.4.1 Prélèvements bactériens	42
3.3.5 Protocole infection <i>in vivo</i> #3	42

3.3.5.1 Préparation des cerveaux pour la M.E.	42
3.3.6 Protocole infection <i>in vivo</i> #4	43
3.4 Protocole du dosage de l'oxyde nitrique (NO)	44
3.4.1 Protocole du lavage de vaisselle	44
3.4.2 E-Toxate (Limulus Amebocyte Lysate)	44
3.4.3 Dosage de l'oxyde nitrique	44
3.4.3.1 Préparation des bactéries	45
3.4.3.2 Solutions de réaction	46
3.5 Protocole du dosage de l'anion superoxyde.....	47
3.5.1 Préparation des bactéries	47
3.5.2 Préparation des macrophages	47
3.5.3 Dosage de l'anion superoxyde	48
3.5.3.1 Solutions de réaction	48
3.6 Statistiques	49
4- RÉSULTATS	50
4.1 Caractérisation des souches 31533 et 623	51
4.2 Infection <i>in vivo</i>	60
4.2.1 Compte viable à partir du sang	61
4.2.2 Prélèvements bactériens	61
4.2.3 Histologie et M.E.	61
4.2.4 Localisation des bactéries dans le cerveau	63
4.2.6 Forme des bactéries	63
4.3 Dosage de l'oxyde nitrique (NO)	74
4.3.1 E-Toxate	74
4.3.2 Dosage	74

4.4 Dosage de l'anion superoxyde	75
5- DISCUSSION	89
6- CONCLUSIONS	97
7- BIBLIOGRAPHIE	100
8- ANNEXES	129

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau I** Pourcentage de phagocytose de deux souche vivantes de *Streptococcus suis* sérotype 2 (5×10^6 UFC) par des macrophages péritonéaux de souris (5×10^5 cellules), après 1 heure d'incubation à 37°C en présence de 5% de CO₂ (moyenne +/- l'écart-type). 57
- Tableau II** Pourcentage de phagocytose, sans opsonisation, de quatre souches de *Streptococcus suis* sérotype 2 (5×10^6 UFC) tuées par la chaleur. Les bactéries sont en présence de macrophages péritonéaux de souris (5×10^5 cellules), 24 heures à 37°C avec 5% de CO₂ (moyenne +/- l'écart-type). 58
- Tableau III** Infection de souris CF-1 mâles, âgées de 25 à 30 jours, avec une souche virulente (31533) et une souche non virulente (623) de *S. streptococcus suis* sérotype 2 59
- Tableau IV** Résultats d'analyses bactériologiques des prélèvements effectués sur les méninges, dans la boîte crânienne ou dans le cerveau de souris infectées avec 1×10^7 UFC/mL de la souche virulente 31533 de *S. suis* sérotype 2 à divers temps p.i. 62

Tableau V Quantité d'anion superoxyde (nM) produit par 1×10^6 macrophages péritonéaux de souris stimulés pendant 1 heure à 37°C avec quatre souches de *Streptococcus suis* sérotype 2 (1×10^7 UFC) tuées par la chaleur et 100 ng/mL de PMA (moyenne +/- l'écart-type). 86

LISTE DES FIGURES

- Figure 1** Courbe de croissance de la souche virulente 31533. Le graphique est exprimé en UFC/mL en fonction de la densité optique à 540nm. 54
- Figure 2** Courbe de croissance de la souche non virulente 623. Le graphique est exprimé en UFC/mL en fonction de la densité optique à 540 nm. 56
- Figure 3** Nombre de UFC/mL dans le sang en fonction du temps post-infection. 65
- Figure 4** Coupe semi-fine d'un cerveau de souris infectée avec 1×10^7 UFC/mL de la souche virulente 31533 (36h p.i.). La plupart des bactéries sont extra-cellulaires. Bleu de toluidine. Grossissement 1000X. 67
- Figure 5** Coupe d'un cerveau de souris infectée avec 1×10^7 UFC/mL de la souche virulente 31533 (36h p.i.). Les bactéries intra-cellulaires sont dans des vacuoles à l'intérieur des PMN. Microscopie électronique. Barre: $5 \mu\text{m}$ 67

- Figure 6** Coupe sériée d'un cerveau de souris infectée avec 1×10^7 UFC/mL de la souche virulente 31533 (36h p.i). Toutes les bactéries sont situées à l'extérieur du vaisseau sanguin. Coloration de Gram. Grossissement 1000X. 69
- Figure 7** Coupe sériée d'un cerveau de souris infectée avec 1×10^7 UFC/mL de la souche virulente 31533 (36h p.i). Coloration de Gram. Grossissement 400X. Les flèches montrent l'emplacement des bactéries. 69
- Figure 8** Coupe sériée d'un cerveau de souris infectée avec 1×10^7 UFC/mL de la souche virulente 31533 (36h p.i). Il y a un nombre très élevé de cellules inflammatoires dans l'ESA. Hématoxyline Phloxine Safran (H.P.S.). Grossissement 400X. 71
- Figure 9** Cerveau de souris infectée avec 1×10^7 UFC/mL de la souche virulente 31533 (36h p.i.). Barre: $0,3 \mu\text{m}$ 71
- Figure 10** Cerveau de souris infectée avec 1×10^7 UFC/mL de la souche virulente 31533 (36h p.i.). Barre: $1,4 \mu\text{m}$ 73
- Figure 11** Concentration de nitrite (μM) produite par 5×10^5 macrophages péritonéaux de souris en fonction de la dose de LPS (nM), après 24 heures d'incubation à 37°C en présence de 5% de CO_2 . (NOTE: L'écart-type de chaque valeur est trop petit pour être visible sur la figure). 77

- Figure 12** Courbe standard de NaNO_2 . Le graphique est exprimé en densité optique à 570 nm en fonction de la concentration de NaNO_2 (μM). 79
- Figure 13** Quantité de nitrite (μM) produit par 5×10^5 macrophages péritonéaux de souris, stimulés pendant 24 heures à 37°C en présence de 5% de CO_2 , avec quatre souches de *Streptococcus suis* sérotype 2 (5×10^6 UFC) tuées par la chaleur, en présence ou en absence de 175ng de LPS. Des macrophages avec et sans LPS servent de contrôle. 81
- Figure 14** Quantité de nitrite (μM) produit par 5×10^5 macrophages péritonéaux de souris mis en présence de quatre souches de *Streptococcus suis* sérotype 2 (5×10^6 UFC) tuées par la chaleur, et de 175 ng de LPS avec ou sans 0.5M de L-NMMA, pendant 24 heures à 37°C en présence de 5% de CO_2 83
- Figure 15** Pourcentage d'inhibition des oxyde nitrique synthases (NOS) pour quatre différentes souches de *Streptococcus suis* sérotype 2 tuées par la chaleur. 85
- Figure 16** Pourcentage d'inhibition de la production d'anion superoxyde lorsque les macrophages péritonéaux de souris (1×10^6) sont en présence de 100ng/mL de PMA et de quatre souches de *Streptococcus suis* sérotype 2 tuées par la chaleur (1×10^7 CFU/mL), lors d'une incubation de 1 heure à 37°C 88

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à ce projet, et plus particulièrement:

-Dre Béatrice Martineau-Doizé, ma directrice, de m'avoir accueillie dans son laboratoire, m'avoir guidée pendant ces deux années et merci pour sa grande disponibilité.

-Dr Marcelo Gottschalk, mon codirecteur, pour son support technique et ses conseils.

-Isabelle Caya: un gros merci pour son aide, son amitié et d'avoir supporté mes fréquentes montées de bulles!!

-Normand Lacasse, mon professeur de manipulation de souris 101. Normand, tu as été tellement bon professeur que je crois que maintenant, l'élève a surpassé le maître!! Nos discussions vont me manquer...

-Le personnel du laboratoire du Dr Gottschalk, de m'avoir intégrée dans leur laboratoire et de m'avoir supportée techniquement. Merci, à maman *S. suis*, Nathalie Charland, d'avoir bien voulu partager son savoir avec moi.

-Merci à Pierre D'Amato, Micheline St-Germain et Thérèse Gendron-Bernard pour leur grande disponibilité et leurs sourires.

-Le Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc (GREMIP) pour son support technique.

-Finalement, un gros merci à mes parents de m'avoir supportée et encouragée durant toutes ces années.

1- INTRODUCTION

Streptococcus suis est une bactérie causant des maladies porcines telles que: méningite, maladie causant le plus de mortalité, septicémie, endocardite et arthrite. Le sérotype 2 est le plus virulent des 35 sérotypes connus et le plus prévalent. Chaque année, l'industrie porcine accuse des pertes économiques significatives à cause de cet agent. Actuellement, très peu est connu sur la pathogénèse de l'infection causée par *S. suis*. Depuis quelques années un modèle murin est utilisé pour faciliter les recherches. Grâce à ce modèle, il a été établi que le pourcentage de phagocytose des souches de *S. suis* sérotype 2 par des macrophages péritonéaux murins et en absence d'anticorps, est inférieur à 10%. De plus, les souches virulentes sont capables de survivre un minimum de trois heures à l'intérieur des macrophages. Pour ce qui est de l'entrée de la bactérie dans le cerveau, plusieurs hypothèses ont été avancées, mais jusqu'à maintenant aucune n'est confirmée. Par contre, l'hypothèse la plus soutenue actuellement est que la bactérie entrerait dans le cerveau en étant à l'intérieur des monocytes.

Nos hypothèses sont que la bactérie doit effectivement entrer dans le cerveau en étant à l'intérieur des monocytes et que, pour y survivre, la bactérie doit inhiber soit la production d'anion superoxyde, qui est la première étape de formation d'espèces réactives de l'oxygène, soit la production d'oxyde nitrique par les macrophages. L'oxyde nitrique est un composé toxique pour certains parasites, virus et bactéries, produit par une voie différente de celle des espèces réactives de l'oxygène de l'oxygène.

Le but du présent projet est d'étudier certains aspects de la pathogénèse de l'infection causée par *S. suis*, chez la souris, en utilisant une approche *in vivo* et *in vitro*. *In vivo*, les études portent sur le mécanisme d'entrée de la bactérie dans le cerveau et sur sa cinétique dans le sang. *In vitro*, deux mécanismes possibles de survie intracellulaire sont étudiés, soient la production d'oxyde nitrique et d'anion superoxide.

2- REVUE DE LA LITTÉRATURE

2.1 GÉNÉRALITÉS SUR *STREPTOCOCCUS SUIS* :

Les premiers cas d'infection à *S. suis* apparaissent en France en 1912 (Gaspéri et Grippi). Au fil des ans, des cas apparaissent dans différents pays d'Europe pour finalement être rapportés aux États-Unis en 1929 (Doyle) et au Canada en 1982 (Sanford et Tilker, 1982; St-John et coll., 1982). Ce n'est qu'en 1987 que *S. suis* est reconnu officiellement comme espèce (Kilpper-Balz et Schleifer, 1987).

2.2 IDENTIFICATION DE *STREPTOCOCCUS SUIS* :

Streptococcus suis est une bactérie Gram positif, capsulée, d'environ 2 µm de diamètre, de forme ovoïde ou pléomorphe. En microscopie elle apparaît sous forme de petites coques ovales, seule ou en paire après croissance *in vitro* (Jacques et coll., 1990). Elle est non-motile, croît en microaérophilie et en aérobiose, mais est par définition une bactérie anaérobie facultative. Elle est chimio-organotrophe et possède un métabolisme fermentaire. Après 24 heures de croissance sur gélose au sang de bovin ou d'ovin, la majorité des souches sont alpha-hémolytiques, alors que sur gélose au sang de cheval elles sont souvent bêta-hémolytiques. Plusieurs tests biochimiques sont utilisés pour identifier *S. suis* (Hommez et coll., 1986; Higgins et Gottschalk, 1990). *Streptococcus suis* appartient au groupe D de Lancefield, car on retrouve dans sa paroi de l'acide lipothéicoïque, caractéristique de ce groupe (Elliot et coll., 1977).

Cependant, des études de caractérisations effectuées par homologie d'ADN (Kilpper-Balz et Schleifer, 1987) et de typage de l'ARN ribosomique 16S (Bentley et coll., 1991) démontrent que *S. suis* est différent des autres membres du groupe D de Lancefield.

2.2.1 Sérotypie:

En ce qui concerne les caractéristiques antigéniques, la première classification est faite par de Moor (1963). Le contenu en polysaccharides, qu'il croit provenir de la paroi cellulaire, sert à sérotyper les streptocoques. Ainsi, selon lui, les différents streptocoques hémolytiques font partie des groupes de Lancefield R, S, RS et T (de Moor, 1963). En fait, de Moor ne réalise pas que ces bactéries sont capsulées et que la capsule masque la paroi typique du groupe D de Lancefield. Les groupes S, R et RS de de Moor sont donc remplacés par les sérotypes 1, 2 et 1/2 respectivement (Windsor et Elliott, 1975). Le groupe T devenant plus tard le sérotype 15 (Gottschalk et coll., 1989). À l'heure actuelle, 35 sérotypes différents sont dénombrés (1 à 34 et 1/2) (Higgins et coll., 1995). Le sérotype 2 est le plus prévalent et le plus virulent. Il est important de noter que les membres regroupés dans ce sérotype ne possèdent pas tous le même degré de virulence (Clifton-Hadley et Alexander, 1988).

2.3 FACTEURS DE VIRULENCE:

2.3.1 Capsule

Plusieurs travaux démontrent que la capsule polysaccharidique de *S. suis* sérotype 2 a un poids moléculaire de 100KDa et contient cinq sucres différents (Elliot et Tai, 1978; Gottschalk et coll., 1993). Le troisième sucre en importance est l'acide sialique.

L'épaisseur de la capsule augmente après croissance *in vivo* chez le porc (Charland et coll., 1996; Clifton-Hadley, 1986) et chez le rat (Quessy et coll., 1994). Charland et coll. (1996) ainsi que Clifton-Hadley (1986) démontrent qu'il n'y a pas de différence dans l'épaisseur de la capsule entre les souches virulentes et non virulentes alors que Quessy et coll. (1994) affirment le contraire.

Les souches virulentes du sérotype 2 sont capables d'adhérer aux tissus de poumons congelés et cela de façon plus prononcée pour les souches isolées de pneumonie que pour les souches provenant de méningite. Il semble donc y avoir une spécificité des souches (Gottschalk et coll., 1991). De plus, les auteurs observent une corrélation entre l'épaisseur de la capsule et la capacité d'adhérence.

Chez certaines bactéries, dont les streptocoques du groupe B (GBS) et gonocoques, l'acide sialique de la capsule joue un rôle anti-phagocytaire en inactivant la voie alternative du complément (Kazatchkine et coll., 1979). Charland et coll. (1996) observent que l'acide sialique n'a pas ce rôle chez *S. suis* sérotype 2 lorsqu'en présence de

monocytes de porc. Seule la survie intracellulaire est quelque peu diminuée lorsque la bactérie possède une capsule sans acide sialique. Chez d'autres bactéries telles que les GBS et les gonocoques (Smith, 1993) il a été démontré que l'acide sialique est un facteur de virulence. Par contre, chez *S. suis*, l'acide sialique n'a pas ce rôle (Charland et coll., 1996). En effet, on retrouve la même concentration d'acide sialique chez les souches virulentes et non virulentes. De plus, lorsque l'on fait croître les souches *in vivo* chez le porc, la concentration d'acide sialique augmente autant chez les souches virulentes que non virulentes, et ceci dû à l'augmentation de l'épaisseur de la capsule.

2.3.2 Protéines MRP et EF:

Les souches virulentes de *S. suis* sérotype 2 possèdent deux protéines associées à la virulence, soient la protéine MRP ("muraminidase released protein") et la protéine EF ("extracellular factor"). La protéine MRP est une protéine membranaire de 136 KDa présente dans la paroi cellulaire de *S. suis*. Elle porte ce nom parce qu'elle est relâchée dans le milieu suite à un traitement à la muraminidase. La deuxième protéine, de 110 KDa, est excrétée dans le surnageant (Vech et coll., 1991). Une étude récente vient de confirmer que la synthèse de ces deux protéines coïncide avec le fait que ces souches sont virulentes, mais ne contribue nullement à celle-ci (Smith et coll., 1996).

2.3.3 Hémolysine:

Feder et coll. (1994) font la caractérisation partielle d'une hémolysine thermolabile, sécrétée par *S. suis* sous certaines conditions de croissance et dans certains milieux. Plus tard, Jacobs et coll. (1994) identifient, purifient et font la caractérisation d'une hémolysine de 54 kDa, produite par le sérotype 2. Cette hémolysine a certaines caractéristiques communes à la famille des toxines connues comme des toxines activées par le thiol. Il est à noter que *S. suis* est le seul microorganisme appartenant au groupe D de Lancefield qui produit ce type d'hémolysine (Gottschalk et coll., 1995).

2.3.4 Hémagglutinine:

Streptococcus suis agglutine les érythrocytes par l'intermédiaire d'une adhésine protéique qui reconnaît, à la surface des érythrocytes, un saccharide spécifique qui contient de l'acide sialique (Kurl et coll., 1989). Cette adhésine dont la séquence est 3GalB 1-4GlcNAB 1-3GalB reconnaît la séquence saccharidique NeuNAca 2-3GalB 1-4Glc (NAc) (Liukkonen et coll., 1992). En 1994, Haataja et coll. (1994) démontrent que *E. coli* possède le même type d'adhésine que *S. suis*. Cette adhésine reconnaît le même saccharide par deux mécanismes de liaison différents selon la disposition des ponts hydrogène au niveau de l'adhésine. Par contre, le rôle que joue cette adhésine comme facteur de virulence chez *S. suis* reste à élucider. Trente-trois pourcents des souches virulentes ou non virulentes possèdent une hémagglutinine (Gottschalk et coll., 1990).

2.3.5 Fimbriae

Les sérotypes 1 à 8 et 1/2 possèdent des fimbriae péritriches flexibles d'environ 2 nm de diamètre et de 250 nm de longueur (Jacques et coll., 1990). Actuellement, leur rôle n'est pas connu et leur implication dans la virulence n'est toujours pas démontrée.

2.4 MALADIES CAUSÉES PAR *STREPTOCOCCUS SUIIS* :

Comme mentionné précédemment, le sérotype 2 est le sérotype causant le plus d'infections chez le porc. On retrouve principalement des pneumonies, des polysérosites, des polyarthrites, des septicémies, des endocardites et des méningites (Reams et coll., 1994; Williams et Blakemore, 1990). Cette dernière étant la maladie causant le plus de mortalité, alors que la maladie rencontrée le plus fréquemment est la bronchopneumonie (Reams et coll., 1994). Il faut aussi noter que les porcs infectés présentent des signes cliniques soit d'atteinte du système respiratoire soit d'atteinte du système nerveux central, mais jamais les deux (Reams et coll., 1994). Lors d'un premier contact avec la bactérie, seulement de 0,55% à 4% des porcs développent de la méningite et/ou de l'arthrite et des sérosites. Chez les autres porcs, la bactérie se loge dans les amygdales sans causer de maladie. Ces porcs asymptomatiques développeront éventuellement le syndrome clinico-pathologique suite à un stress (ex. changement de température, stress environnemental...) (Clifton Hadley, 1981). Lors d'atteinte du système respiratoire, dans 58%

des cas, *S. suis* est associé à une autre bactérie: *E. coli* dans 30% des cas ou *P. multocida* dans 28% des cas (Reams et coll., 1994). Par contre, lorsqu'il y a atteinte nerveuse, *S. suis* est toujours seul (Reams et coll., 1994). Pour cette raison *S. suis* est considéré comme étant un pathogène primaire lors de lésions du système nerveux central, alors qu'il est difficile de déterminer l'importance réelle de celui-ci lors de lésions pulmonaires puisqu'on l'y retrouve avec d'autres bactéries (Reams et coll., 1994).

2.5 STREPTOCOCCUS SUIIS CHEZ L'HOMME:

Occasionnellement *S. suis* a été la cause d'infection chez des humains (Zanen et Engel, 1975; Walsh et coll., 1992). Dans ces cas, c'est le sérotype 2 qui est impliqué le plus souvent (Gottschalk et coll., 1990).

2.6 VOIES POSSIBLES D'ENTRÉES POUR STREPTOCOCCUS SUIIS :

2.6.1 Dans la circulation sanguine

Trois voies possibles ont été proposées (Alexander, 1995). Premièrement, *Streptococcus suis* serait phagocyté par les macrophages présents dans les amygdales et serait ainsi transporté jusque dans le sang (Williams, 1989). Deuxièmement, suite à l'entrée de la bactérie par une

abrasion de la peau (Swe, 1976) et finalement la troisième voie serait celle des alvéoles pulmonaires. La dernière est peu probable, puisque toutes les études réalisées afin de prouver cette hypothèse ont échoué (Alexander, 1995).

2.6.2 Dans le cerveau

En 1995, il existait trois hypothèses tentant de répondre à cette question (Alexander, 1995). Premièrement, celle de Clifton-Hadley (1982) qui suggère que *S. suis* entre dans le nasopharynx et continue sa progression via le nerf olfactif jusque dans l'espace sub-arachnoïdien pour ainsi causer ce qui est initialement une infection locale, mais qui peut dans certains cas se transformer en méningite. Ensuite l'hypothèse de Kay (1985), qui présume l'entrée de *S. suis* dans le cerveau via l'oreille interne et la trompe d'Eustache. Les expériences réalisées afin de prouver ces théories ont toujours échoué puisque l'infection de l'oreille interne est secondaire à l'infection du liquide cébrospinal et non le contraire (Kay, 1985). L'hypothèse admise actuellement est celle proposée par plusieurs chercheurs à savoir que *S. suis* serait transporté du sang au cerveau par des monocytes (Williams et Blakemore, 1990 a,b,c).

2.6.3 Comment font les bactéries pour traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE)?

Une fois les bactéries arrivées dans les vaisseaux des méninges, elles doivent traverser la BHE pour se rendre dans l'espace sub-arachnoïdien (ESA). Trois mécanismes d'entrées sont possibles. Premièrement, la bactérie passe entre les cellules de la BHE, suite à une rupture de celles-ci (Townsend et Scheld, 1995); *S. pneumoniae* emploie ce mécanisme. Deuxième hypothèse, les bactéries entrent dans l'ESA en étant à l'intérieur des monocytes (Williams et Blakemore, 1990a). Dans la dernière hypothèse, la bactérie traverse la BHE par transcytose, en étant à l'intérieur de vacuoles dans les cellules endothéliales (Townsend et Scheld, 1995), comme le font *E. coli* et *H. influenzae*.

2.7 PATHOLOGIE DE LA MÉNINGITE:

Les lésions microscopiques observées tôt après l'infection du système nerveux central sont les suivantes (Chanter et coll., 1993): choroïdite avec rupture de la bordure en brosse du plexus choroïde mais sans dommages aux cellules endothéliales des capillaires des méninges. Un exsudat fibrineux avec infiltration diffuse de cellules inflammatoires est observé dans les ventricules. Les bactéries sont quelquefois libres, mais généralement on les retrouve dans les monocytes et/ou les macrophages situés dans le parenchyme du plexus choroïde (Williams et Blakemore, 1990a). Lorsque la bactériémie persiste, elle dégénère plus souvent en polyarthrite qu'en méningite (Clifton-Hadley, 1982). Des infections expérimentales ont été réalisées chez le porc avec la souche de

sérotype 2, 31533 (Kobisch et coll., 1995). Cette souche a été isolée en France d'un cas de méningite porcine (Kobisch et coll., 1995). Les études histologiques montrent qu'il s'agit de lésions exsudatives, les séreuses étant recouvertes d'un exsudat fibrineux abondant, infiltré de neutrophiles. Les auteurs observent aussi de la méningite sous forme d'oedème et d'un infiltrat de cellules inflammatoires mononucléées (Kobisch et coll., 1995).

2.8 MODÈLE MURIN:

Plusieurs équipes de chercheurs utilisent le modèle murin dans l'étude de la pathogénèse ou de la virulence des souches de *S. suis*. En 1988, Williams et coll. (1988) sont les premiers à confirmer que le modèle murin pouvait être utilisé pour étudier *S. suis*. Cette étude conclue les faits suivants: la porte d'entrée et la voie de dissémination de la bactérie est similaire chez le porc et la souris, *S. suis* est pathogène pour les deux espèces, la maladie est reproductible chez la souris et les lésions induites expérimentalement chez la souris sont similaires à celles obtenues chez le porc. La conclusion générale de cette expérience est que pour obtenir des résultats comparables à ceux observés chez le porc, il faut utiliser des souris âgées de quatre semaines, injectées par voie intra-péritonéale avec 1×10^8 UFC/mL.

Une étude a été effectuée en parallèle chez le porc et chez la souris pour bien évaluer le modèle murin (Kataoka et coll., 1991).

Encore ici, les conclusions sont les mêmes que pour Williams et coll. (1988). Toutes les études précédentes indiquent que la souris peut être utilisée pour reproduire l'infection.

En 1992, Beaudoin et coll. (1992) standardisent le modèle expérimental afin de pouvoir l'utiliser pour vérifier la virulence des souches. Les conclusions de l'étude montrent que les paramètres à utiliser sont: des souris CF-1 âgées de 28 jours que l'on inocule par voie intra-péritonéale avec 1×10^7 UFC de bactéries contenu dans un volume de 1 mL de bouillon Thodd-Hewitt supplémenté avec du sérum bovin fœtal. Ces paramètres reproduisent très bien la maladie chez la souris (Beaudoin et coll., 1992).

Toujours en 1992, une autre étude décrit les lésions suite à une infection chez la souris afin de vérifier si celles-ci sont les mêmes que chez le porc (Drolet et coll., 1992). Encore une fois, l'étude conclue que le modèle murin reproduit bien la maladie.

Bien que quatre études confirment que le modèle murin est adéquat pour étudier la virulence des souches et la pathogénèse de *S. suis*, une étude obtient des résultats contraires (Vecht et coll., 1996). En effet, selon Vecht et coll., le modèle murin est inadéquat puisque dans son étude, la virulence des souches est différente chez le porc et la souris.

2.9 Survie intracellulaire

Il existe trois mécanismes connus de survie intracellulaire pour un microorganisme. **1- L'inhibition de la fusion du lysosome avec la vacuole contenant le microorganisme.** Par exemple, *Trypanosoma cruzi* (Milder et Kloetzel, 1980; Nogueira et Cohn, 1976) et *Rickettsia typhi* (Andrese et Wisseman, 1971), deux parasites intracellulaires, utilisent ce moyen pour survivre à l'intérieur des phagocytes.

2- L'inhibition de l'acidification de l'endosome ou de la fusion du phagolysosome. *Rhodococcus equi* (Zink et coll., 1987) est capable d'empêcher la fusion grâce à certaines caractéristiques structurales (Hietala et Ardans, 1987). Pour ce qui est de *Mycobacterium tuberculosis*, il existe plusieurs hypothèses. Premièrement, les mycobactéries pourraient résister à la destruction en inhibant le relâchement de myéloperoxydase (MPO) dans le phagosome lors de sa fusion avec le lysosome. Deuxièmement, il semble que les mycobactéries détoxifient le milieu en sécrétant des agents réducteurs (Friedland, 1993). Finalement, certaines espèces de mycoplasmes utilisent le L-arginine présent dans le milieu pour produire de l'ammoniac, qui interférerait dans la fusion phagosome-lysosome. De plus, cet emploi massif de L-arginine réduit considérablement la quantité de L-arginine disponible pour la production d'oxyde nitrique, ce qui a pour effet de réduire le pouvoir bactéricide des polymorphonucléaires (PMN) (Friedland, 1993).

Legionella pneumophila quant à lui peut aussi empêcher la fusion du phagolysosome. De plus, il est capable de relâcher certaines

bases lipophiliques ce qui facilite la diffusion des protéines à travers la membrane de *L. pneumophila* ou modifie la perméabilité membranaire du phagosome (Horwitz, 1983).

Finalelement, le dernier moyen de survie intracellulaire est la **neutralisation des agents antibactériens délivrés lors de la fusion du lysosome avec le phagosome**. Ce dernier point sera discuté plus en détail dans la section 2.11.3, qui porte sur les bactéries survivant aux espèces réactives de l'oxygène.

2.10 OXYDE NITRIQUE (NO):

2.10.1 Historique:

Mitchell et coll. (1916) sont les premiers à émettre l'hypothèse que les cellules de mammifères produisent de l'oxyde nitrique (NO). Ensuite, vers la fin des années 1970 et le début des années 1980, deux équipes démontrent que les cellules de mammifères produisent du nitrate (NO_3^-) en réponse à une stimulation par les endotoxines (Tannenbaum et coll., 1978; Wagner et coll., 1983), constituant ainsi une preuve indirecte de la production d'oxyde nitrique. Ce n'est qu'en 1985 que la preuve est faite que les cellules de mammifères produisent de l'oxyde nitrique (Stuehr et Marletta, 1985).

Depuis, le NO est une molécule très à la mode et fut même nommée molécule de l'année par la prestigieuse revue Science en 1992 (Koshland, 1992). Il a été démontré que le NO peut tuer certaines bactéries, certains parasites intracellulaires et même réduire la croissance de certains virus (Akarid et coll., 1995). Il a aussi été démontré que les intermédiaires de l'azote produits par les macrophages murins (Schneeman et coll., 1993a) tuent plus efficacement les bactéries que les espèces réactives de l'oxygène. Comme l'oxyde nitrique semble jouer un rôle important dans le mécanisme de défense contre les infections, plusieurs études ont tenté de démontrer que les phagocytes humains produisent de l'oxyde nitrique. Les résultats sont très contradictoires puisque certaines études concluent qu'il y a production d'oxyde nitrique (Denis, 1991; Hunt et Goldin, 1992), alors que d'autres concluent qu'il n'y a pas de production (Schneeman et coll., 1993b).

À l'heure actuelle, la production de NO a été démontrée chez diverses espèces dans les tissus suivants: cellules endothéliales, neurones, plaquettes, neutrophiles, cellules du rein, cellules épithéliales respiratoires, fibroblastes, cellules musculaires, hépatocytes, macrophages et "macrophages-like" (Billiar et coll., 1992; Motard et coll., 1993).

La production de NO est indépendante de la flambée respiratoire (Iyengar et coll., 1987). Donc, en théorie, il peut y avoir simultanément production d'azote réactif et d'oxygène réactif. Par contre, Ding et coll., (1988) démontrent que la production d'intermédiaires réactifs de l'azote inhibe en partie la production des espèces réactives de l'oxygène. Un autre fait intéressant est que l'oxyde

nitrique synthase (NOS), l'enzyme impliquée dans la production d'oxyde nitrique, lorsque retrouvée dans un milieu faible en arginine, possède la capacité de générer des espèces réactives de l'oxygène au lieu d'espèces réactives de l'azote (Pou et coll., 1992; Mayer et coll., 1991).

2.10.2 Description:

L'oxyde nitrique est une petite molécule, faisant partie des intermédiaires de l'azote et qui possède une demi-vie d'environ 4 secondes. Elle est produite par l'oxyde nitrique synthase (NOS). La production de l'oxyde nitrique résulte de la réaction entre la L-arginine et l'oxygène (O_2) ce qui donne comme produit la L-citrulline et le NO. Les cofacteurs impliqués dans la réaction sont la calmoduline, le FAD, le FMN, le NADPH et la protéine tétrahydrobioptérine (Lowenstein, 1995). Étant donné sa très courte demi-vie, lorsque qu'il est en solution aqueuse, l'oxyde nitrique se transforme rapidement en nitrite (NO_2^-) et par la suite en nitrate (NO_3^-) (Hibbs et coll., 1988). Ces deux composés sont produits dans le surnageant de culture cellulaire (Marletta et coll., 1988; Stuehr et coll., 1989).

2.10.3 Oxyde nitrique synthase (NOS):

On peut retrouver l'oxyde nitrique synthase sous trois formes: la forme neuronale (n-NOS), endothéliale (e-NOS) et inducible (i-NOS). Les formes neuronale et endothéliale sont deux formes constitutives (c-NOS) d'enzymes. Elles se retrouvent sous forme inactive dans les cellules endothéliales et dans quelques neurones. L'activation des c-NOS est contrôlée par la quantité de calcium intracellulaire. Quand celui-ci

augmente, un complexe calmoduline-calcium se fixe aux c-NOS et les active. Lorsque la quantité de calcium diminue, il y a inactivation des c-NOS par le mécanisme inverse. Une autre forme de contrôle est l'auto-régulation des NOS par l'oxyde nitrique lui-même, ce qui permet d'éviter des dommages tissulaires (Griscavage et coll., 1993). En effet, le NO lorsqu'en grande quantité est toxique pour les tissus. Il est aussi connu que lorsque la concentration en arginine est faible, les NOS utilisent préférentiellement l'O₂ pour produire du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) au lieu du NO (Mayer et coll., 1991). Les conditions oxydatives ainsi produites favorisent l'oxydation du NO en NO⁺, qui par la suite réagit avec l'H₂O₂ pour produire un composé très toxique, l'anion peroxydinitrite (OONO)⁻ (Ridd, 1978).

2.10.3.1 Induction des NOS:

La production de NO par les macrophages péritonéaux de souris peut être stimulée, soit en utilisant du LPS seul ou en combinaison avec de l'interféron-gamma (Lorsbach et coll., 1993). Les NOS peuvent aussi être stimulées à l'aide de *Zymosan* (Zhang et Morrison, 1993a) et d'antigènes du parasite de la malaria (Kremsner et coll., 1993). Les billes de latex ont aussi été rapportées comme stimulant la production de NO (Corradin et coll., 1991).

2.10.3.2 Oxyde nitrique synthase inductible (i-NOS):

i-NOS est une petite protéine de 131KD possédant une délétion interne codée par un gène qui a été cloné en 1992. C'est dans les macrophages que l'on a tout d'abord démontré cette enzyme. Par la suite, elle a été retrouvée dans les hépatocytes, les myocytes, les cellules endothéliales, les astrocytes et les chondrocytes (Schneeman et coll., 1993b).

Contrairement aux c-NOS, les i-NOS ne se retrouvent pas normalement dans les cellules résidentes. Une fois les i-NOS activées, elles fixent si fortement la calmoduline qu'il n'y a pas d'arrêt de production même quand le niveau de calcium est très bas. Son activité est plutôt contrôlée par la transcription de son gène. Cette transcription peut être induite par le LPS ou l'interféron-gamma. Le LPS active le facteur nucléaire Kappa B, alors que l'interféron-gamma agit au niveau du facteur de transcription STAT (Xie et coll., 1993; Lowenstein et coll., 1993). La production de NO peut être régulée par certaines cytokines telles que IL-4, IL-8, IL-10, TGF-bêta-1,2 et 3 et par le facteur désactivant des macrophages (Nussler et coll., 1993), qui agissent en réduisant la transcription de l'ARNm ou en affectant sa stabilité (Bogdan et Nathan, 1993).

2.10.4 Comment l'oxyde nitrique détruit les bactéries?:

Le ou les mécanismes employé(s) par l'oxyde nitrique pour tuer les bactéries, est ou sont encore très mal connu(s). Par contre, certains mécanismes semblent être plus plausibles.

Premièrement, il semble que l'oxyde nitrique est capable de se fixer au complexe Fe-S de certaines enzymes, ce qui a pour effet de provoquer une perte de fer intracellulaire dans la cellule cible (Lancaster et Hibbs, 1990).

Deuxièmement, en présence d'oxyde nitrique il y a nitrosylation du centre de la fonction Fe-S ce qui inhibe plusieurs enzymes clés telles que l'aconitase du cycle de Krebs (Drapier et Hibbs, 1986; Stamler et coll., 1992), la NADPH-ubiquinone oxydoréductase, et la succinate-ubiquinone oxydoréductase impliquée dans la chaîne de transport des électrons (Granger et Lehninger, 1982) et finalement la ribonucléotide réductase qui est impliquée dans la synthèse de l'ADN et dans la prolifération cellulaire (Kwon et coll., 1991).

Troisièmement, l'oxyde nitrique induit l'ADP-ribosylation d'une variété d'enzymes.

Quatrièmement, l'oxyde nitrique peut endommager l'ADN en oxydant ou déaminant celui-ci.

Cinquièmement, il peut interagir avec les radicaux superoxyde pour former l'anion peroxynitrite, celui-ci formant par la suite le radical hydroxyle et beaucoup d'autres composés toxiques (Beckman et coll., 1990; Nathan et coll., 1983).

Finalement, il se lie aux résidus tyrosine des protéines produisant ainsi de la nitrosotyrosine (Lowenstein, 1995).

2.10.5 Rôle antibactérien:

Les bactéries où le NO joue un rôle sont divisées en deux catégories: celles qui stimulent la production d'oxyde nitrique par les

phagocytes (sans toutefois savoir quel rôle celui-ci joue exactement) et celles sur lesquelles le NO possède des effets bactéricides. Comme les recherches dans ce domaine sont relativement récentes, aucune étude ne porte sur d'éventuels mécanismes de protection employés par les bactéries pour se protéger de l'oxyde nitrique.

2.10.5.1 Production d'oxyde nitrique:

Streptocoques du groupe B (GBS):

L'expérience de Goodrum et coll. (1994) démontre que des macrophages péritonéaux de souris préalablement stimulés par du thioglycollate et de l'interféron-gamma, lorsque mis en présence de GBS, produisent des nM d'oxyde nitrique. Cette production est médiée par le récepteur CR3 de la portion C3b du complément présent dans la membrane des macrophages. Cette expérience a aussi démontré que ce sont bien les NOS qui produisent l'oxyde nitrique.

***Streptococcus pneumoniae* :**

Une étude (Freyer et coll., 1996) démontre que la paroi cellulaire de cette bactérie (PCW) stimule la production de μM d'oxyde nitrique par les cellules astrogliales. Cette production est significative seulement après 48 h. Encore ici, en utilisant une substance inhibitrice des NOS, la preuve est faite que ce sont bien les NOS qui produisent l'oxyde nitrique. Leurs résultats indiquent aussi que la production de nitrite est augmentée en présence de superoxyde dismutase (SOD). Ceci peut être expliqué par le fait qu'en présence d'oxygène, le NO est transformé en peroxynitrite et devient ainsi non détectable. Finalement, il est

intéressant de noter que la séquence i-NOS des macrophages partage 90% d'homologie avec celle des astrocytes (Freyer et coll., 1996).

Toxine de *Bordetella pertussis* :

Lorsque l'on met en présence des cellules de rate murine, stimulées avec de l'interféron-gamma provenant de lymphocytes T, et la toxine de *B. pertussis*, il y a production de NO (Sakurai et coll., 1996). Par contre, chez des macrophages stimulés avec du LPS, la toxine inhibe cette production (Zhang et Morrison, 1993b). Ce phénomène n'est par contre pas encore expliqué.

2.10.5.2 Destruction des bactéries:

***Staphylococcus aureus* :**

En 1992 il a été démontré que l'oxyde nitrique produit par les neutrophiles humains était impliqué dans la destruction de *S. aureus* (Malawista et coll., 1992).

***Listeria monocytogenes* :**

Une étude démontre que l'oxyde nitrique est capable de réduire *in vivo* et *in vitro* la croissance de cette bactérie (Beckerman et coll., 1993).

***Legionella pneumophila* :**

Lorsque l'on met en présence *L. pneumophila* et la lignée cellulaire de macrophages murins RAW 264.7 stimulée avec de l'interféron-gamma, il y a production de NO et celui-ci a un effet

bactéricide sur *L. pneumophila*. Par contre, lorsque l'on met ce dernier en présence d'une lignée cellulaire humaine qui lui est permissive, stimulée avec de l'interféron-gamma, il y a toujours production d'oxyde nitrique mais, cette fois-ci, l'effet n'est que bactériostatique (Summersgill et coll., 1992). Finalement, une autre étude réalisée par Brieland et coll. (1995) démontre, *in vivo*, dans le poumon de souris, l'implication de l'oxyde nitrique et du TNF-alpha dans l'élimination de l'infection et dans le contrôle de la réplication de la bactérie, mettant ainsi en lumière l'implication de l'oxyde nitrique dans le déclenchement de la production de TNF-alpha.

2.10.6 RÔLE ANTIPARASITAIRE:

Outre son effet antibactérien, l'oxyde nitrique est aussi efficace contre certains parasites tels que *Schistosomia mansoni* (Woods et coll., 1994), *Leishmania major* (Heinzel et coll., 1990; Sher et Coffman, 1992), *Toxoplasma gondii* (Adams et coll., 1990), *Trypanosoma cruzi* (Gazzinelli et coll., 1992; Munoz-Fernandez et coll., 1992), *Entamoeba histolytica*, *Naegleria fowleri* (Denis et Ghadirian, 1992; Fischerstenger et Marciano-Cabral, 1992), *Encephalitozoon cuniculi* (Didier et coll., 1994) et *Cryptosporidium parvum* (Leitch et He, 1994).

2.10.7 AUTRES FONCTIONS:

L'oxyde nitrique est un gaz atmosphérique toxique, possiblement cancérigène et responsable des pluies acides (Gibaldi, 1993). L'oxyde nitrique produit par les c-NOS joue un rôle physiologique de régulation en relaxant les muscles lisses vasculaires et un rôle de

fonctionnement en agissant comme neurotransmetteur (Nussler et Billar, 1993) L'oxyde nitrique produit par la forme inductible de NOS serait en plus impliqué dans des maladies inflammatoires telle que l'arthrite (Stefanovic-Racic et coll., 1994). Finalement, l'oxyde nitrique serait aussi impliqué dans les mécanismes suivants: l'inhibition de l'adhérence (Radomski et coll., 1987) et de l'aggrégation (Mellion et coll., 1981) des plaquettes, l'inhibition du chimiotaxisme des neutrophiles (Kaplan et coll., 1989) et la transmission de signaux dans le système nerveux central et périphérique (Bredt et coll., 1991).

2.10.8 Présence chez l'homme:

L'humain représentait en 1992 la seule espèce où l'on avait isolé l'ADNc des trois isoformes de NOS (Marsden et coll., 1992; Janssens et coll., 1992). L'expression chez l'humain des i-NOS par les monocytes a été observée uniquement après une longue exposition au MG-CSF plus TNF, IFN-alpha et TNF ou LPS (Denis, 1991; Hunt et Goldin, 1992). En 1989 une étude démontre la capacité des neutrophiles humains à produire de l'oxyde nitrique (Wright et coll., 1989). D'autres études arrivent à la conclusion que les NOS des macrophages humains sont très peu ou pas du tout stimulés indiquant un rôle mineur de l'oxyde nitrique dans la défense antimicrobienne (Nussler et Billiar, 1993; Schneemann et coll., 1993b). Il est à noter que le i-NOS humain possède 80% d'homologie en acides aminés avec celui de la souris et que ces deux i-NOS originent d'un même gène (Nussler et Billiar, 1993).

Chez l'humain, les monocytes et les macrophages ne sont pas capables de synthétiser la tétrahydrobioptérine, contrairement au modèle murin (Werner et coll., 1990). Cette protéine étant nécessaire pour la production de NO, il a donc été proposé par Cameron et coll. (1990), que *in vivo*, cette protéine pouvait peut-être être fournie par d'autres cellules immunitaires telles que les lymphocytes T. Ceci pourrait expliquer pourquoi *in vitro* il est difficile d'observer la production d'oxyde nitrique et pourquoi il y a tant de contradictions dans les études. Donc, nous pouvons conclure qu'à l'heure actuelle la production d'oxyde nitrique par les phagocytes humains reste très controversée.

2.10.9 NO chez le porc:

Diverses études ont prouvé qu'il y a production de NO chez le porc (Gibson et coll., 1994; Smith et coll., 1993). Par contre, cette production n'est l'oeuvre que des cellules endothéliales; il n'a pas encore été prouvé que les phagocytes porcins sont capables de produire de l'oxyde nitrique. *In vitro*, on remarque qu'il y a production d'oxyde nitrique par les artères pulmonaires lorsque celles-ci sont stimulées avec du LPS et mises en contact avec des streptocoques du groupe B (GBS) (Villamor et coll., 1995). Ce même fait est observé *in vivo*. En effet, des élévations d'oxyde nitrique dans les poumons sont rapportées chez des porcs infectés avec des GBS (Rudinsky et coll., 1993). Par contre, l'oxyde nitrique produit a un rôle vasodilatateur et non un rôle bactéricide.

2.10.10 L'implication de l'oxyde nitrique dans la méningite:

L'implication de l'oxyde nitrique dans la méningite se situerait à deux niveaux. Premièrement, il agit de façon indirecte en stimulant la production de TNF-alpha. En effet, ce dernier est impliqué dans l'inflammation qui survient lors de méningite (Saukkonen et coll., 1990; Velasco et coll., 1991). Il est aussi impliqué dans la défense antimicrobienne du système nerveux central (CNS) (Habert et coll., 1994; Quagliariello et Scheld, 1992; Visser et coll., 1994). Lors de méningite, le niveau de TNF-alpha dans le fluide cérébral spinal est élevé chez les patients et que c'est une mesure utilisée pour déterminer si la méningite est d'origine virale ou bactérienne (Glimaker et coll., 1993; Leist et coll., 1988). Finalement, on sait que le TNF-alpha agit probablement comme second signal et a pour rôle d'activer les macrophages (Goodrum et coll., 1994). Deuxièmement, l'oxyde nitrique a un rôle direct en agissant possiblement comme médiateur du changement de débit du sang cérébral lors de méningite (Habert et coll., 1994), en étant, tout comme le TNF-alpha, impliqué dans la défense antimicrobienne du CNS.

2.11 RÔLE DE L'OXYGÈNE:

Suite à la phagocytose des microorganismes, deux mécanismes de destruction peuvent être déclenchés: le mécanisme dépendant de l'oxygène (flambée respiratoire) ou celui indépendant de l'oxygène. Une fois la flambée respiratoire déclenchée, il est possible de quantifier celle-ci en mesurant l'augmentation de la consommation d'oxygène, la

génération d'anion superoxyde (O_2^-) (Drath et Karnovsky, 1975; Johnston et coll., 1978), la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (McRipley et Sbarra, 1967; Nathan et Root, 1977) ou la chimioluminescence (Johnston et coll., 1976).

2.11.1 Mécanisme dépendant de l'oxygène (Flambée respiratoire):

C'est en 1961 que, pour la première fois, on propose que la flambée respiratoire déclenchée par la phagocytose de microorganismes peut avoir une action bactéricide (Iyer et coll., 1961). La flambée respiratoire déclenche une cascade de réactions chimiques, nécessaire à la production des radicaux toxiques de l'oxygène. La première réaction à survenir est celle de la production de l'anion superoxyde. La réaction entre l'oxygène et le NADPH (nicotiamide adénine dinucléotide phosphate) donne l'anion superoxyde (O_2^-), le $NADP^+$ et un ion H^+ . Cette réaction est catalysée par une enzyme associée à la membrane des phagocytes, l'oxydase (Hocking et Golde, 1979). Cette enzyme est produite à la surface du phagocyte ou à la surface de la membrane située à l'intérieur du phagosome (Klebanoff, 1980). Ensuite, à l'intérieur de ce dernier, il y a transformation de l'anion superoxyde (O_2^-) en oxygène et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est catalysée par la SOD (superoxyde dismutase). Finalement, toujours à l'intérieur du phagosome, se produit la dernière réaction qui transforme l' H_2O_2 en eau et oxygène, cette réaction étant catalysée par la catalase.

En plus de jouer un rôle direct, le peroxyde d'hydrogène joue aussi un rôle indirect. En effet, lorsque le phagosome contenant le

microorganisme fusionne avec le lysosome, il y a relargage de myéloperoxidase (MPO) dans la vacuole. C'est alors que le peroxyde d'hydrogène présent dans la vacuole, en présence d'ions halide et de MPO, produit des réactions microbicides en halogénant des protéines bactériennes (Klebanoff, 1967). Ceci résulte en la formation d'aldéhyde (Strauss et coll., 1972) et de clivages peptidiques (Selvaraj et coll., 1974), détruisant ainsi les microorganismes.

2.11.2 Mécanismes développés par les microorganismes pour se protéger de la flambée respiratoire:

Les mécanismes de protection contre les produits toxiques dérivant de l'oxygène utilisés par les microorganismes consistent à produire une ou des enzymes telles que : la SOD et/ou la catalase et/ou la peroxydase. Ces enzymes ont pour rôle de transformer les produits toxiques de l'oxygène en produits non toxiques. Cependant, le fait de posséder une ou plusieurs de ces enzymes n'assure pas automatiquement la survie. En fait, bien peu de microorganismes survivent à l'action des cellules phagocytaires (Beaman et Beaman, 1984).

2.11.3 Bactéries survivant aux espèces réactives de l'oxygène:

***Nocardia asteroides* :**

Ce pathogène infecte les humains et de nombreux animaux (Beaman, 1977). Chez cette bactérie, on a découvert que les souches virulentes, en phase logarithmique, sécrètent beaucoup plus de SOD dans le milieu que les souches non virulentes. La SOD ainsi sécrétée se

lie à la surface de la bactérie pour la protéger des effets néfastes de l'anion superoxyde. Une fois dans le phagosome, les souches virulentes synthétisent une grande quantité de catalase, transformant ainsi le peroxyde d'hydrogène produit lors de la dégradation de l'anion superoxyde par la SOD en d'autres composés moins toxiques.

***Mycobacterium tuberculosis* :**

Il est important de noter que le mécanisme de défense des mycobactéries est complexe et non pleinement compris. Par contre, il a été observé qu'il n'y a pas de corrélation entre la quantité de catalase produite et la virulence des souches (Jackett et coll., 1978; Kusunoso et coll., 1976). Il a aussi été mis en évidence que les souches virulentes produisent une SOD différente des souches non virulentes. Il est aussi à noter que les souches virulentes sécrètent la SOD dans le milieu de culture et que celle-ci s'associe probablement à la membrane comme pour *N. asteroides* pour la protéger, alors que chez les souches non virulentes la SOD reste dans le cytoplasme bactérien (Kusunoso et coll., 1976). Certains faits suggèrent qu'il y a probablement d'autres facteurs impliqués dans la défense des mycobactéries.

***Staphylococcus aureus* :**

Chez cette espèce il y a une corrélation positive entre la quantité de catalase produite, la virulence et la résistance des souches aux phagocytes. Par contre, il n'y a aucune corrélation entre la quantité de SOD produite par la bactérie, la virulence et la résistance de celles-ci (Mandell, 1975).

***Salmonella typhi* :**

Il a été démontré que les souches virulentes de *Salmonella typhi* n'induisent pas de flambée respiratoire par les neutrophiles humains contrairement aux souches non virulentes, qui induisent une forte flambée respiratoire (Kossack et coll., 1981). Il est possible que l'organisme inhibe la flambée respiratoire ou qu'il ne stimule pas le récepteur présent à la surface du phagocyte qui déclenche celle-ci.

***Shigella sonnei* et *Brucella abortus* :**

Pour ces deux espèces bactériennes, la différence entre les souches virulentes et non virulentes se situe dans le LPS de leur enveloppe. Comme les souches virulentes ne stimulent pas de flambée respiratoire, il a été proposé que le LPS serait un autre facteur impliqué dans la résistance des bactéries (Kreutzer et coll., 1979; Madonna et Allen, 1981).

***Haemophilus somnus* :**

Haemophilus somnus est un pathogène bovin qui survit suite à la phagocytose par les neutrophiles, car il réduit, par un processus non connu, la quantité d'intermédiaires réactifs de l'oxygène produits lors de la flambée respiratoire (Czuprynski et Hamilton, 1985).

***Erysipelothrix rhusiopathiae* :**

Cette bactérie est celle qui ressemble le plus à *S. suis*. En effet, elle est Gram positif et cause des maladies qui ressemblent sensiblement

à celles causées par *S. suis* (septicémie, polyarthrite et endocardite) (Wood, 1992). Il a été démontré que la capsule a une importance dans la pathogénicité (Lachmann et Deicher, 1986) et que la virulence du microorganisme est en partie associée à sa résistance à la phagocytose par les polymorphonucléaires (PMNs) murins. Cette capacité lui est conférée par la capsule (Shimoji et coll., 1994). Cette bactérie peut survivre dans des macrophages murins (Timoney, 1969) et dans des PMNs porcins (Timoney, 1970). Une autre caractéristique commune avec *S. suis* est qu'elle possède une SOD mais pas de catalase (Jones, 1986). De plus, cette phagocytose n'est pas accompagnée d'une flambée respiratoire adéquate ce qui laisse supposer qu'*E. rhusiopathiae* inhibe la flambée respiratoire ou induit une très faible réponse. Deux hypothèses sont retenues pour expliquer cette inhibition, dont la première serait l'implication de la SOD. Mais comme les souches virulentes et non virulentes possèdent cette enzyme, il est judicieux de penser que l'implication de celle-ci n'est que très limitée. La deuxième hypothèse serait que le récepteur impliqué dans la phagocytose des souches virulentes ne déclenche pas la flambée respiratoire, alors que la phagocytose des souches non virulentes serait médiée par un récepteur différent, qui lui, déclenche la flambée respiratoire (Shimoji et coll., 1996).

3- MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 CARACTÉRISATIONS ET ORIGINE DES SOUCHES UTILISÉES :

Quatre souches de *S. suis* sérotype 2 ont été utilisées, deux souches virulentes (89-1591 et 31533) et deux souches non virulentes (1330 et 623). La souche 89-1591 a été isolée chez un porc souffrant de septicémie. La souche 1330 a été isolée des poumons d'un porc souffrant de pneumonie. Ces deux souches sont originaires du Québec. La souche 31533 a été isolée d'un cas de méningite chez un porc et la souche 623 a été isolée des amygdales d'un porc asymptomatique. Ces deux souches sont originaires de France. Pour ce qui est de la caractérisation des souches selon la production d'hémolysine (hém) et des protéines MRP et EF, les souches 1591 et 623 sont hém-, MRP - et EF-, alors que la souche 1330 est hém-, MRP +, EF- et la souche 31533 hém+, MRP +, EF +.

3.2 CARACTÉRISATIONS DES SOUCHES 31533 ET 623:

3.2.1 Courbe de croissance

Des géloses au sang de bovins ont été inoculées à partir de souches conservées à -80°C et incubées 24 heures à 37°C. Une ou deux colonies de ces géloses ont ensuite été utilisées pour inoculer 5mL de bouillon THB (Todd Hewitt broth, Difco Laboratories). Celui-ci a été incubé 18 heures à 37°C. D'autres tubes de 5 mL de THB préchauffés à 37°C ont ensuite été inoculés avec 75 µL du bouillon de 18 heures. Les tubes ont été incubés 8 heures dans un bain-marie à 37°C avec agitation (120rpm). À chaque 60 minutes, la densité optique à 540 nm de trois

bouillons a été mesurée et un compte viable a été effectué. La manipulation a été reprise au minimum trois fois pour chaque souche.

3.2.2 Phagocytose

3.2.2.1 Préparation des macrophages

Les macrophages activés ont été obtenus de la façon suivante: pour chaque essai 5-6 souris CF-1 mâles (Charles Rivers Inc.) âgées entre 6-8 semaines ont été utilisées. Les souris ont été inoculées par voie intrapéritonéale avec 1,5 mL de thioglycollate 3% (p/v) (Sigma) quatre jours avant la récolte des macrophages. Ceux-ci ont été récoltés par lavage de la cavité péritonéale avec 5 mL de HBSS froid (Hank's Balanced saline solution, sans rouge de phénol, Ca⁺ et Mg⁺; Gibco). Les macrophages ont été centrifugés à 2000 rpm pendant 10 min à 4°C et ensuite resuspendus dans 5 mL de RPMI 1640 (avec glutamine, 25mM d'HEPES et exempt de bicarbonate de sodium; Gibco) additionné de 10% SBF (sérum bovin fétal désactivé; Gibco) préchauffé à 37°C. Le nombre de macrophages vivants présents dans la suspension a été déterminé par compte au bleu de Trypan. La concentration a été ajustée à 5 X10⁵ macrophages/mL. Ensuite, 1 mL de cette suspension a été distribué dans chaque puits d'une plaque de culture cellulaire de 24 puits (Corning), contenant des lamelles circulaires de 13 mm (J.B.Em). Ces cellules ont été incubées en atmosphère humide contenant 5% de CO₂ pendant 45 min à 37°C. Trois lavages au HBSS ont permis d'enlever les cellules non adhérentes et la plaque a été remise à incuber dans les mêmes conditions jusqu'à l'utilisation.

3.2.2.2 Préparation des bactéries

Le protocole tel que décrit pour les courbes de croissance a été utilisé avec les modifications suivantes: le bouillon inoculé avec le bouillon de 18 heures a été incubé de 5 à 6 heures dans un bain-marie à 37°C avec agitation (120 rpm). Une fois l'incubation terminée, la densité optique de la suspension a été mesurée à 540 nm et les bactéries centrifugées à 2000 rpm pendant 10 minutes. Ensuite, le culot a été resuspendu dans 4 mL de RPMI avec 10% SBF. La suspension bactérienne a par la suite été diluée de façon à obtenir 5×10^6 bactéries/mL.

3.2.2.3 Opsonisation des bactéries

Le même protocole de croissance des bactéries a été utilisé avec la modification suivante: après centrifugation, les bactéries ont été resuspendues dans 3,2 mL de RPMI avec 10% SBF plus 0,8 mL de sérum de lapin activé ou désactivé selon le cas. Le tube a été incubé 20 minutes dans le bain-marie à 37°C avec agitation (120 rpm). Suite à l'opsonisation, la suspension a été diluée pour obtenir 5×10^6 bactéries/mL.

3.2.2.4 Essais de phagocytose avec des bactéries vivantes

Des essais ont été réalisés afin de caractériser les souches 31533 et 623 et de comparer ces résultats avec ceux déjà connus des souches 1591 et 1330, afin d'avoir l'assurance que les deux nouvelles souches s'apparentent aux deux autres.

89-1591 a été utilisée comme contrôle. De plus, deux plaques ont été nécessaires pour chaque essai: une plaque pour le temps 1 heure et une plaque pour le temps 3 heures. Le milieu de culture de chaque puits contenant des macrophages adhérents a été enlevé et remplacé par 1 mL de la suspension bactérienne, ce qui donne un ratio macrophages:bactéries de 1:10. Ces plaques ont été incubées 60 minutes en atmosphère humide contenant 5% de CO₂ à 37°C et ensuite les manipulations suivantes ont été effectuées pour la plaque de 3 heures. Chaque puits a été lavé 5 fois avec du HBSS afin d'enlever les bactéries non phagocytées. Une fois ces lavages terminés, 1 mL de RPMI avec 10% de SBF contenant 0,45 µg/mL de pénicilline G (Sigma) a été ajouté à chaque puits afin de mesurer la survie intracellulaire. La plaque a ensuite été incubée 2 heures additionnelles dans les mêmes conditions. Une fois l'incubation terminée, pour les deux plaques, cinq lavages au HBSS ont été effectués et les lamelles ont été colorées 45 secondes à l'acridine orange (0,144 mg/mL dans du HBSS, pH 7,2 ; Sigma), lavées 2 fois au HBSS, colorées 45 secondes avec du cristal violet (0,50 mg/mL dans du HBSS, pH 7,2; Sigma), lavées 2 fois au HBSS et ensuite rincées avec une solution de gélatine 3%. Il est important d'effectuer ces manipulations à l'obscurité, puisque l'acridine orange est photosensible. Une fois la coloration terminée, les lamelles ont été collées avec de l'Entellan (Merck Co.) sur des lames pour la microscopie et observées le lendemain à 1000X en utilisant un microscope à fluorescence.

3.2.3 Essais de phagocytose avec des bactéries mortes

Avant d'entreprendre le dosage du NO, il était essentiel de connaître le pourcentage de phagocytose lorsque les paramètres requis pour le dosage sont utilisés. En effet, il fallait s'assurer que ce pourcentage était assez élevé pour déclencher une production quantifiable de NO. Les paramètres suivants ont été utilisés pour ces essais: des bactéries tuées à la chaleur (voir protocole plus loin), un temps d'incubation de 24 heures et une coloration Diff-Quick. Bien que cette coloration mette en évidence les bactéries intracellulaires et extracellulaire, la distinction entre les deux était très nette et aucune confusion n'était possible.

3.2.4 Essais de virulence chez la souris

Les souches ont été cultivées tel que décrit précédemment. Un volume de 200 μ L du bouillon de 18 heures a été ajouté à 5 mL de bouillon THB contenant 10% de sérum bovin fétal désactivé. Ce dernier est incubé de 5 à 6 heures dans les conditions décrites. La suspension finale est diluée pour donner des solutions de 10^6 - 10^7 et 10^8 UFC/mL. Des souris CF-1 mâles âgées entre 20 et 25 jours ont été injectées par voie intrapéritonéale avec 1 mL de suspension bactérienne afin de trouver la dose idéale à injecter pour que les souris présentent les symptômes de l'infection à *S. suis*.

3.3 PROTOCOLE D'INFECTION *IN VIVO* :

Des souris CF-1 mâles âgées de 20 à 25 jours sont gardées dans le local où aura lieu l'infection une semaine avant celle-ci pour fin d'acclimatation. La suspension injectée a été préparée tel que décrit pour l'essai de virulence. Une dose de 1×10^7 UFC/mL a été injectée dans un volume de 1 mL à 5 souris par temps, afin de s'assurer qu'il en resterait trois de vivantes pour chaque temps de prélèvement. Pour chaque temps les manipulations suivantes ont été réalisées: premièrement, pour chaque souris (3 par temps) un échantillon de sang a été prélevé dans le sinus orbital afin de réaliser des comptes viables. Les géloses ont été incubées à 37°C plus 5% de CO₂ de 24h à 48h. Une fois l'échantillon sanguin prélevé, les souris ont été euthanasiées et les cerveaux ont été immédiatement prélevés.

3.3.1 Prélèvement des cerveaux

Une fois les souris tuées, elles ont été mises séparément dans de l'alcool 70%, afin de les désinfecter. Les souris ont ensuite été placées sur le ventre et la peau recouvrant la boîte crânienne a été enlevée. Le crâne a ensuite été coupé caudalement aux yeux. La boîte crânienne a délicatement été enlevée et le cerveau prélevé. Celui-ci a été immédiatement fixé dans du formol tamponné 10% et mis au réfrigérateur 24 heures. Les cerveaux ont ensuite été mis dans des cassettes et processés de façon routinière. Des coupes sériées de 7 µm ont ensuite été colorées au H.P.S. (Hématoxyline Phloxine Safran) et à la coloration de Gram (voir protocole en annexe).

3.3.2 Prélèvements bactériens

Une fois les méninges découvertes, un prélèvement à la surface de celles-ci a été effectué à l'aide d'un écouvillon préalablement trempé dans du tampon phosphate saline (PBS). Deux mL de bouillon THB ont ensuite été inoculés ainsi qu'une gélose au sang. Une fois le cerveau enlevé, les mêmes manipulations ont été réalisées dans la boîte crânienne. Les bouillons et les géloses ont été incubées à 37°C plus 5% de CO₂ pendant 48 heures. Ces prélèvements ont été effectués afin de savoir à partir de quel moment *S. suis* est présent dans le cerveau.

3.3.3 Protocole INFECTION *IN VIVO* #1

Lors de cette expérience, les manipulations décrites précédemment ont été effectuées aux temps 3h- 6h- 9h- 12h- 18h- 24h- 36h et 48h post-infection (p.i.).

3.3.4 Protocole INFECTION *IN VIVO* #2

Suite à la première expérience, des temps permettant d'obtenir des résultats intéressants ont été sélectionnés. C'est pourquoi pour cette expérience, les prélèvements ont été effectués aux temps 3h- 9h- 18h- 24h- 36h- 48h- 72h et 96h p.i.. Les cerveaux n'ont pas été prélevés et les prélèvements effectués sur les méninges ont été différents. Croyant une contamination possible en provenance du sang lors de nos premiers prélèvements, la technique a été changée. Des comptes viables ont aussi été réalisés.

3.3.4.1 Prélèvements bactériens

Une fois les méninges découvertes, elles ont été brûlées à l'aide d'une spatule, une incision a été pratiquée à cet endroit et le prélèvement, tel que décrit précédemment a été effectué. Cette technique est la méthode standard utilisée pour échantillonner des organes au laboratoire de bactériologie clinique de la Faculté de médecine vétérinaire de Saint-Hyacinthe.

3.3.5 Protocole INFECTION *IN VIVO* #3:

Lors de cette expérience, les manipulations suivantes ont été effectuées pour les temps 30h- 36h et 48h p.i. : comptes viables à partir du sang et prélèvement des cerveaux pour les études en microscopie électronique (M.E).

3.3.5.1 Préparation des cerveaux pour la microscopie électronique (M.E.):

Les cerveaux ont été récoltés de la même façon que précédemment et fixés à 4°C pendant 24h dans le fixateur (voir protocole en annexe). Ensuite, celui-ci a été remplacé par du tampon pour la microscopie électronique (voir protocole en annexe) jusqu'à la post-fixation.

Post-fixation (jour 1)

Les cerveaux, coupés en 8 morceaux, ont été mis dans une solution de tetroxide d'osmium à 2% et incubés 4h à la température de la pièce. Par la suite, les échantillons ont été rincés deux fois pendant 15 minutes avec le tampon. Les pièces ont ensuite été déshydratées à l'aide

d'un gradient croissant d'acétone pendant quinze minutes dans chaque concentrations (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% et trois fois 100%). Finalement, les tissus ont été mis dans un mélange Épon-acétone 1:1 (voir protocole en annexe), pour ainsi faire l'infiltration.

Jour 2

La même procédure que pour la première infiltration a été répétée, mais cette fois avec un mélange Épon-acétone 3:1 et les bouteilles ont été mises à tourner environ sept heures. Ensuite l'Épon-acétone 3-1 a été remplacé par de l'Épon 100% (voir en annexe) et les bouteilles ont été remises à tourner pour la nuit.

Jour 3

Les tissus ont été mis dans des moules et enrobés d'Épon 100% frais. Les moules ont ensuite été placés dans un four à 60°C, pendant 48h.

3.3.6 Protocole INFECTION *IN VIVO* #4

Afin de s'assurer que les paramètres d'infection utilisés causaient bien la méningite chez les souris, l'expérience #4 a été réalisée pour des temps plus longs. En effet, des études préliminaires (décrites à la section 2.2.4 Essais de virulence chez la souris) indiquaient que cela prenait trois (72h) ou quatre (96h) jours avant de voir apparaître les premiers signes de méningite. C'est pourquoi, lors de cette expérience que les temps de prélèvements ont été 72h et 96h p.i.. Les manipulations

qui ont été effectuées sont des comptes viables à partir du sang et le prélèvement des cerveaux pour l'enrobage à la paraffine.

3.4 PROTOCOLE DU DOSAGE DE L'OXYDE NITRIQUE (NO):

3.4.1 Protocole du lavage de vaisselle

La vaisselle utilisée a trempé dans une solution eau-eau de Javel au minimum une journée et ensuite au moins une journée dans une solution eau-savon. Par la suite, la vaisselle a été rincée 10 fois à l'eau distillée et 10 fois à l'eau bidistillée fraîche. Elle a ensuite été autoclavée deux fois pendant 15 minutes. Afin de s'assurer que tous les milieux et solutions utilisés étaient exempts de LPS, un test de Limulus a aussi été effectué.

3.4.2 E-Toxate (Limulus Amebocyte Lysate):

Le test a été effectué en suivant les instructions données par le fabricant (Sigma).

3.4.3 Dosage de l'oxyde nitrique

Pour chaque essai, de 13 à 15 souris CD-1 mâles (Charles Rivers Inc) âgées de 6 à 8 semaines ont été utilisées. Elles ont été injectées par voie intrapéritonéale avec 1,5mL de thioglycollate 3%, quatre jours avant de récolter les macrophages. Ceux-ci ont ensuite été récoltés de la même façon que précédemment (section 3.2.2.1). Les cellules ont été suspendues dans 2 mL de DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium, haut glucose plus L-glutamine et sans pyruvate de sodium et

bicarbonate de sodium; Gibco) supplémenté avec 10% de SBF et d'antibiotiques (pénicilline-streptomycine; Gibco). La suspension de macrophages a été diluée de façon à obtenir 5×10^6 macrophages/mL et 100 μ L de celle-ci ont été distribués dans chaque puits (5×10^5 macrophages par puits) d'une plaque de 96 puits à fond rond (Corning). Par la suite, les cellules ont été incubées 2h à 37°C dans une atmosphère enrichie de 5% CO₂ afin de permettre l'adhérence, lavées trois fois avec du DMEM avec 10% de SBF et des antibiotiques et remises à incuber toute la nuit dans les mêmes conditions. Une fois l'incubation complétée, les cellules ont de nouveau été lavées trois fois avec du milieu et ensuite les solutions de réaction ont été ajoutées aux puits (voir plus loin pour la description). Les cellules ont ensuite été incubées 24 heures. Une fois l'incubation terminée, 100 μ L du réactif de Greiss (voir protocole en annexe) ont été ajoutés. Les puits ont été incubés 10 minutes à la température de la pièce et la densité optique à 570 nm de chaque puits a été lue à l'aide d'un lecteur "Dynatech 5000 kinetic reader" (Dynatech). La concentration d'oxyde nitrique présente dans chaque puits a été déterminée indirectement par la présence de nitrite, à l'aide d'une courbe standard de NaNO₂ (nitrite de sodium, utilisé à des concentrations variant entre 0,3125 μ M et 20 μ M; Sigma).

3.4.3.1 Préparation des bactéries

Les cultures bactériennes ont été préparées tel que décrit pour les essais de phagocytose. Les bactéries du bouillon de 6 heures ont été centrifugées à 4000 rpm pendant 10 minutes et lavées trois fois au PBS. Des comptes viables ont alors été effectués et par la suite les bactéries ont

été tuées dans un bain-marie, 60 minutes à 60°C. Il était très important d'agiter les tubes aux 10 minutes afin de répartir uniformément la chaleur. Ensuite, les bactéries ont été centrifugées et resuspendues dans 5mL de DMEM avec 10% de SBF et des antibiotiques. Les bactéries ont ensuite été congelées à -80°C jusqu'à leur utilisation. L'absence de bactéries viables dans chaque suspension a été vérifiée en inoculant des géloses au sang de bovin avec 100 µL de la suspension. Dans les essais, les bactéries ont été utilisées à une concentration de 5×10^6 bactéries par puits.

3.4.3.2 Solutions de réaction

Pour chaque plaque, les mélanges suivants ont été réalisés (tous au minimum en triplicata) :

Contrôles :

- puits contenant du milieu.
- puits contenant des macrophages.

Contrôles de la contamination externe d'endotoxines :

- puits contenant des macrophages et de la polymyxine B (utilisée à raison de 40 µg/puits (Calbiochem)).
- puits contenant des macrophages, des bactéries et de la polymyxine B.

Essais :

- puits contenant des macrophages et des bactéries.
- puits contenant des macrophages, des bactéries et du LPS

(*E. coli* 026:B6), utilisé à une concentration de 175 ng/puits (Sigma). Le LPS sert à stimuler la production d'oxyde nitrique chez les macrophages.

Inhibition des NOS:

- tous les essais ont été faits en duplicata avec et sans L-NMMA (N^G-Monométhyl-L-Arginine), utilisé à une concentration de 0.5mM par puits (Calbiochem). Le L-NMMA est un inhibiteur des NOS.

3.5 PROTOCOLE DU DOSAGE DE L'ANION SUPEROXYDE:

3.5.1 Préparation des bactéries

Les bactéries ont été préparées tel que décrit dans la section du dosage de l'oxyde nitrique avec les modifications suivantes: une fois mortes, les bactéries sont resuspendues dans 5 mL de HBSS supplémenté de 2% de glucose et lors des essais elles ont été utilisées à une concentration de 1×10^7 UFC/mL.

3.5.2 Préparation des macrophages

Les macrophages ont été récoltés tel que décrit précédemment et dilués de façon à obtenir 1×10^6 macrophages/mL. Un volume de 1 mL de cette suspension a été distribué dans chaque puits d'une plaque pour culture cellulaire de 24 puits. Les cellules ont été incubées 2 heures à 37°C plus 5% de CO₂ et par la suite lavées trois fois avec du DMEM contenant 10% de SBF et des antibiotiques et réincubées jusqu'au lendemain.

3.5.3 Dosage de l'anion superoxyde

La méthode modifiée de réduction du ferricytochrome C a été utilisée pour le dosage (Johnston, 1984). Le lendemain, les cellules ont été lavées deux fois avec du HBSS contenant 2% de glucose et la solution de réaction a été immédiatement ajoutée (voir description plus loin). Les cellules ont été incubées 1 heure à 37°C et la densité optique à 550nm du surnageant a ensuite été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. Le nombre de nanomoles de cytochrome C réduit, qui correspond au nombre de nanomoles d'anion superoxyde produit, a été calculé en utilisant le coefficient d'extinction molaire du cytochrome C .

3.5.3.1 Solutions de réaction

Contrôles:

- puits contenant seulement du cytochrome C (utilisé à une concentration de 1mg/mL (Calbiochem).
- puits contenant des macrophages et du cytochrome C.
- tout les essais ont été réalisés en duplicata avec de la SOD (Superoxyde dismutase), utilisée à une concentration de 40 µg/mL (Calbiochem).

La SOD transforme l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène.

Essais :

- puits contenant des macrophages, du cytochrome C et du PMA (Phosbol 12-myristate 13-acétate), utilisé à une concentration de 100ng/mL (Sigma). Le PMA sert à stimuler la production d'anion superoxyde chez les macrophages (contrôle positif).
- puits contenant des macrophages, du cytochrome C et des bactéries.
- puits contenant des macrophages, du cytochrome C, des bactéries et du PMA.

3.6 STATISTIQUES :

Les données ont été analysées à l'aide du programme InStat2 en utilisant le test de Student's non pairé à deux variables et l'analyse de variance à une voie (ANOVA).

4- RÉSULTATS

4.1 CARACTÉRISATION DES SOUCHES 31533 ET 623:

Les courbes de croissances des souches 31533 et 623 sont représentées aux Figures #1 et #2 (p.54 et p.56).

Les résultats obtenus lors des essais de phagocytose avec les souches vivantes (Tableau I, p. 57) montrent que les bactéries de la souche non virulente sont phagocytées en plus grand nombre que les bactéries de la souche virulente et ce avec ou sans opsonisation ($P < 0.02$). Nous pouvons aussi constater qu'il n'y a pas vraiment de différence significative entre les pourcentages de phagocytose que se soit avec ou sans opsonisation. Il n'y a pas de différence non plus entre les deux opsonisations (avec sérum activé ou désactivé). Finalement, nous pouvons constater que les pourcentages de phagocytose sont inférieurs à 10% (Tableau I, p. 57).

Pour ce qui est de la survie intracellulaire, les deux souches survivent au moins 3 h que se soit avec ou sans opsonisation. Comme les pourcentages de phagocytose sont très bas (Tableau I, p. 57), il a été impossible de calculer, de façon significative, le pourcentage de survie intracellulaire. Seule une approximation du pourcentage a été possible: de 80 à 90% pour la souche 623 et de 90% à 100% pour la souche 31533. Tout ce que nous pouvons affirmer à partir de ces observations, est que le nombre de bactéries vivantes par rapport au nombre de bactéries mortes semble légèrement supérieur pour la souche virulente que pour la souche non virulente. De plus, il ne semble pas y avoir de différence significative entre la survie des souches opsonisées et non opsonisées.

Les résultats obtenus lors de l'essai de phagocytose sans opsonisation et avec des bactéries tuées par la chaleur, incubées 24 heures avec les macrophages (Tableau II, p. 58), montrent que les pourcentages de phagocytose devraient être suffisants pour engendrer une production de NO significative.

Finalement, pour ce qui est des essais de virulence chez la souris, les résultats indiquent (Tableau III, p. 59) que la souche 623 est non virulente, puisque aucune des concentrations de bactéries injectées n'induit la maladie chez la souris et que la souche 31533 est virulente. Les signes cliniques d'infection observés sont une léthargie, des sécrétions purulentes au niveau des yeux et de la photophobie. Les signes cliniques de méningite sont une atteinte du système nerveux manifestée par du pédalage et une désorientation caractérisée par un mouvement de toupie lorsque la souris est tenue en l'air par la queue. La dose idéale à injecter afin que les souris présentent des signes cliniques sans mortalité aiguë est de 1×10^7 UFC/mL. Avec 10^8 UFC/mL elles décèdent en deçà de 15 h alors qu'avec 10^6 UFC/mL elles ne développent pas la maladie (Tableau IV, p.62).

Figure 1

Courbe de croissance de la souche virulente 31533. Le graphique est exprimé en UFC/mL en fonction de la densité optique à 540nm.

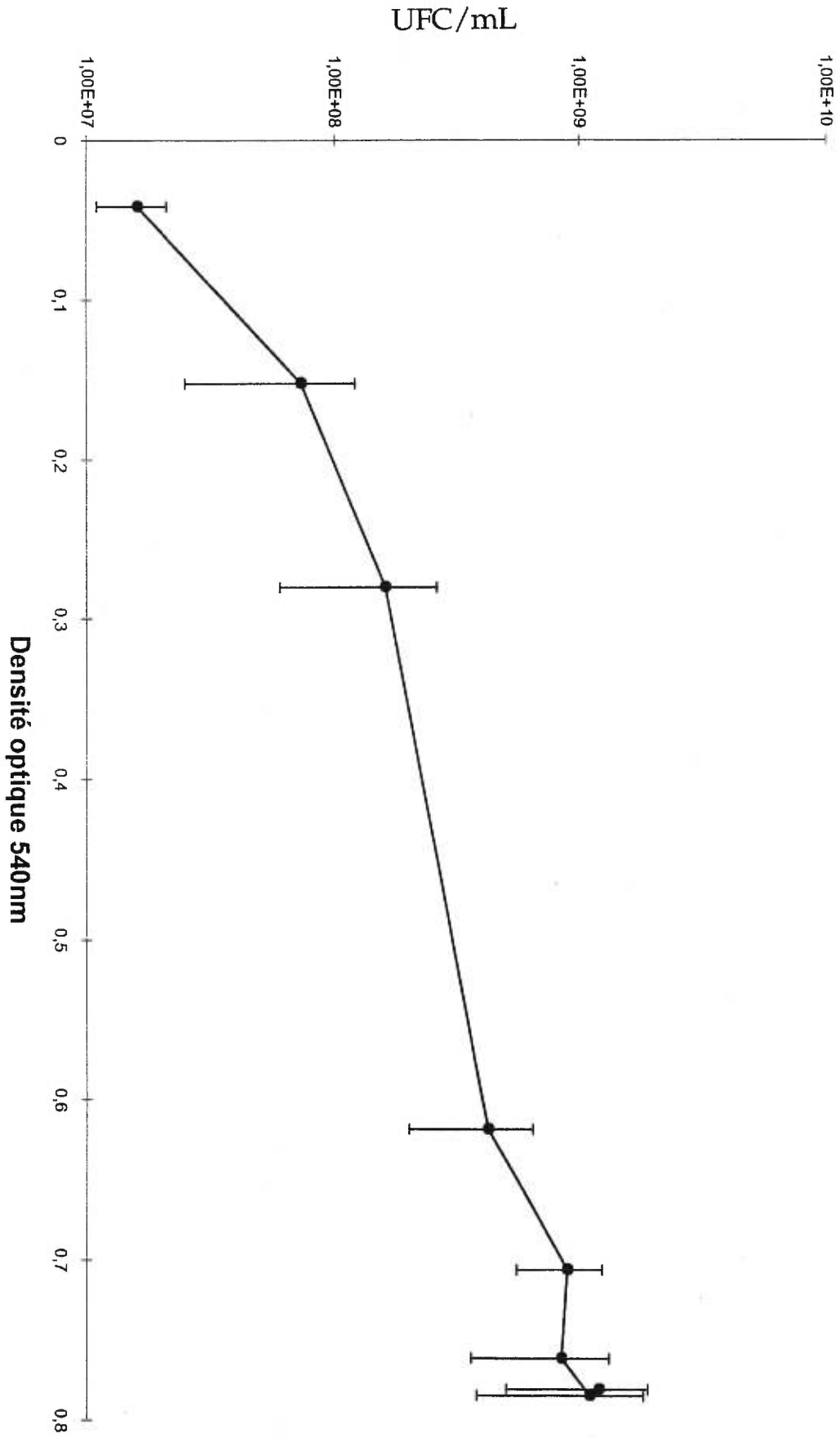


Figure 2

Courbe de croissance de la souche non virulente 623. Le graphique est exprimé en UFC/mL en fonction de la densité optique à 540 nm.

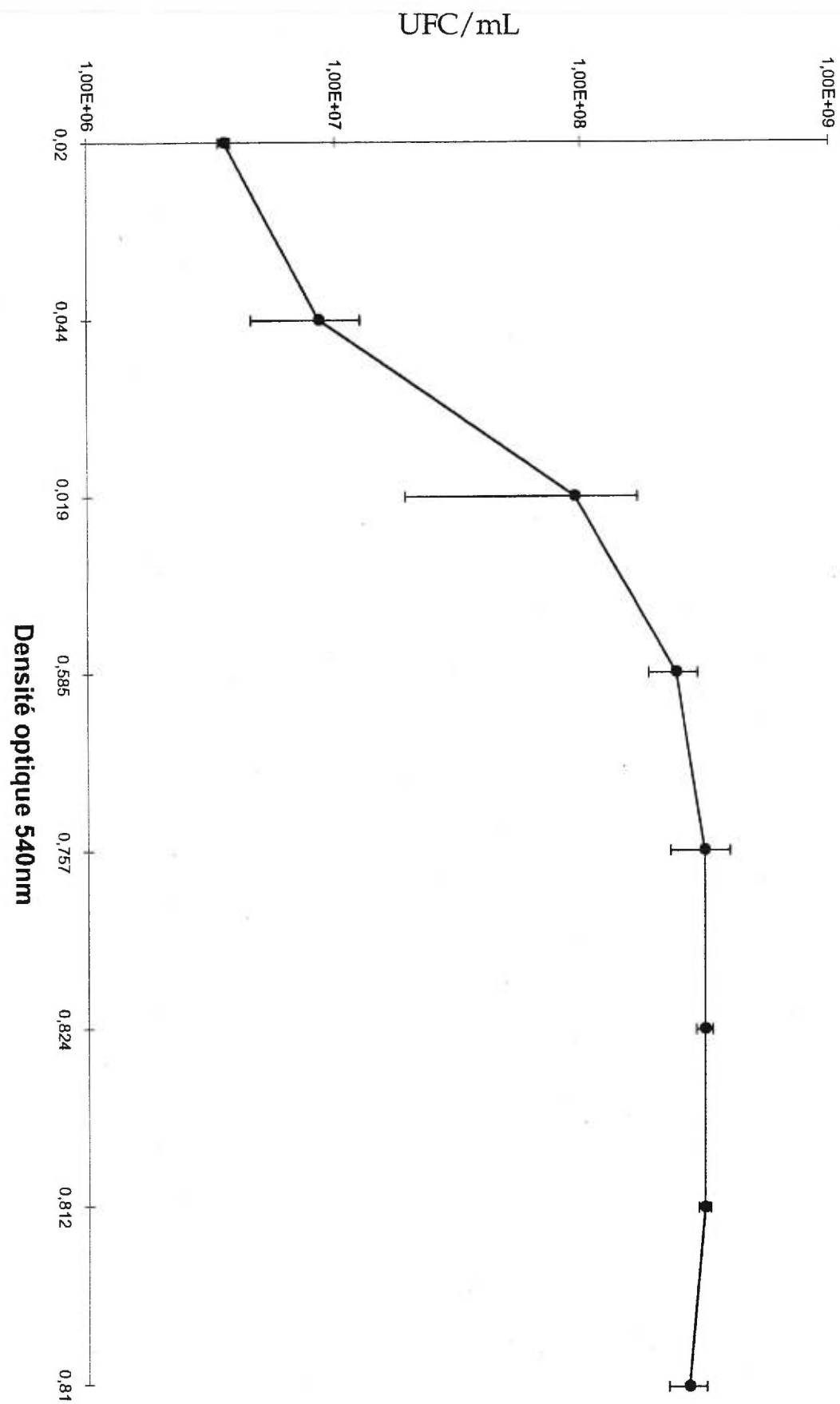


Tableau I

Pourcentage de phagocytose de deux souches vivantes de *Streptococcus suis* sérotype 2 (5×10^6 UFC) par des macrophages péritonéaux de souris (5×10^5 cellules), après 1 heure d'incubation à 37°C en présence de 5% de CO₂ (moyenne +/- l'écart-type).

Souches	Sans	Opsonisation avec	
	opsonisation	sérum activé	sérum désactivé
31533	2.6 +/- 1.7*	3.3 +/- 2.5	1.4 +/- 0.5
623	6.1 +/- 1.2	5.7 +/- 3.5	3.9 +/- 1.3

*: Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ou plus.

% phagocytose = $\frac{\text{nombre de macrophages ayant phagocyté}}{200 \text{ macrophages au total}} \times 100$

Tableau II

Pourcentage de phagocytose, sans opsonisation, de quatre souches de *Streptococcus suis* sérotype 2 (5×10^6 UFC) tuées par la chaleur. Les bactéries sont en présence de macrophages péritonéaux de souris (5×10^5 cellules), 24 heures à 37°C avec 5% de CO₂ (moyenne +/- l'écart-type).

Souches	Moyenne + /- l'écart-type
31533	8.5 + /- 2.3
623	11.3 +/- 1.7
1591	16.5 +/- 3.9
1330	8.5 +/- 3.9

Tableau III

Infection de souris CF-1 mâles, âgées de 25 à 30 jours, avec une souche virulente (31533) et une souche non virulente (623) de *S. suis* sérotype 2.

Observations	31533			623		
	Dose infectante*			Dose infectante		
	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
Présence de signes cliniques:						
- 0 - 24h		5/5**				
Présence de signes de Méningite:						
-entre 72h et 96h		3/5				
Absence de signes cliniques:						
- 7 jours et +	5/5			5/5	5/5	5/5
Décès:						
- 0 - 15h			5/5			
-entre 72h et 96h		3/5	-----***			

Note: Cinq souris ont été inoculées avec chacune des doses.

*: UFC/mL

** : Nombre de souris affectées / nombre de souris inoculées.

***: indique que l'expérience est terminée.

4.2 INFECTION *IN VIVO* :

4.2.1 Compte viable à partir du sang

Les résultats à la Figure 3, (p.65) montrent que le nombre de bactéries dans le sang diminue graduellement jusqu'à 96h p.i.. L'augmentation du compte de bactéries viables entre 18h p.i. et 24h p.i. n'est pas significative ($P>0.05$). Finalement, une baisse de deux log est observée en quatre jours, bien que la bactériémie persiste.

4.2.2 Prélèvements bactériens

Les résultats du Tableau IV, (p. 62) démontrent que la bactérie est isolée à partir des méninges, de la boîte crânienne et du cerveau dès 3h p.i.

4.2.3 Histologie et M.E

Bien qu'il y ait des bactéries dans le cerveau avant 36h p.i., ce n'est qu'à ce temps que le nombre présent est suffisamment élevé pour permettre leur observation en microscopie optique et électronique. C'est d'ailleurs à ce temps que le plus grand nombre de bactéries est observé. Au temps 48h p.i., le nombre de bactéries dans le cerveau est encore suffisant pour permettre l'observation en microscopie optique, mais pas en M.E. Pour ce qui est des cerveaux examinés au temps 3 jours p.i., on remarque une méningite suppurative sévère caractérisée par des infiltrations marquées de PMN (Figure 8, p.71), alors qu'au temps 4 jours p.i. les cerveaux montrent des abcès, un nombre élevé de bactéries dans le tissu nerveux et de nombreuses hémorragies. Ce phénomène est beaucoup moins fréquent aux temps plus courts. Finalement, le nombre

Finalement, le nombre de cellules inflammatoires est beaucoup moins élevé qu'au temps 3 jours p.i.

Tableau IV

Prélèvements effectués sur les méninges, dans la boîte crânienne ou dans le cerveau de souris infectées avec 1×10^7 UFC/mL de la souche virulente 31533 de *S. suis* sérotype 2 à divers temps p.i.. Les résultats sont indiqués en terme de croissance positive (+) ou négative (-).

Temps p.i.	Méninges	Boîte crânienne	Cerveau
3 h	+	+	+
6 h	+	+	ND
9 h	+	+	+
12 h	+	+	ND
18 h	+	+	+
24 h	+	+	+
36 h	+	+	+
48 h	+	+	+
72 h	ND	ND	+
96h	ND	ND	+

Note: ND: non déterminé.

4.2.4 Localisation des bactéries dans le cerveau

La majorité des bactéries observées se retrouvent libres dans l'espace sub-arachnoïdien (Figure 4, p. 67). Un certain nombre d'entre elles se trouvent aussi dans les PMN (Figure 5, p. 67). Nous avons remarqué que les bactéries se trouvant à proximité des vaisseaux sanguins, sont toujours à l'extérieur de ceux-ci, jamais à l'intérieur (Figure 6, p. 69). Un certain nombre de bactéries sont aussi retrouvées dans le tissu nerveux (Figure 7, p. 69) formant alors des abcès. Les bactéries se retrouvent aussi près des ventricules.

4.2.5 Forme des bactéries

Toutes les bactéries observées, qu'elles soient libres ou intracellulaires, possèdent des capsules assez épaisses. Une adhérence aux tissus nerveux est aussi notée (Figure 9, p. 71). En effet, un nombre significatif de bactéries adhérants aux tissus est observé en M.E. Plusieurs bactéries en division sont vues, autant à l'intérieur qu'à l'extérieur des cellules. Finalement, on observe que la majorité des bactéries présentes dans les cellules sont à l'intérieur de vacuoles (Figure 10, p. 73).

Figure 3

Nombre de UFC/mL dans le sang en fonction du temps post-infection.

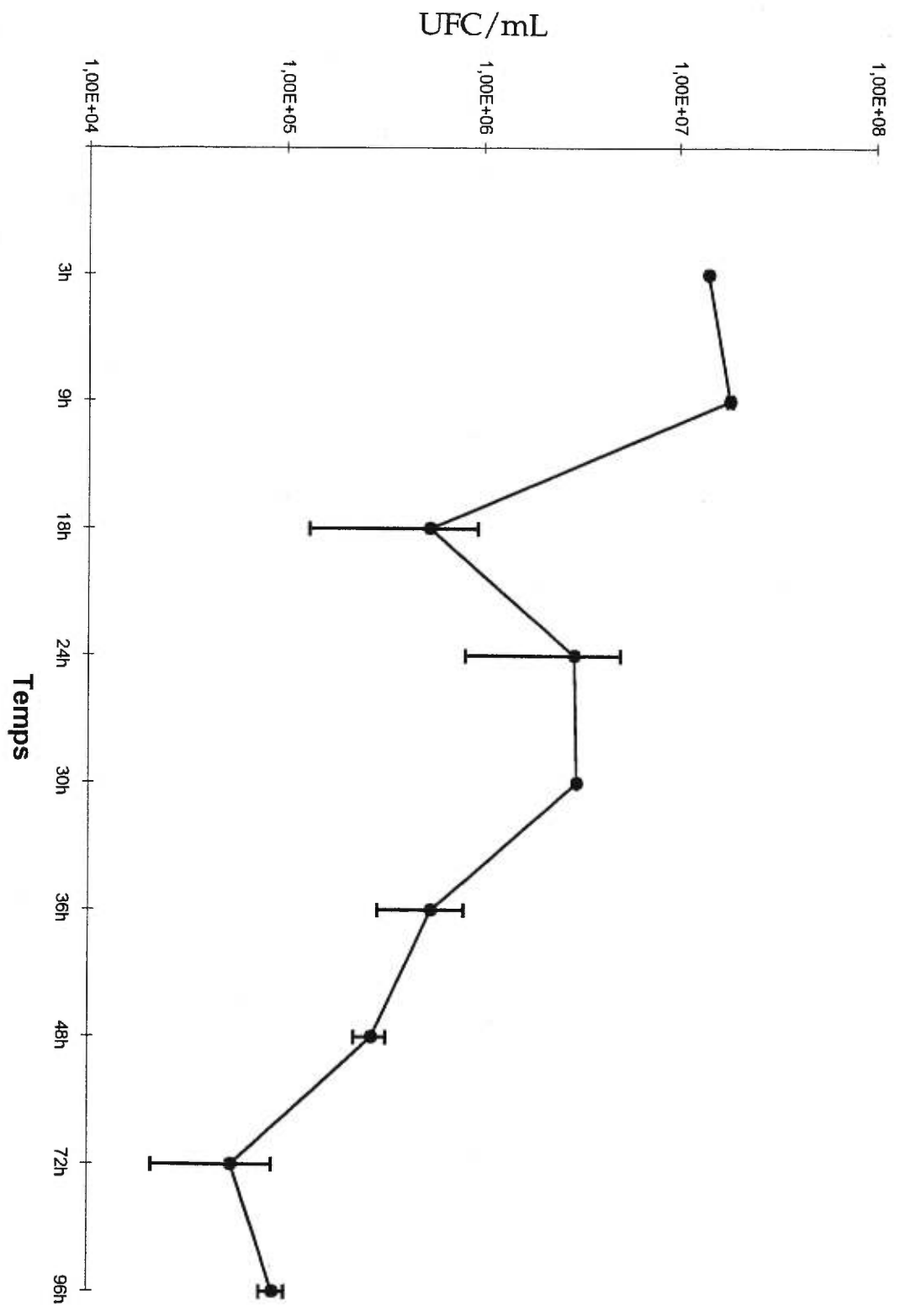


Figure 4

Coupe semi-fine d'un cerveau de souris infectée avec 1×10^7 UFC/mL de la souche virulente 31533 (36h p.i.). La plupart des bactéries sont extracellulaires. Bleu de toluidine. Grossissement 1000X.

Figure 5

Coupe d'un cerveau de souris infectée avec 1×10^7 UFC/mL de la souche virulente 31533 (36h p.i.). On voit que les bactéries intracellulaires sont dans des PMN. Microscopie électronique. Barre: 5 μ m.

Figure 4

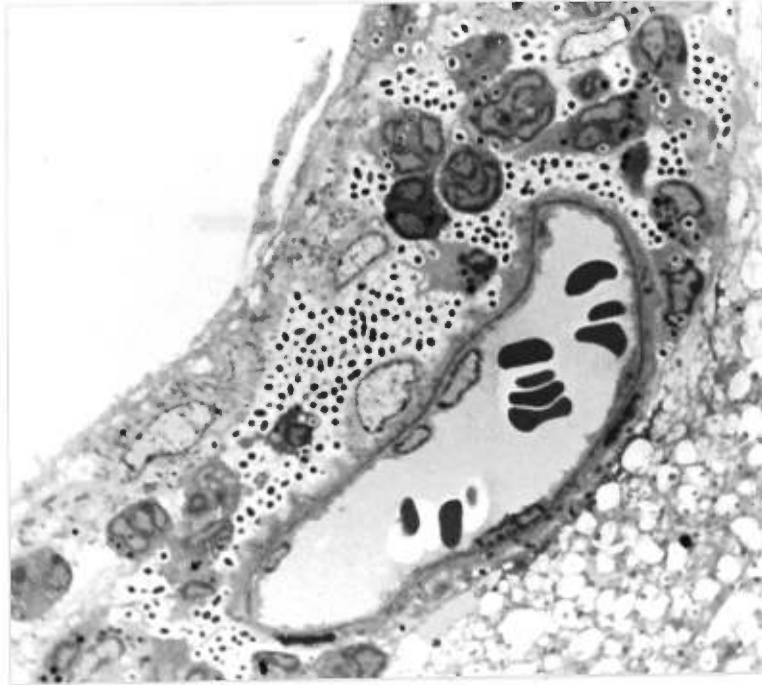


Figure 5

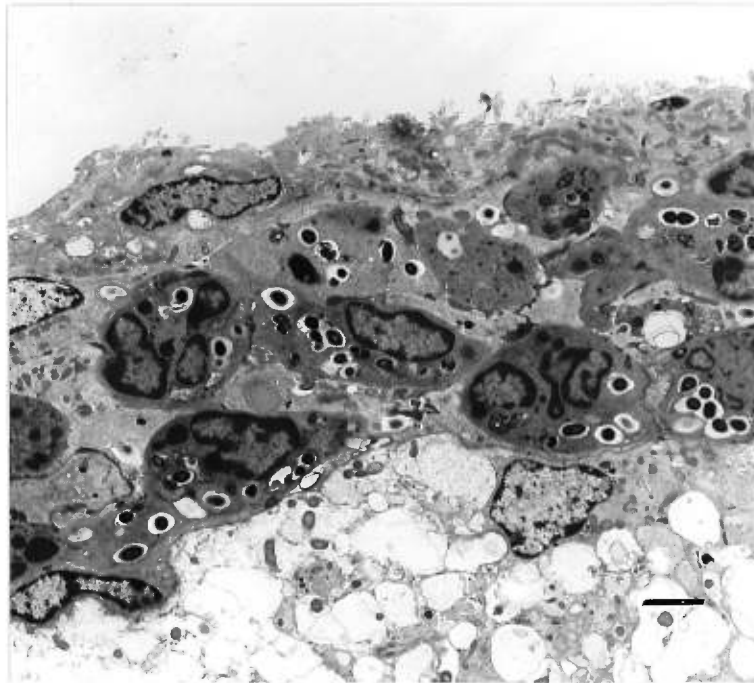


Figure 6

Coupe sériée d'un cerveau de souris infectée avec 1×10^7 UFC/mL de la souche virulente 31533 (36h p.i). Toutes les bactéries sont situées à l'extérieur du vaisseau sanguin. Coloration de Gram. Grossissement 1000X.

Figure 7

Coupe sériée d'un cerveau de souris infectée avec 1×10^7 UFC/mL de la souche virulente 31533 (36h p.i). Coloration de Gram. Grossissement 400X. Les flèches montrent l'emplacement des bactéries.

Figure 6



Figure 7

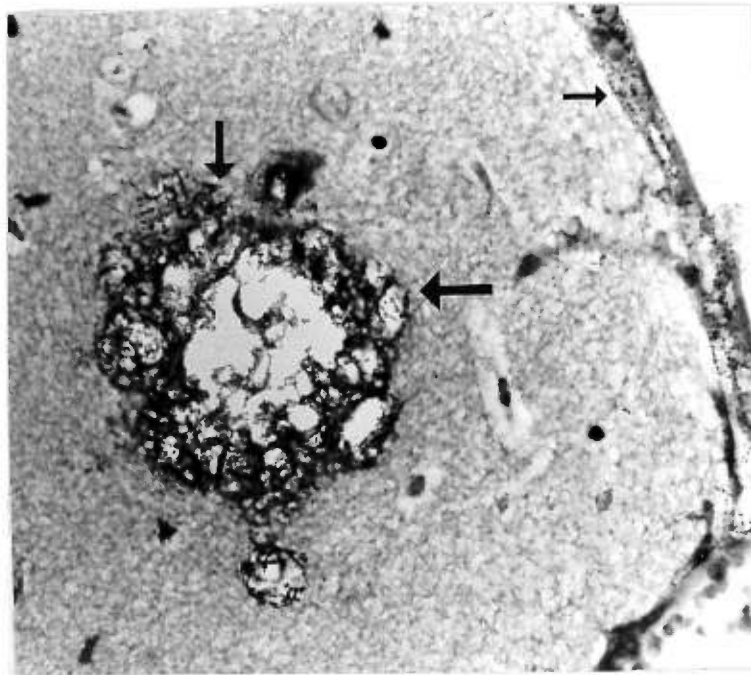


Figure 8

Coupe sériée d'un cerveau de souris infectée avec 1×10^7 UFC/mL de la souche virulente 31533 (36h p.i). Nous voyons qu'il y a un nombre très élevé de cellules inflammatoires dans l'ESA. Hématoxyline Phloxine Safran (H.P.S.). Grossissement 400X.

Figure 9

Cerveau de souris infectée avec 1×10^7 UFC/mL de la souche virulente 31533 (36h p.i.). Barre: $0.3 \mu\text{m}$.

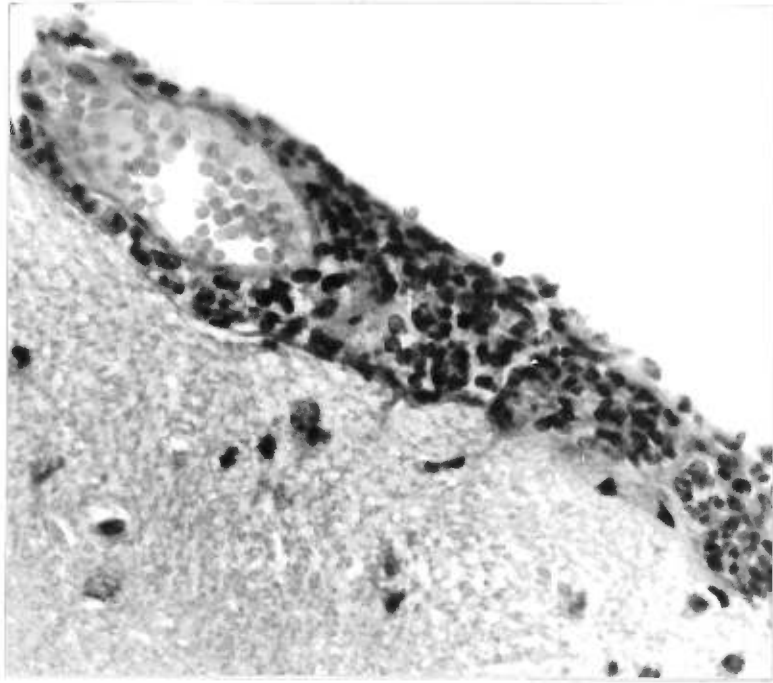
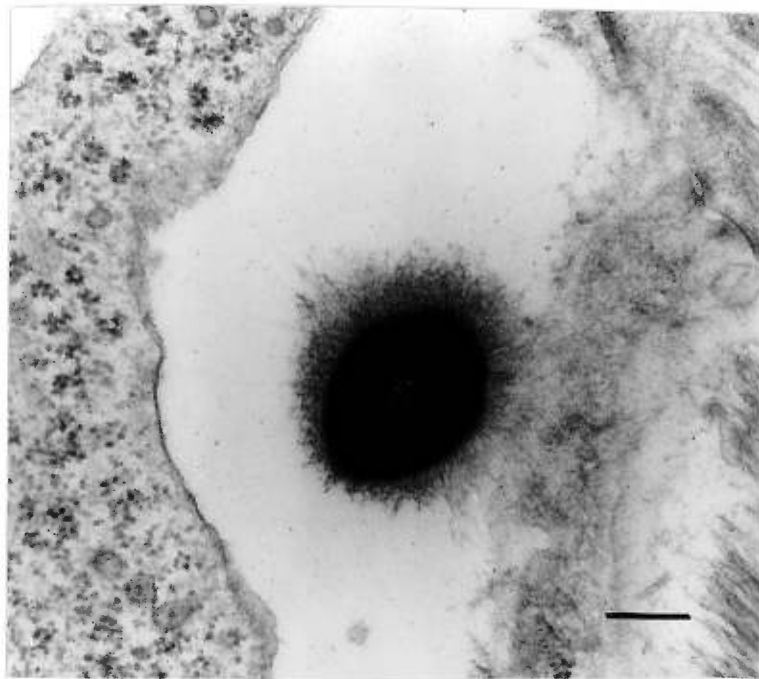
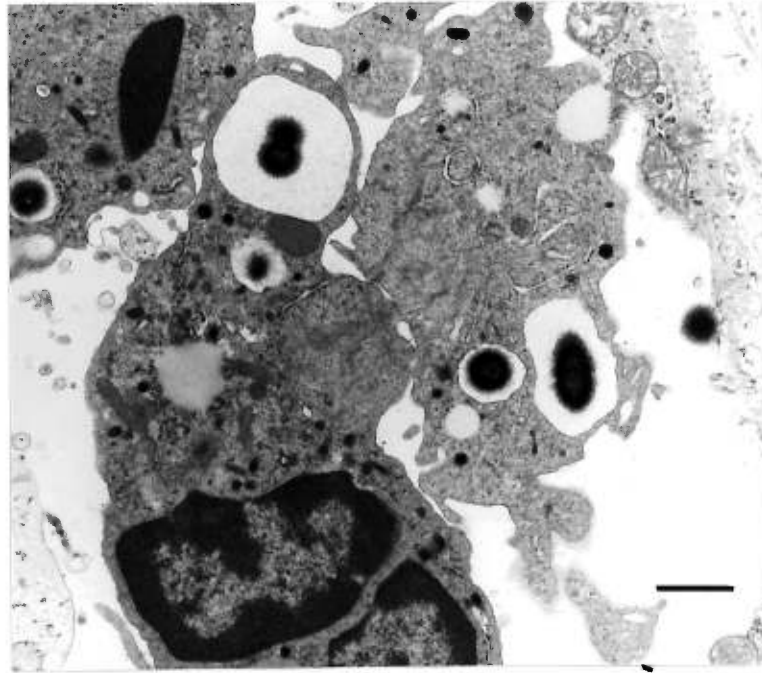
Figure 8**Figure 9**

Figure 10

Cerveau de souris infectée avec 1×10^7 UFC/mL de la souche virulente 31533 (36h p.i.). Barre: $1.4 \mu\text{m}$.

Figure 10



4.3 DOSAGE DE L'OXYDE NITRIQUE (NO):

4.3.1 E-Toxate

Aucune présence de LPS n'a été détectée au dessus du seuil de sensibilité du test (0,05-0,1 unités par vial) dans chacune des solutions utilisées.

4.3.2 Dosage

Des essais préliminaires ont été effectués afin de connaître la dose idéale de LPS à utiliser dans un puits afin d'obtenir une production maximale de NO. Les résultats de ces essais sont montrés à la Figure 11, (p. 80). Une courbe standard de NaNO_2 a été utilisée pour déterminer la concentration de NO dans chaque échantillon. Celle-ci est représentée à la Figure 12, (p. 79). Les résultats obtenus lors du dosage de l'oxyde nitrique comprennent quatre groupes:

- 1- macrophages non stimulés
- 2- macrophages stimulés avec du LPS
- 3- inhibition des oxyde nitrique synthases (NOS)
- 4- contrôle de la contamination externe d'endotoxines

Les résultats du quatrième groupe indiquent qu'il n'y a pas eu de contamination externe du LPS dans les puits, pour chacun des essais.

La production de NO par les macrophages non- stimulés par du LPS n'est pas significative comparativement au contrôle (Figure 13, p. 81). Toujours à la même figure, les résultats obtenus lorsque les macrophages sont stimulés avec le LPS indiquent que cette production n'est toujours pas significative comparativement au contrôle. De plus,

aucune différence entre les souches virulentes et non virulentes n'a été observée.

Une forte inhibition de la production de nitrite est observée lorsqu'il y a ajout de L-NMMA dans le milieu (Figure 14, p. 83). Afin que les résultats soient significatifs, l'expérience a été réalisée en présence de LPS, pour ainsi obtenir des productions de nitrite plus élevées (Figure 14, p. 83). Les pourcentages obtenus varient de 67% à 71% (Figure 15, p. 85) ce qui indique que la majorité du nitrite présent dans le surnageant est produit par les NOS. Les résultats indiquent aussi que la présence des bactéries ne déclenche pas d'autre voie de production de NO, puisque les pourcentages d'inhibition obtenus dans ces cas sont sensiblement les mêmes que pour le contrôle (macrophages avec LPS) (Figure 15, p. 85).

4.4 DOSAGE DE L'ANION SUPEROXYDE:

Les résultats obtenus montrent que lorsque l'on met en présence uniquement les macrophages et les bactéries, il n'y a pas de production d'anion superoxyde. Lorsque l'on met des macrophages, du PMA et des bactéries, il y a production mais beaucoup plus faible que le contrôle (Tableau V, p. 86), ce qui montre une inhibition de production d'anion superoxyde qui varie entre 66% et 89% (Figure 16, p. 88). Le contrôle positif étant la quantité d'anion superoxyde produit par des macrophages stimulés avec 100 ng/mL de PMA. Par contre, il faut remarquer qu'il n'y a pas de différence significative entre les souches virulentes et non virulentes ($P > 0.05$).

Figure 11

Concentration de nitrite (μM) produite par 5×10^5 macrophages péritonéaux de souris en fonction de la dose de LPS (nM), après 24 heures d'incubation   37 C en présence de 5% de CO₂. (NOTE: L'écart-type de chaque valeur est trop petit pour être visible sur la figure).

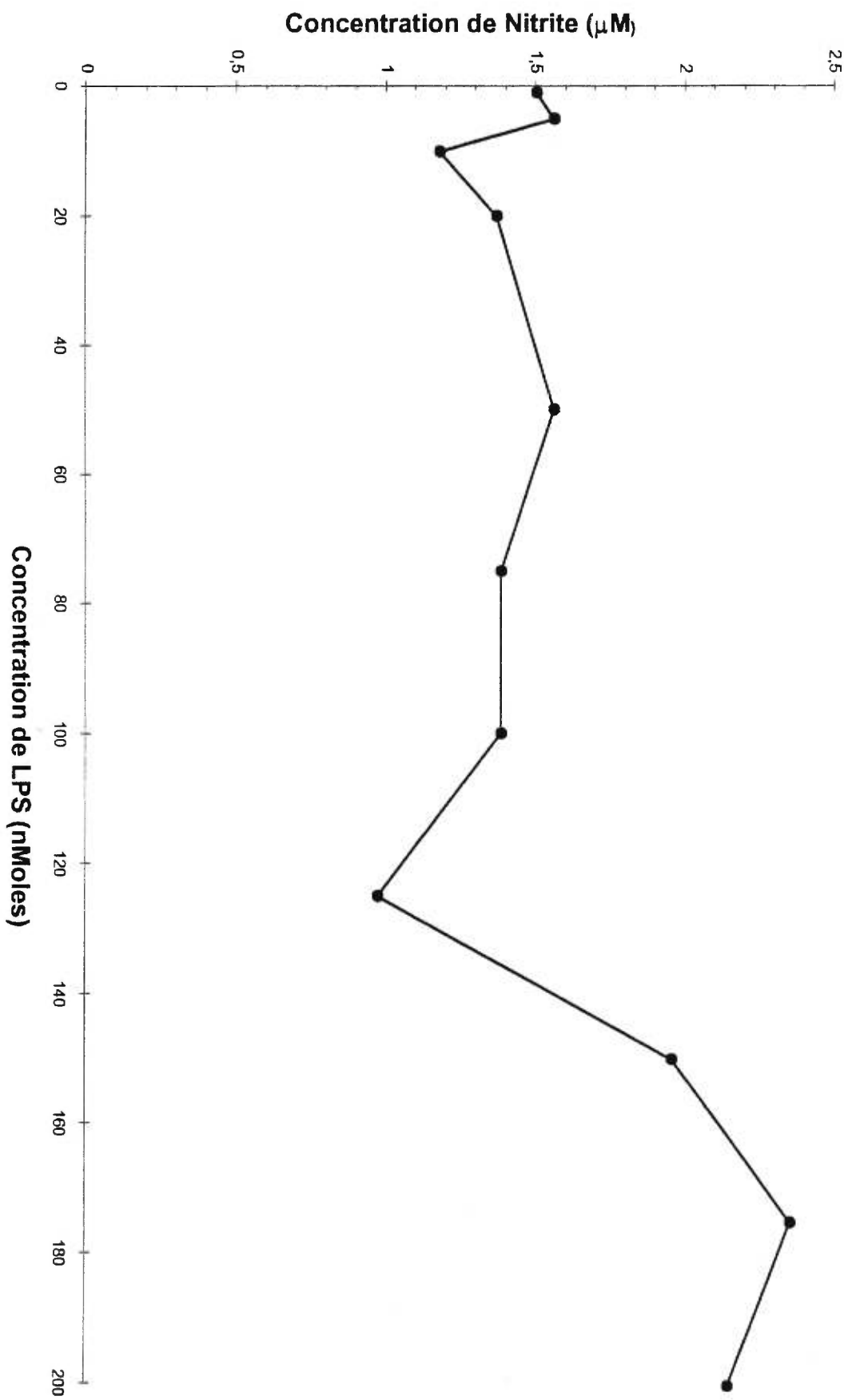


Figure 12

Courbe standard de NaNO_2 . Le graphique est exprimé en densité optique à 570 nm en fonction de la concentration de NaNO_2 (μM).

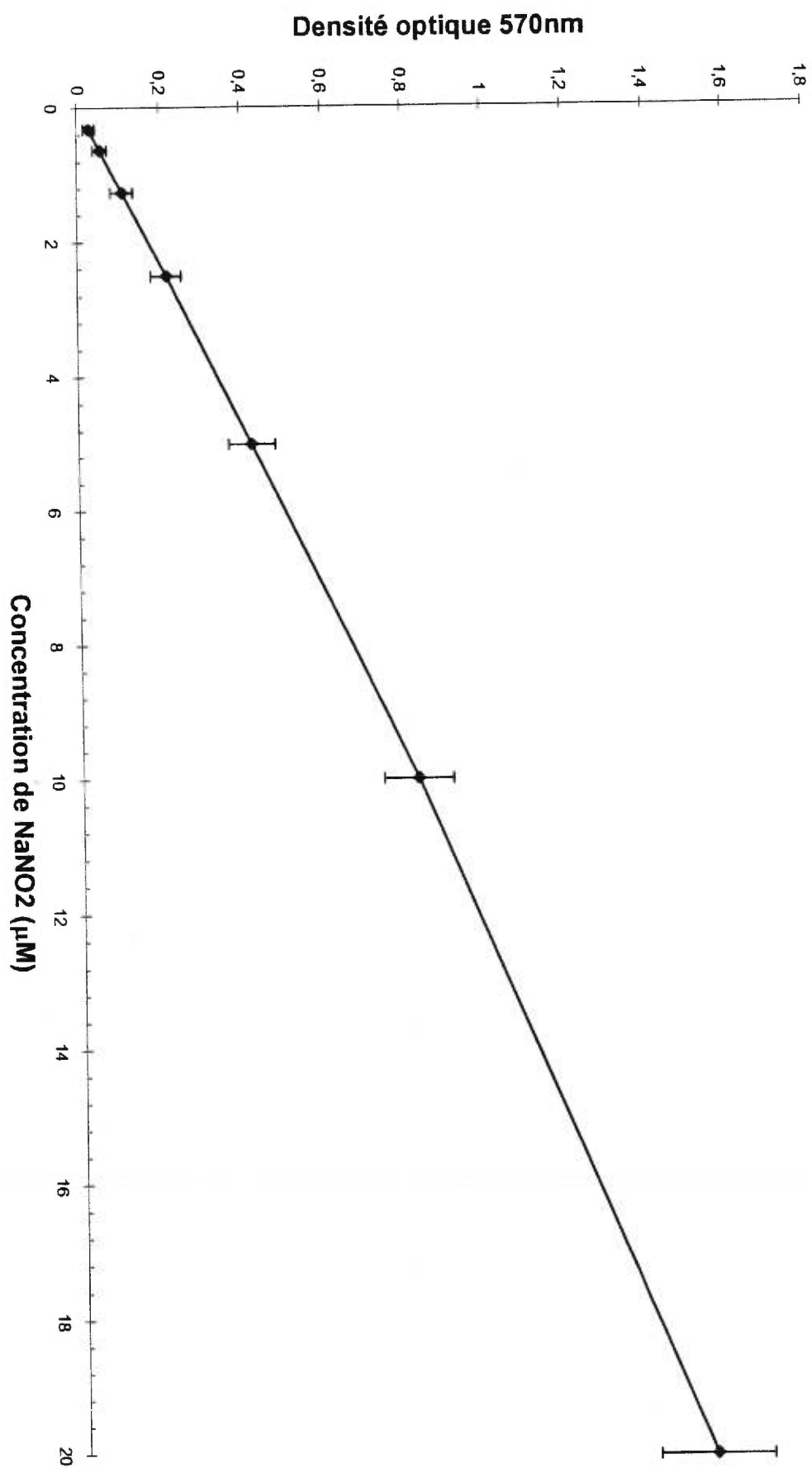


Figure 13

Quantité de nitrite (μM) produit par 5×10^5 macrophages péritonéaux de souris, stimulés pendant 24 heures à 37°C en présence de 5% de CO_2 avec quatre souches de *Streptococcus suis* sérotype 2 (5×10^6 UFC) tuées par la chaleur, en présence ou en absence de 175ng de LPS. Des macrophages avec ou sans LPS servent de contrôle.

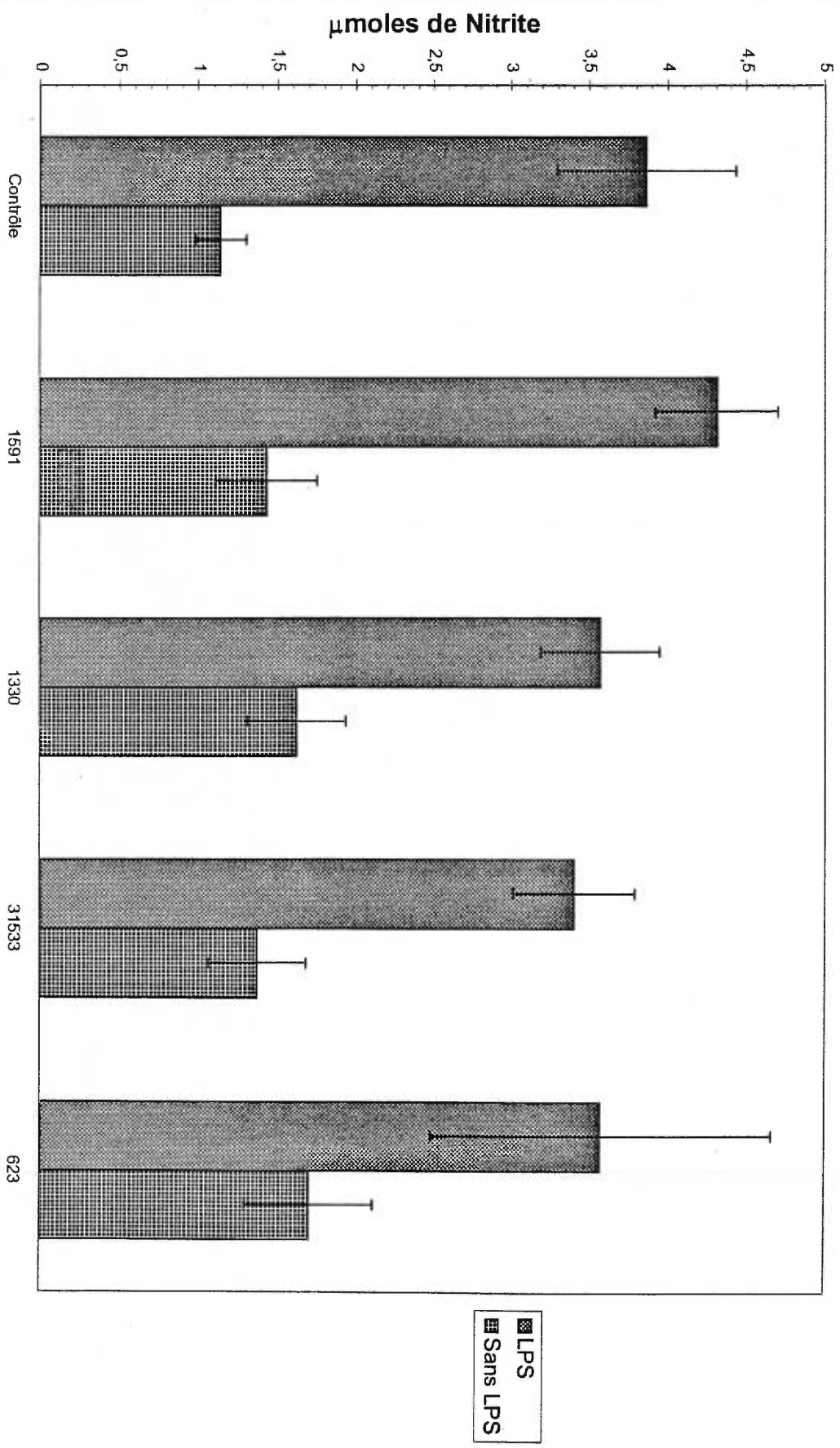


Figure 14

Quantité de nitrite (μM) produit par 5×10^5 macrophages péritonéaux de souris mis en présence de quatre souches de *Streptococcus suis* sérotype 2 (5×10^6 UFC) tuées par la chaleur, et de 175 ng de LPS avec ou sans 0.5M de L-NMMA, pendant 24 heures à 37°C en présence de 5% de CO_2 .

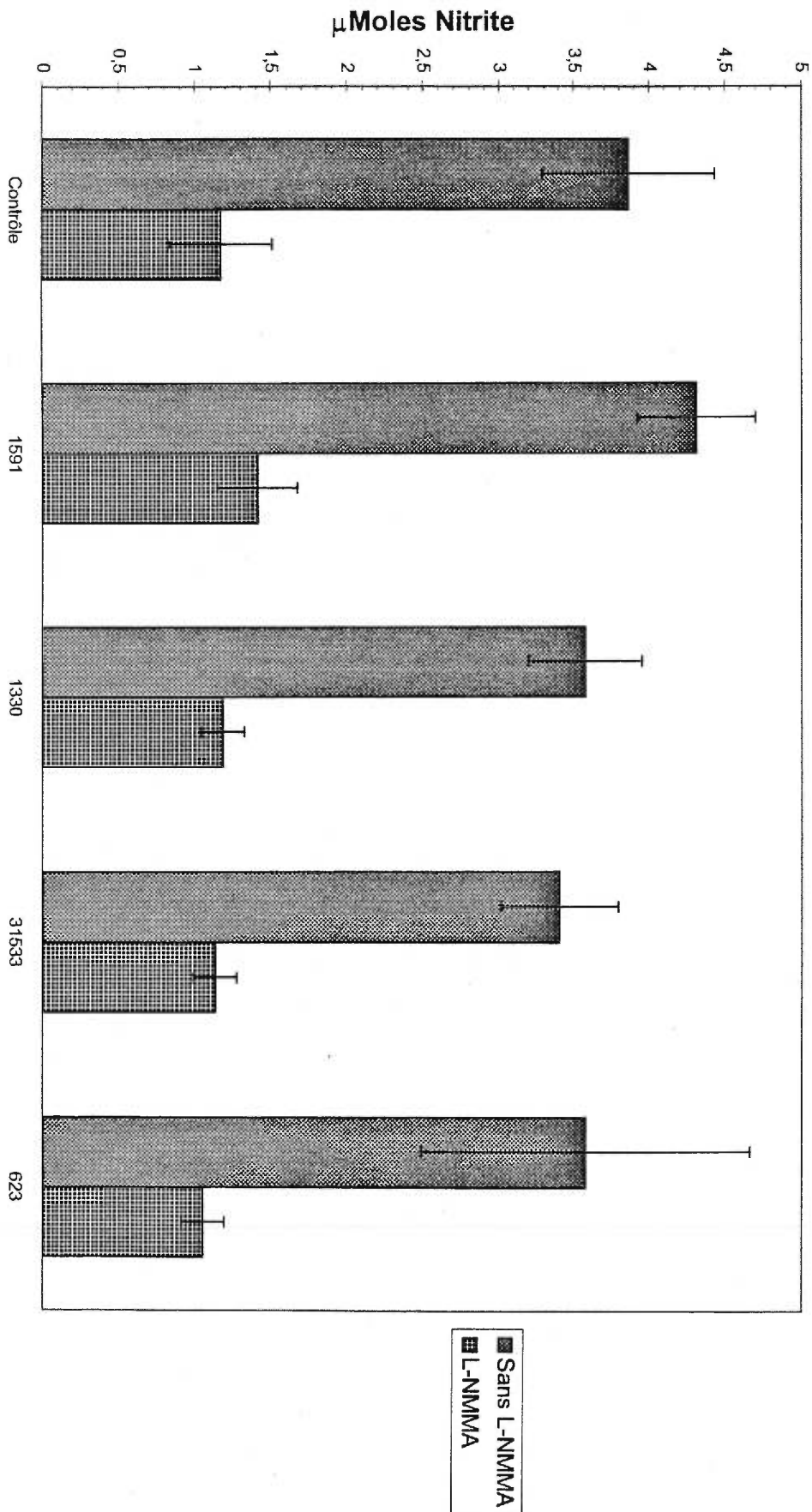


Figure 15

Pourcentage d'inhibition des oxyde nitrique synthases (NOS) pour quatre différentes souches de *Streptococcus suis* sérotype 2 tuées par la chaleur.

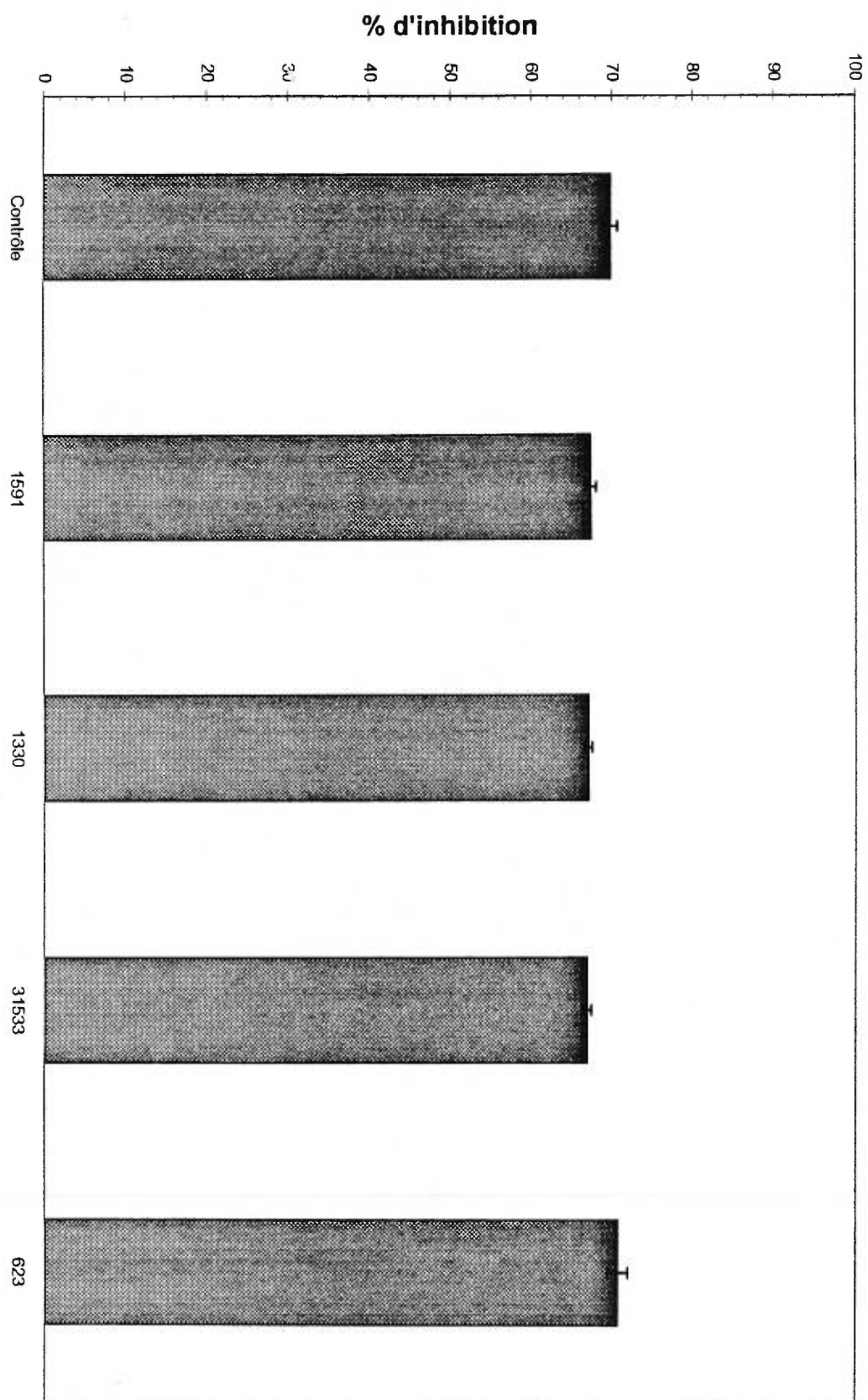


Tableau V

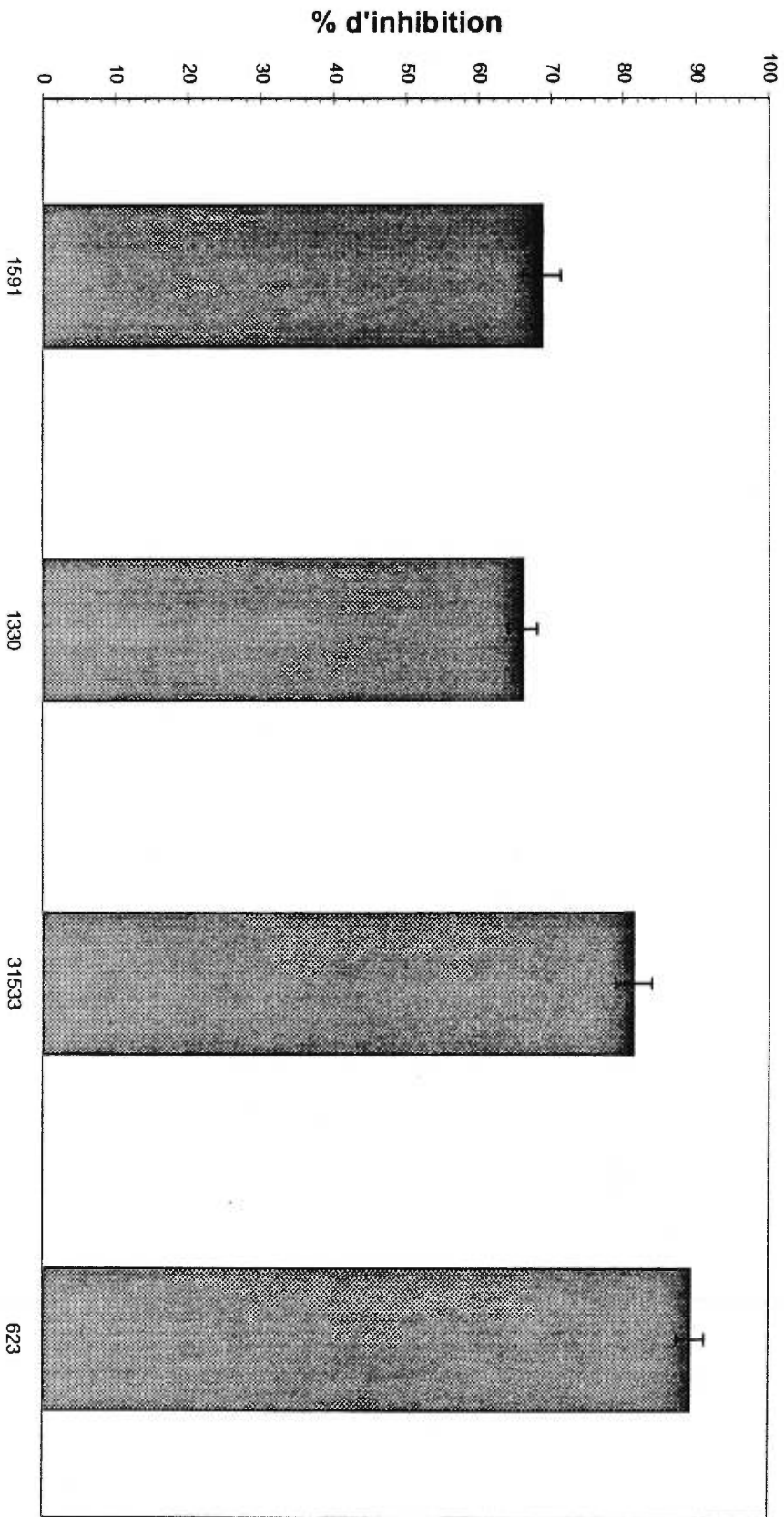
Quantité d'anion superoxyde (nM) produit par 1×10^6 macrophages péritonéaux de souris stimulés pendant 1 heure à 37°C avec quatre souches de *Streptococcus suis* sérotype 2 (1×10^7 UFC) tuées par la chaleur et 100 ng/mL de PMA (moyenne +/- l'écart-type).

Essais	nMoles +/- l'écart-type
Macrophages + PMA	5.64 +/- 1.16
31533	1.05 +/- 1.32
623	0.61 +/- 0.74
1591	1.77 +/- 1.45
1330	1.92 +/- 0.92

NOTE: La quantité d'anion superoxyde produit par des macrophages stimulés avec 100 ng/mL de PMA sert de contrôle positif.

Figure 16

Pourcentage d'inhibition de la production d'anion superoxyde lorsque les macrophages péritonéaux de souris (1×10^6) sont en présence de 100ng/mL de PMA et de quatre souches de *Streptococcus suis* sérotype 2 tuées par la chaleur (1×10^7 CFU/mL), lors d'une incubation de 1 heure à 37°C.



5-DISCUSSION

L'objectif du projet était d'étudier, globalement, certains aspects de la pathogénie de l'infection à *S. suis* en utilisant une approche *in vitro*, où deux mécanismes possibles de survie intracellulaire ont été étudiés, et une approche *in vivo*, où la localisation de la bactérie dans le cerveau ainsi que les lésions causées par celle-ci ont été observées.

Avant de débiter les expériences, une caractérisation des deux nouvelles souches a été nécessaire afin de vérifier si elles avaient des caractéristiques similaires aux autres souches du sérotype 2 déjà étudiées. Les résultats obtenus (Tableau I, p. 57) sont comparables à ceux obtenus par Williams (1990) et Brazeau et coll. (1996). Le pourcentage de phagocytose est inférieur à 10% et le complément ne semble pas influencer le pourcentage de cellules capables de phagocyter. Que ce soit avec des bactéries opsonisées ou non opsonisées, nous obtenons des pourcentages de phagocytose similaires, alors que Brazeau et coll. (1996) obtiennent des pourcentages de phagocytose plus élevés lorsque des bactéries opsonisées sont utilisées. Puisque nos expériences *in vitro* sont effectuées sans opsonisation, l'objectif de cette investigation était de savoir si dans ces conditions les souches que nous utilisons (31533 et 623) réagissent comme les souches testées par Brazeau et coll. (1996). Étant donné que les résultats obtenus prouvent que c'est bien le cas, les investigations à ce sujet n'ont pas été poussées plus à fond.

L'approche *in vivo*:

L'approche *in vivo* a été utilisée afin d'essayer d'élucider plusieurs points, dont le mécanisme utilisé par la bactérie pour entrer

dans le cerveau, la localisation de la bactérie dans celui-ci et finalement, les lésions causées par elle. Afin de répondre à ces questions, des infections expérimentales ont été réalisées chez la souris et les cerveaux ont été examinés en microscopie optique et électronique. De plus, afin de connaître la cinétique de la bactérie dans le sang, des comptes viables ont été effectués. Les résultats obtenus montrent (Figure 3, p. 65) que le nombre de bactéries dans le sang diminue graduellement. Toutefois, même après 96h p.i., le nombre reste très élevé (environ 1×10^5 UFC/mL). Il y a donc une bactériémie chez la souris, ce qui est un élément crucial dans le développement de la méningite (Williams 1990). En effet, plusieurs études démontrent que pour certaines bactéries telles que *Haemophilus influenzae* et les méningocoques (Moxon et Ostrow, 1977; Salit et Tomalty, 1986), une bactériémie prolongée de plus de 10^4 UFC/mL est nécessaire pour causer une méningite.

Observations histologiques:

Comme c'est au temps 36h p.i. que le plus grand nombre de bactéries est observé dans le cerveau, la discussion sera basée uniquement sur ces observations.

L'hypothèse proposée actuellement suggère que la bactérie entre dans le cerveau en étant à l'intérieur des monocytes (Williams 1990). Les résultats obtenus (Figure 4, p. 67) ne corroborent pas cette hypothèse, puisque la majorité des bactéries présentes dans le cerveau sont libres. Pour ce qui est de celles qui sont intracellulaires, la M.E. montre que la majorité sont à l'intérieur de PMN, plus précisément de neutrophiles.

Ce n'est qu'une très faible proportion des bactéries qui se retrouvent dans les macrophages (Figure 5, p. 67). Le fait que les bactéries se retrouvent dans ces cellules semble être un phénomène secondaire à l'infection plutôt que primaire. Toutefois, les observations faites en M.E. nous mettent sur la piste d'un autre mécanisme d'entrée possible. En effet, nous remarquons que la majorité des bactéries se trouvent à l'intérieur de vacuoles (Figure 10, p. 73). Ce phénomène est décrit par Meier et coll. (1996) et est utilisé par certaines souches de *E. coli* pour traverser par transcytose la barrière hémato-encéphalique et ainsi causer la méningite. Nos observations semblent correspondre à celles de Meier et coll. (1996) et peuvent indiquer que *S. suis* utilise peut-être ce mécanisme pour traverser la barrière hémato-encéphalique. Cependant, d'autres expériences sont absolument nécessaires avant de pouvoir émettre cette hypothèse.

Nous avons émis l'hypothèse que la bactérie entrait dans le cerveau en étant véhiculée par les vaisseaux sanguins. Cette hypothèse ne semble pas confirmée par cette étude, puisque nos observations montrent que les bactéries sont plutôt à l'extérieur des vaisseaux (Figure 6, p. 69).

Les lésions observées dans le cerveau, correspondent à celles observées par Drolet et coll. (1992). Cette étude est jusqu'à présent la seule utilisant les mêmes paramètres d'infection que nous. En effet, Kataoka et coll. (1991) utilisent des souris Balb/c et une dose beaucoup plus élevée de bactéries, variant de 1×10^8 à 7×10^8 UFC/mL. Williams et coll. (1988) utilisent des souris ICI, une dose de 1×10^8 UFC/mL de *S. suis*

et ils infectent les souris par voie intra-nasale ou intra-veineuse. Cependant, malgré ces différences, les trois études décrivent les mêmes lésions histologiques et signes cliniques, soient, une méningite suppurée, des micro-abcès dans le tissu nerveux, des signes d'atteinte nerveuse (pédalage) et des sécrétions purulentes au niveau des yeux. Les mêmes observations ont été faites lors de nos expériences et correspondent en plusieurs points à celles observées chez le porc lors d'une infection naturelle.

Bactéries:

Comme un nombre significatif de bactéries adhérant au tissu nerveux a été observé en M.E, nous pouvons penser que celles-ci possèdent la capacité d'y adhérer (Figure 9, p. 71). Bien que des expériences supplémentaires soient absolument nécessaires pour prouver hors de tout doute cette adhérence, il faut considérer le fait que des souches provenant de cas de méningite sont capables d'adhérer au tissu pulmonaire (Gottschalk et coll., 1991). Si le phénomène était prouvé pour le SNC, cela viendrait appuyer l'hypothèse de l'entrée de la bactérie par transcytose. En effet, la première propriété qu'une bactérie doit posséder pour éventuellement entrer dans le cerveau par transcytose, est d'être capable d'adhérer aux tissus nerveux (Townsend et Scheld, 1995). Deuxième point, l'examen des cerveau en M.E. montre des bactéries en division à l'intérieur des cellules (PMN). Par contre, il est impossible de savoir, seulement à partir de ces observations, si elles ont été phagocytées étant en division ou si elle se divisent à l'intérieur des cellules. Il serait intéressant de vérifier cette observation.

L'approche *in vitro*:

Deux mécanismes de survie intracellulaire ont été investigués. Il est connu que lors d'une méningite les cellules endothéliales produisent de l'oxyde nitrique. En dosant la production de NO nous voulions vérifier si *S. suis* est capable d'inhiber celle-ci et si le NO, en plus d'induire la production de TNF-alpha, possède un pouvoir bactéricide. Cette inhibition peut être un indice indirect de l'effet bactéricide du NO. Finalement, nous voulions vérifier si le NO produit par les macrophages suite à une stimulation par *S. suis*, l'était par les NOS ou par une autre voie.

Les résultats obtenus (Figure 13, p. 81) montrent que les bactéries n'ont aucun effet sur la production de NO par les macrophages que ce soit en présence ou en absence de LPS. En effet, les valeurs obtenues ne présentent pas de différences statistiques ($P > 0,05$) avec le contrôle. Donc, *S. suis* n'inhibe pas et n'induit pas la production de NO. Indirectement, cela nous laisse supposer que le NO ne joue probablement aucun rôle bactéricide lors d'infection à *S. suis*. Il a aussi été observé que la majorité du NO produit l'est par les NOS (Figure 15, p. 85) et que la présence de *S. suis* ne change rien à ce mécanisme.

Le deuxième mécanisme investigué a été le dosage de l'anion superoxyde. Le but était de vérifier si dans un premier temps, *S. suis* inhibe la production d'anion superoxyde; et deuxièmement s'il y a inhibition, de vérifier si ce processus est impliqué dans la survie intracellulaire.

D'après nos hypothèses, nous nous attendions à ce que les souches virulentes inhibent plus fortement la production d'anion superoxyde que les souches non virulentes. Ces dernières survivent en moins grand nombre à l'intérieur des macrophages comparativement aux souches virulentes (Tableau II, p. 58). Notre hypothèse est renforcée par le fait que les souches virulentes et non virulentes possèdent une superoxyde dismutase (SOD) (Langford et coll., 1991). Donc, la différence entre les souches virulentes et non virulentes se situe soit à la première étape (formation de l'anion superoxide), soit à la dernière étape de la production des espèces réactives de l'oxygène (transformation du peroxyde d'hydrogène). Les résultats obtenus (Tableaux V, p. 86 et Figure 16, p. 88) montrent que les quatres souches inhibent la production d'anion superoxyde. L'hypothèse de départ étant fausse, il faut donc s'orienter vers d'autres hypothèses. Le fait que les souches virulentes et non virulentes soient phagocytées et non détruites laisse supposer qu'elles inhibent la majorité de l'anion superoxyde produit et que la SOD transforme la quantité restante en H_2O_2 . C'est donc à la dernière étape de transformation, soit la dégradation du H_2O_2 en H_2O et en O_2 , qu'un évènement différent chez la souche virulente doit se produire. Il est connu qu'aucune des souches virulentes et non virulentes ne possède de catalase.

La présente étude a permis de connaître un peu mieux la pathogénèse de *S. suis*. Par contre, beaucoup reste à faire comme élucider avec certitude le mécanisme d'entrée de la bactérie dans le cerveau, vérifier s'il y a effectivement adhérence des souches au tissu nerveux, vérifier si les bactéries sont capables de se diviser à l'intérieur de cellules et mesurer la production de peroxyde d'hydrogène.

6- CONCLUSIONS

Suite à ce projet, on ne sait toujours pas avec certitude comment *S. suis* pénètre dans le cerveau, mais les résultats obtenus semblent contredire l'hypothèse de l'entrée via les monocytes. D'autres études sont nécessaires avant de poser une autre hypothèse, mais nos résultats semblent orienter les recherches futures vers une entrée par transcytose.

Les lésions observées avec le modèle murin, correspondent en plusieurs points à celles chez le porc, ce qui confirme une fois de plus que le modèle murin est un bon modèle pour étudier l'infection à *S. suis*.

Les résultats obtenus avec les comptes viables à partir du sang montrent qu'il y a une bactériémie prolongée.

Pour ce qui est du dosage de l'oxyde nitrique, les résultats indiquent que *S. suis* n'induit pas et n'inhibe pas sa production et que l'oxyde nitrique ne joue probablement aucun rôle bactéricide lors d'infection à *S. suis*.

Même en présence de *S. suis*, les macrophages produisent de l'oxyde nitrique grâce au NOS.

Pour ce qui est du dosage de l'anion superoxyde, il a été démontré que les souches virulentes et non virulentes inhibent cette production.

En conclusion, nous pouvons affirmer qu'avec les résultats obtenus, nos objectifs de départ, qui étaient d'étudier *in vivo* un mécanisme d'entrée possible de la bactérie dans le cerveau, ainsi que sa cinétique dans le sang et *in vitro*, deux mécanismes possibles de survie intracellulaire, ont été atteints.

7- BIBLIOGRAPHIE

Adams, L.B., Hibbs, J.B., Taintor, R.R. et Krahenbuhl, J.S. 1990. Microbiostatic effect of murine activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxide from L-arginine. *J. Immunol.* **144**: 2725-2729.

Akarid, K., Sinet, M., Desforages, B. et Gougerot-Pocidalò. 1995. Inhibitory effect of nitric oxide on the replication of a murine retrovirus *in vitro* and *in vivo*. *J. Microbiol.* **69**: 7001-7005.

Alexander, T. 1995. *Streptococcus suis* : pathogenesis and host response. Allen D.Leman Swine conference. pp 49-53.

Andrese, A.P. et Wisseman, C.L. 1971. *In vitro* interaction between human peripheral macrophages and *Rickettsia mooseri*, p.29. In C.J. Arceneaux (ed.), Electron Microscopy Society of America, Boston, Mass. Annual Proceeding of the Electron Microscopy Society of America, Vol.29.

Beaman, B.L. 1977. *In vitro* response of rabbit alveolar macrophage to infection with *Nocardia asteroides*. *Infect. Immun.* **15**: 925-937.

Beaman, B.L. 1981. In Actinomycetes, K. Schaal, G. Pulverer (ed.), pp. 209-220. Stuttgart: Gustav Fischer.

Beaman, L. et Beaman, B.L. 1984. The role of oxygen and its derivatives in microbial pathogenesis and host defense. *Ann. Rev. Microbiol.* **38**: 27-48.

Beaudoin, M., Higgins, R., Harel, J. et Gottschalk, M. 1992. Studies on a murine model for evaluation of virulence of *Streptococcus suis* capsular type 2 isolates. *FEMS Microbiol. Lett.* **99**:111-116.

Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A. et Freeman, B.A. 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implication for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 1620-1624.

Beckerman, K.P., Rogers, H.W., Corbett, J.A., Schreiber, R.D., McDaniel, M.L. et Unanue, E.R. 1993. Release of nitric oxide during the T cell-independent pathway of macrophage activation. *J. Immunol.* **150**: 888-893.

Bentley, R.W., Leigh, J.A. et Collins, M.D. 1991. Intrageneric structure of *Streptococcus suis* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **41**: 487-494.

Billiar, T.R., Hoffman, R.A., Curran, J.M. et Simmons, R.L. 1992. A role for inducible nitric oxide biosynthesis in the liver in inflammation and in the allogenic immune response. *J. Lab. Clin. Med.* **120**: 192-197.

Bogdan, C. et Nathan, C. 1993. Modulation of macrophages function by transforming growth factor b interleukin-4 and interleukin-10. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **685**: 713-739.

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

Bredt, D.S., Hwang, P.M., Glatt, C.E., Lowenstein, C., Reed, R.R. et Snyder, S.H. 1991. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*. **351**: 714-718.

Brieland, J.K., Remick, D.G., Freeman, P.T., Hurley, M.C., Fantone, J.C. et Engleberg, N.C. 1995. *In vivo* regulation of replicative *Legionella pneumophila* lung infection by endogenous tumor necrosis factor alpha and nitric oxide. *Infect Immun.* **63**: 3253-3258.

Cameron, M.L., Granger, D.L., Weinberg, J.B, Kozumbo, W.J. et Koren, H.S. 1990. Human alveolar and peritoneal macrophages mediate fungistasis independently of L-arginine oxidation to nitrite or nitrate. *Am. Rev. Respir. Dis.* **142**: 1313-1319.

Chanter, N., Jones, P.W. et Alexander, T.J.L. 1993. Meningitis in pigs caused by *Streptococcus suis*- a speculative review. *Vet. Microbiol.* **36**: 39-55.

Charland, N., Kobisch, M., Martineau-Doizé, B., Jacques, M. et 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.

Clifton-Hadley, F.A., et Alexander, T.J.L. 1981. Studies of *Streptococcus suis* type 2 infection. Pig Vet. Soc. Proc. **8**: 14-19.

Clifton-Hadley, F.A. 1982. Studies of *Streptococcus suis* type 2 infection in pigs. PhD thesis, University of Cambridge.

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

Clifton-Hadley, F.A. et Alexander, T.J.L. 1988. Update, diagnosis of *Streptococcus suis* infection in pigs. In Pract., J. Vet. Post. Clin. Study. **10**: 9-12.

Corradin, S.B., Buchmuller-Rouiller, Y. et Manuel, J. 1991. Phagocytosis enhances murine macrophage activation by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. Eur. J. Immunol. **21**: 2553-2558.

Czuprynski, C.J. et Hamilton, H.L. 1985. Bovine neutrophils ingest but do not kill *Haemophilus somnus* *in vitro*. Infect Immun. **50**:431-436.

de Moor, C.E. 1963. Septicemic infection in pig caused by haemolytic streptococci of new Lancefield group designed R, S and T. *Antonie Van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.* **29**: 272-280.

Denis, M. 1991. Tumor necrosis factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor stimulate human macrophages to restrict growth of virulent *Mycobacterium avium* and to kill avirulent *M. avium*: killing effector mechanism depends on the generation of reactive nitrogen intermediates. *J. Leukoc. Biol.* **49**: 380-387.

Denis, M. et Ghadirian, E. 1992. Activated mouse macrophages kill *Entamoeba histolytica* trophozoites by release reactive nitrogen intermediates. *Microb. Pathog.* **12**: 193-198.

Didier, E.S., Varner, P.W., Didier, P.J., Aldras, A.M. et coll. 1994. Experimental microsporidiosis in immunocompetent and immunodeficient mice and monkeys. *Folia Parasitol.* **41**: 1-11.

Ding, A., Nathan, C.F. et Stuehr, D.J. 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* **141**: 2407-2412.

Doyle, L.P. 1929. Meningo-encephalomyelitis of swine. *J. Am. Vet. Med. Ass.* **28**: 342-346.

Drapier, J.C. et Hibbs, J.B. 1986. Murine cytotoxic activated macrophages inhibit aconitase in tumor cells: inhibition involves the iron-sulfur prosthetic group and is reversible. *J. Clin. Invest.* **78**: 790-797.

Drath, D.B. et Karnovsky, M.I. 1975. Superoxide production by phagocytic leukocytes. *J. Exp. Med.* **141**: 257-262.

Drolet, R., Beaudoin, M. et Higgins, R. 1992. Pathological finding in mice experimentally infected with *Streptococcus suis* capsular type 2. *Proc. Int. Pig. Vet. Soc.* p.338.

Elliott, S.D., McCarty, M. et Lancefield, R.C. 1977. Teichoic acids of group D streptococci with special reference to strains from pig meningitis (*Streptococcus suis*). *J. Exp. Med.* **145**: 490-499.

Elliott, S.D. et Tai, J.Y. 1978. The type specific polysaccharides of *Streptococcus suis*. *J. Exp. Med.* **148**: 1699-1704.

Feder, I., Chengappa, M.M., Fenwick, B., Rider, M. et Staats, J. 1994. Partial characterization of *Streptococcus suis* type 2 hemolysin. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 1256-1260.

Fischerstenger, K. et Marciano-Cabral, F. 1992. The arginine-dependent cytolytic mechanism plays a role in destruction of *Naegleria fowleri* amoebae by activated macrophages. *Infect. Immun.* **60**: 5126-5131.

Freyer, D., Weith, M., Weber, J.R., Bürger, W., Scholz, P., Manz, R., Ziegenhorn, A., Angestwurm, K. et Dirnagl, U. 1996. Pneumococcal cell wall components induce nitric oxide synthase and TNF- α in astroglial-enriched cultures. *Glia*. **16**:1-6.

Friedland, J.S. 1993. Cytokines, phagocytosis and *M. tuberculosis* [Review]. *Lymphokine and Cytokine Research*. **12**: 127-133.

Gaspéri et Grippi. 1912. Cité par Field, H.I., Bontain, D., Done, J.T. 1954. Studies on piglet mortality streptococcal meningitis and arthritis. *Vet. Rec.* **66**: 453-455.

Gazzinelli, R.T., Oswald, I.P., Hieny, S., James, S.L. et Sher, A. 1992. The microbicidal activity of interferon- γ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- β . *Eur. J. Immunol.* **22**: 2501-2506.

Gibaldi, M. 1993. What is nitric oxide and why are so many people studying it? *J. Clin. Pharmacol.* **33**: 488-496.

Gibson, R.L., Berger, J.I., Redding, G.J., Standaert, T.A., Mayock, D.E. et Truog, W.E. 1994. Effect of nitric oxide synthase inhibition during group B streptococcal sepsis in neonatal piglets. *Pediatr. Res.* **36**: 776-783.

Glimaker, M., Kragstjerg, P., Forsgren, M. et Olcen, P. 1993. Tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) in cerebrospinal fluid from patients with meningitis of different etiologies: high levels of TNF alpha indicate bacterial meningitis. *J. Infect. Dis.* **167**: 882-889.

Goodrum, K.J., McCormick, L.L. et Schneider, B. 1994. Group B streptococcus-induced nitric oxide production in murine macrophages is CR3 (CD11b/CD18) dependent. *Infect. Immun.* **62**:3102-3107.

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

Gottschalk, M., Lebrun, A., Jacques, M. et Higgins, R. 1990. Hemagglutination properties of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 2156-2158.

Gottschalk, M., Petitbois, S., Higgins, R. et Jacques, M. 1991. Adherence of *Streptococcus suis* capsular type 2 to porcine lung sections. *Can. J. Vet. Res.* **55**: 302-304.

Gottschalk, M., Higgins, R. et Jacques, M. 1993. Production of capsular material by *Streptococcus suis* serotype 2 under different growth conditions. *Can. J. Vet. Res.* **57**: 49-52.

Gottschalk, M., Lacouture, S. et Dubreuil, J.D. 1995. Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin. *Microbiology*. **141**: 1-7.

Granger, D.L. et Lehninger, A.L. 1982. Sites of inhibition of mitochondrial electron transport in macrophage-injured neoplastic cells. *J. Cell Biol.* **95**: 527-535.

Griscavage, J.M., Rogers, N.E., Sherman, M.P. et Ignarro, L.J. 1993. Inducible nitric oxide synthase from a rat alveolar macrophage cell line is inhibited by nitric oxide. *J. Immunol.* **151**: 6329-6337.

Haataja, S., Tikkanen, K., Nilsson, U., Magnusson, G. et Karlsson, K-A. 1994. Oligosaccharide-receptor interaction of the Gal-alpha-1-4Gal binding adhesin of *Streptococcus suis*- combining site architecture and characterization of two variant adhesin specificities. *J. Biol. Chem.* **269**: 27466-27472.

Habert, R.L., Anneser, F., Kobel, U. et Pfister, H.W. 1994. Is nitric oxide involved as a mediator of cerebrovascular changes in the early phase of experimental pneumococcal meningitis? *Neuro. Res.* **16**: 108-112.

Heinzel, F.P., Sadick, M.D., Holaday, B.J., Dawkins, R.S., Pu, R.T. et Locksley, R.M. 1990. Cytokine production and function during murine leishmaniasis, p.411-425. In A. Cerami and N. Agabian (ed.), *Parasites: molecular biology, drug and vaccine design*. Wiley-Liss. INC. New York.

Hibbs, J.B., Taintor, R.R., Vavrin, Z. et Rachlin, E.M. 1988. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**: 87-94.

Hietala, S.K. et Ardans, A.A. 1987. Interaction of *Rhodococcus equi* with phagocytic cells from *Rhodococcus equi* exposed and non-exposed foals. *Vet. Microbiol.* **14**: 307-320.

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

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

Hocking, W.G. et Golde, D.W. 1979. The pulmonary-alveolar macrophage. *N. Eng. J. Med.* **301**: 580-587.

Hommez, J., Devriese, L.A., Henrichsen, J. et Castryck, F. 1986. Identification and characterization of *Streptococcus suis*. *Vet. Microbiol.* **11**: 349-355.

Horwitz, M.A. 1983. The Legionares disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J. Exp. Med.* **158**: 2108-2126.

Hunt, N.C.A. et Goldin, R.D. 1992. Nitric oxide production by monocytes in alcoholic liver disease. *J. Hepatol.* **14**: 146-150.

Iyer, G.Y.N. 1961. *Nature* **192**: 535-541.

Iyengar, R., Stuehr, D.J. et Marketta, M.A. 1987. Macrophage synthesis of nitrite oxide, nitrate and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 6369-6373.

Jackett, P.S., Aber, V.R. et Lowrie, O.B. 1978. Virulence and resistance to superoxide, low pH and hydrogen peroxide among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Gen. Microbiol.* **104**: 37-45.

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

Jacques, M., Gottschalk, M., Foiry, B. et Higgins, R. 1990. Ultrastructural study of surface components of *Streptococcus suis*. *J. Bacteriol.* **172**: 2833-1838.

Janssens, S.P., Shimouchi, A., Quertermous, T., Bloch, D.B. et Block, K.D. 1992. Cloning and expression of cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **267**: 14519-14522.

Johnston, R.B., Lehmeyer, J.E. et Guthrie, L.A. 1976. Generation of superoxide anion and chemiluminescence by human monocytes during phagocytosis and on contact with surface-bound immunoglobulin G. *J. Exp. Med.* **143**: 1551-1556.

Johnston, R.B., Godzik, G.A. et Cohn, Z.A. 1978. Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages. *J. Exp. Med.* **148**: 115-127.

Johnston, R.B. 1984. Measurement of O_2^- secreted by monocytes and macrophages. p365-369. In S.P. Colowick and N.O. Kaplan (ed.). *Methods in Enzymology*, Vol 105. Academic Press Inc. San Diego.

Jones, D. 1986. Genus *Erysipelothrix* Rosenbach 1909, 367, p.1245-1249. In P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore.

Kaplan, S.S., Billiar, T.R., Curran, R.D., Zdziarski, U.E., Simmons, R.L. et Basford, R.E. 1989. Inhibition of neutrophil chemotaxis with N^G -monomethyl-L-arginine: a role for cyclic GMP. *Blood.* **74**: 1885-1887.

Kataoka, Y., Haritani, M., Mori, M., Kishima, M., Sugimoto, C., Nakazawa, M. et Yamamoto, K. 1991. Experimental infections of mice and pigs with *Streptococcus suis* type 2. *J. Vet. Med. Sci.* **53**: 1043-1049.

Kay, R.L.C. 1985. Hearing loss in *S.reptococcus suis* meningitis. M.D. dissertation. Univ. Cambridge.

Kazatchkine, M.D., Fearon, D.T. et Austen, K.F. 1979. Human alternative complement pathway: membrane-associated sialic acid regulates the competition between B and beta 1 H for cell-bound C3b. *J. Immunol.* **122**: 75-81.

Kilpper-Balz, R. et Schleifer, K.H. 1987. *Streptococcus suis* sp. nov., nom. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **37**: 160-162.

Klebanoff, S.J. 1967. Iodination of bacteria: a bactericidal mechanism. *J. Exp. Med.* **126**: 1063-1078.

Klebanoff, S.J. 1980. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann. Int. Med.* **93**: 480-489.

Kobisch, M., Gottschalk, M., Morvan, P., Cariolet, R., Bénévent, G. et Joly, J.P. 1995. Infection expérimentale de porcelets par *Streptococcus suis*, sérovar 2. *Journées rech. porcine en France.* **27**: 97-102.

Koshland, D.E. Jr. 1992. The molecule of the year. *Science.* **258**: 1861.

Kossack, R.E., Guerrant, R.L., Densen, P., Schaedelin, J. et Mandell, G.L. 1981. Diminished neutrophil oxidative metabolism after phagocytosis of virulent *Salmonella typhi*. *Infec. Immun.* **31**: 674-678.

Kremsner, P., Nussler, A.K., Neifer, S., Bienzle, U. et Grau, G.E. 1993. Malaria antigen and cytokin-induced production of reactive nitrogen intermediates by murine macrophages: no relevance to the development of experimental cerebral malaria. *Immunology*. **78**: 286-290.

Kreutzer, D.L., Dreyfus, L.A. et Robertson, D.C. 1979. Interaction of polymorphonuclear leukocytes with smooth and rough strains of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* **23**: 737-742.

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

Kusunoso, E., Ichihara, K., Noda, Y. et Kusunose, M. 1976. Superoxide dismutase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biochem.* **80**: 1343-1352.

Kwon, N.S., Stuehr, D.J. et Nathan, C.F. 1991. Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. *J. Exp. Med.* **174**: 761-767.

Lachman, P.G. et Deicher, H. 1986. Solubilization and characterization of surface antigenic components of *Erysipelothrix rhusiopathiae* T28. *Infect. Immun.* **52**: 818-822.

Lancaster, J.R. et Hibbs, J.B. 1990. EPR demonstration of iron-nitrosyl complex formation by cytotoxic activated macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87**: 1223-1227.

Langford, P., Williams, A.E. et Kroll, J.S. 1991. Superoxide dismutases of pathogenic and non-pathogenic *Streptococcus suis* type 2 isolates. FEMS Microbiol. Lett. **77**: 347-350.

Leist, T.P., Frei, K., Kam-Hansen, S., Zinkernagel, R.M. et Fontana, A. 1988. Tumor necrosis factor alpha in cerebrospinal fluid during bacterial, but not viral, meningitis. Evaluation in murine model infections and in patients. J. Exp. Med. **167**: 1743-1748.

Leitch, G.J. et He, Q. 1994. Arginine-derived nitric oxide reduces fecal oocyst shedding in nude mice infected with *Cryptosporidium parvum*. Infect. Immun. **62**: 5173-5176.

Liukkonen, J., Haataja, S., Tikkanen, S., Kelm, S. et Finne, J. 1992. Identification of N-Acetylneuraminyl alpha2-3 poly-N-acetyllactosamine glycans as the receptors of sialic acid-binding *Streptococcus suis* strains. J. Biol. Chem. **267**: 21105-21111.

Lorsbach, R.B., Murphy, W.J., Lowenstein, C.J., Snyder, S.H. et Russell, S.W. 1993. Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. J. Biol. Chem. **268**: 1908-1913.

Lowenstein, C.J., Alley, E.W., Raval, P., Snowman, A.M., Snyder, S.H., Russell, S.W. et Murphy, W.J. 1993. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 9730-9734.

Lowenstein, C.J. 1995. Nitric oxide synthase: production of a radical messenger. *Catalogue de Transduction Laboratories*. **1**: 8-9.

Madonna, G.S. et Allen, R.C. 1981. *Shigella sonnei* phase I and phase II: susceptibility to direct serum lysis and opsonic requirement necessary for stimulation of leukocyte redox metabolism and killing. *Infect. Immun.* **32**: 153-159.

Malawista, S.E., Montgomery, R.R. et Van Blaricom, G. 1992. Evidence for reactive nitrogen intermediates in killing of staphylococci by human neutrophil cytoplasm. *J. Clin. Invest.* **90**: 631-636.

Mandell, G.L. 1975. Catalase, superoxide dismutase and virulence of *Staphylococcus aureus*. *In vitro* and *in vivo* studies with emphasis on staphylococcal-leukocyte interaction. *J. Clin. Invest.* **55**: 561-566.

Marletta, M.A., Poxsyn, S.Y., Iyengar, R., Leaf, C.D. et Wishnok, J.S. 1988. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry*. **27**: 8706-8711.

Marsden, P.A., Schappert, K.T., Chen, H.S., Flowers, M., Sundell, C.L., Wilcox, J.N., Lama, S.S. et Michel, T. 1992. Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *EBS Lett.* **307**: 287-293.

Mayer, B., John, M., Heinzl, B., Werner, E.R., Schultz, G. et Bohme, E. 1991. Brain nitric oxide synthase is a biopterin-and flavin-containing multi-functional oxido-reductase. *FEBS Lett.* **288**: 187-191.

McRipley, R.J. et Sbarra, A.J. 1967. Role of the phagocyte in host-parasite interaction. Relationship between stimulation oxidative metabolism and hydrogen peroxide formation, and intracellular killing. *J.Bacteriol.* **94**: 1417-1424.

Meier, C., Oelschlaeger, T.A., Merkert, H., Korhonen, T.K. et Hacker, J. 1996. Ability of *Escherichia coli* isolates that cause meningitis in newborns to invade epithelial and endothelial cells. *Infect. Immun.* **64**: 2391-2399.

Mellion, B.T., Ignarro, L.J., Ohlstein, E.H., Pontecarvo, E.G., Hyman, A.L. et Kadowitz, P.J. 1981. Evidence for the inhibitory role of guanosine 3:5-monophosphate in ADP induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood* **57**: 946-955.

Milder, R. et Kloetzel, J. 1980. The development of *Trypanosoma cruzi* in macrophages *in vitro*. Interactions with lysosome and host cell fate. *Parasitology*. **80**: 139-145.

Mitchell, H.H., Shonle, H.A. et Grindley, H.S. 1916. The origin of nitrate in the urine. *J. Biol. Chem.* **24**: 461.

Motard, A., Landau, I., Nussler, A., Grau, G., Baccam, D., Mazier, D. et Targett, G.A.T. 1993. The role of reactive nitrogen intermediates in modulation of gametocyte infectivity of rodent malaria parasites. *Parasite Immunol.* **15**: 21-26.

Moxon, E.R. et Ostrow, P.T. 1977. *Haemophilus influenzae* meningitis in infant rats: role of bacteremia in pathogenesis of age-dependent inflammatory responses in cerebrospinal fluid. *J. Infec. Dis.* **135**: 303-307.

Munoz-Fernandez, M.A., Fernandez, M.A. et Fresno, M. 1992. Synergism between tumor necrosis factor- α and interferon- γ on macrophage activation for the killing of *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. *Eur. J. Immunol.* **22**: 301-307.

Nathan, C.F. et Root, R.K. 1977. Hydrogen peroxide release from mouse peritoneal macrophage: dependence on sequential activation and triggering. *J. Exp. Med.* **146**: 1648-1662.

Nathan, C.F., Murray, H.W., Wiebe, M.E. et Rubin, B.Y. 1983. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J. Exp. Med.* **158**: 670-689.

Nogueira, N. et Cohn, Z. 1976. *Trypanosoma cruzi* : mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. *J. Exp. Med.* **143**: 1402-1420.

Nussler, A.K. et Billiar, T.R. 1993. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J. Leuko. Biol.* **54**: 171-178.

Pou, S., Pou, W., Bredt, D.S., Snyder, S.H. et Rosen, G.M. 1992. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **267**: 24173-24176.

Quagliarello, V. et Scheld, W.M. 1992. Bacterial meningitis: pathogenesis, pathophysiology, and progress. *N. Engl. J. Med.* **327**: 864-872.

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

Radomski, M.W., Palmer, R.M.J. et Moncada, S. 1987. Endogenous nitric oxide inhibits human platelets adhesion to vascular endothelium. *Lancet* **ii**: 1057-1058.

Reams, R.Y., Glickman, L.T., Harrington, D.D., Thacker, H.L. et Bowersock, T.I. 1994. *Streptococcus suis* infection in swine: a retrospective study of 256 cases. Part II. Clinical signs, gross and microscopic lesion, and coexisting microorganisms. J. Vet. Diagn. Invest. 6: 326-334.

Ridd, J.H. 1978 . Adv. Phys. org. Chem. 16: 1

Rudinsky, B., Bell, A., Randle, C., Lozon, M., Hipps, B. et Meadow, W. 1993. L-Arginine (L-arg) ameliorates pulmonary and systemic hemodynamic deterioration during group B streptococcal (GBS) sepsis in piglets. Pediatr. Res. 33: 40A.

Sakurai, S., Kamachi, K., Konda, T., Miyajima, N., Kohase, M. et Yamamoto, S. 1996. Nitric oxide induction by pertussis toxin in mouse spleen cells via gamma interferon. Infect. Immun. 64: 1309-1313.

Salit, I.E. et Tomalty, L. 1986. Experimental meningococcal infection in mice: a model for mucosal invasion. Infect. Immun. 51: 648-652.

Sanford, S.E. et Tilker, A.M.E. 1982. *Streptococcus suis* type 2 association diseases in swine: observations of one year study. J. Am. Vet. Med. Assoc. 181: 673-676.

Saukkonen, K., Sande, S., Cioffe, C., Wolpe, S., Sherry, B., Cerami, A. et Tuomanen, E. 1990. The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental Gram positive meningitis. *J. Exp. Med.* **17**: 439-448.

Schneeman, M., Schoedon, G., Hofer, S., Blau, N., Guerrero, L. et Schaffer, A. 1993a. The controversy over nitric oxide. *J. Infect. Dis.* **167**: 1358-1363.

Schneemann, M., Schoedon, G., Hofer, S., Blau, N., Guerrero, L. et Schaffner, A. 1993b. Nitric oxide synthase is not a constituent of the antimicrobial armature of human mononuclear phagocytes. *J. Infect. Dis.* **167**: 1358-1363.

Selvaraj, R.J., Paul, B.B, Strauss, R.R., Jacobs, A.A et Sbarra, A.J. 1974. Oxidative peptide cleavage and decarboxylation by the MPO-H₂O₂-Cl-antimicrobial system. *Infect. Immun.* **23**: 522-531.

Sher, A. et Coffman, R.L. 1992. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* **10**:385-409.

Shimoji, Y., Yokomizo, Y., Sekizaki, T., Mori, Y. et Kubo, M. 1994. Presence of a capsule in *Erysipelothrix rhusiopathiae* and its relationship to virulence for mice. *Infect. Immun.* **62**: 2806-2810.

Shimoji, Y., Yokomizo, Y. et Mori, Y. 1996. Intracellular survival and replication of *Erysipelothrix rhusiopathiae* within murine macrophages: failure of induction of the oxidative burst of macrophages. *Infect. Immun.* **64**: 1789-1793.

Smith, H. 1993. Gonococci *in vivo*: host CMP-NANA, sialylated lipopolysaccharide and serum resistance. *Can. J. Infect. Dis.* **4**: 31-37.

Smith, H.E., Vech, U., Wisselink, H.J., Biermann, Y., Stockhofe-Zurwieden, S., et Smits, M.A. 1996. Mutants of *Streptococcus suis* types 1 and 2 impaired in expression of muramidase-released protein and extracellular protein induce disease in newborn germfree pigs. *Infect. Immun.* **64**: 4409-4412.

Smith, J.A., Radomski, M.W., Schulz, R., Moncada, S. et Lewis, M.J. 1993. Porcine ventricular endocardial cells in culture express the inducible form of nitric oxide synthase. *Br. J. Pharmacol.* **108**: 1107-1110.

Stamler, J.S., Singel, D.J. et Loscalzo, J. 1992. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science.* **258**: 1898-1902.

Stefanovic-Racic, M., Stadler, J., Georgescu, H.I. et Evans, C.H. 1994. Nitric oxide synthesis and its regulation by rabbit synoviocytes. *J. Rheumatol.* **21**: 1892-1898.

St-John, V.S., Wilcook, B. et Kierstead, M. 1982. *Streptococcus suis* type 2 infection in swine in Ontario: a review of clinical and pathological presentations. *Can. Vet. J.* **23**: 95-97.

Strauss, R.R, Paul, B.B, Jacobs, A.A et Sbarra, A.J. 1972. Mouse splenic peroxidase and its role in bactericidal activity. *Infect. Immun.* **5**: 120-126.

Stuehr, D.J., Gross, S.S., Sakuma, I., Levi, R. et Nathan, C.F. 1989. Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. *J. Exp. Med.* **169**: 1011-1020.

Stuehr, D.J. et Marletta, M.A. 1985. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 7738-7742.

Summersgill, J.T., Powell, L.A., Buster, B.L., Miller, R.D. et Ramirez, J.A. 1992. Killing of *Legionella pneumophila* by nitric oxide in γ -interferon-activated macrophages. *J. Leuko. Biol.* **52**: 625-629.

Swe, T. 1976. A study of spontaneous and experimental streptococcal meningitis and arthritis in the pig. M. Phil., Dissertation, Univ. London. R.V.C.

Tannenbaum, S.R., Fett, D., Young, V.R., Land, P.D. et Bruce, W.R. 1978. Nitrite and nitrate are formed by endogenous synthesis in the human intestine. *Science*. **200**: 1487-1489.

Timoney, J. 1969. The inactivation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in macrophages from normal and immune mice. *Res. Vet. Sci.* **10**: 301-303.

Timoney, J. 1970. The inactivation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in pig buffy-coat leukocytes. *Res. Vet. Sci.* **11**: 189-190.

Townsend, G.C. et Scheld, W.M. 1995. Microbe-endothelium interactions in blood-brain barrier permeability during bacterial meningitis. *ASM News*. **61**: 294-298.

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

Vecht, U., Tetenburg, B.J., Wisselink, H.J., Stockhofe-Zurwieden, N. et Smith, H.E. 1996. Incompatibility between experimental murine and pig models of *Streptococcus suis* type 2 infection. *Proc. IPVS*.

Velasco, S., Tarlow, M., Olsen, K., Shay, J.W., McCracken, G.H. et Nisen, P.D. 1991. Temperature dependent modulation of lipopolysaccharide induced interleukin 1 beta and tumor necrosis factor alpha expression in cultured human astroglial cells by dexamethasone and indomethacin. *J. Clin. Invest.* **87**: 1674-1680.

Villamor, E., Pérez-Vizcaino, F., Ruiz, T., Leza, J.C., Moro, M. et Tamargo, J. 1995. Group B Streptococcus and *E. coli* LPS-induced NO-dependent hyporesponsiveness to noradrenaline in isolated intrapulmonary arteries of neonatal piglets. *British J. Pharm.* **115**: 261-266.

Visser, J.J., Scholten, R.J. et Hoekman, K. 1994. Nitric oxide synthesis in meningococcal meningitis. *Ann. Intern. Med.* **120**: 345-346.

Wagner, D.A, Young, V.R. et Tannenbaum, R.R. 1983. Mammalian nitrate biosynthesis: incorporation of $^{15}\text{NH}_3$ into nitrate is enhanced by endotoxin treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**: 4518-4521.

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

Werner, E.R., Werner-Felmayer, G., Fuchs, D., Hausen, A., Reibnegger, G., Yims, J.J., Pflaiderer, W. et Wachter, H. 1990. Tetrahydrobiopterin biosynthetic activities in human macrophages, fibroblasts, THP-1 and T24 cells. *J. Biol. Chem.* **265**: 3189-3192.

Williams, A.E., Blakemore, W.F. et Alexander, T.J.L. 1988. A murine model of *Streptococcus suis* type 2 meningitis in the pig. Res. Vet. Sci. **45**: 394-399.

Williams, A.E. 1989. Studies on the pathogenesis of *Streptococcus suis* type 2 in the pig. PhD dissertation, Univ. Cambridge, Dept. Clin. Vet. Med.

Williams, A.E. 1990. Relationship between intracellular survival in macrophages and pathogenicity of *Streptococcus suis* type 2 isolates. Microbial. Patho. **8**: 189-196.

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

Williams, A.E. et Blakemore, W.F. 1990b. Pathology of streptococcal meningitis following intracisternal and natural routes of infection. Neuropath. Appl. Neurobiol. **16**: 345-356.

Williams, A.E. et Blakemore, W.F. 1990c. Monocyte-mediated entry of pathogens into the central nervous system. Neuropath. Appl. Neurobiol. **16**: 377-392.

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

Woods, M.S., Mayer, J., Evans, T.G. et Hibbs, J.B. 1994. Antiparasitic effects of nitric oxide in an *in vitro* model of *Chlamydia trachomatis* infection and an *in vivo* murine model of *Leishmania major* infection. *Immunol. Ser.* **60**: 179-195.

Wood, R.L. 1992. Erysipelas, p475-486. In A.D.Leman et al. (ed.), *Diseases of swine*. Iowa State University Press, Ames, Iowa.

Wright, C.D., Mülsh, A., Busse, R. et Osswald, H. 1989. Generation of nitric oxide by human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **160**: 813-819.

Xie, Q.W., Whisnant, R. et Nathan, C. 1993. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J.Exp. Med.* **177**: 1779-1784.

Zanen, H.C. et Engel, H.W.. 1975. Porcine streptococci causing meningitis and septicaemia in man. *Lancet.* **7**: 1286-1288.

Zhang, X. et Morrison, D.C. 1993a. Lipopolysaccharide-induced selective priming effects on tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages. *J. Exp. Med.* **177**: 511-516.

Zhang, X. et Morrison, D.C. 1993b. Pertussis toxin-sensitive factor differentially regulates lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **150**: 1011-1018.

Zink, M.C., Yager, J.A., Prescott, J.F. et Fernando, M.A. 1987. Electronic microscopic investigation of intracellular events after ingestion of *Rhodococcus equi* foal alveolar macrophages. *Vet. Microbiol.* **14**: 295-305.

8- ANNEXES

COLORATIONS:**1- Gram****Déparaffinage**

Toluène (2X)	2 min
Alcool 100% (2X)	2 min
Alcool 95%	2 min
Rincer à l'eau distillée	

Coloration

Colorant Good Pasture	10 min
Rincer à l'eau distillée	
Formaldéhyde 37%	4 min
Rincer à l'eau distillée	
Acide picrique	4 min
Rincer à l'eau du robinet	
Alcool 95%	4 min
Rincer à l'eau du robinet	
Violet de Gentiane	3 min
Rincer à l'eau du robinet	
Gram Iodine	1 min
Éponger sur papier buvard	
Aniline-Toluène	5 min
Rincer les lames dans un autre bain d'Aniline-Toluène (~10 fois)	
Toluène (2X)	2 min
Monter au Permout	

Préparation des solutions**Colorant Good Pasture**

Fuchsine Basique (Fischer Scientific)	2.36 g
Aniline (Sigma)	4.0 mL
Phénol liquide (VWR)	4.0 mL
Alcool 30%	400.0 mL

Gram Iodine

Lugol (Sigma)

Violet de Gentiane

Cristal violet (Sigma)	20.0 g
Alcool 100%	40.0 mL
Aniline (Sigma)	8.0 mL
Eau distillée	352.0 mL

Acide Picrique (VWR)

H.P.S.**(Héματοxyline Phloxine Safran)****Déparaffinage**

Toluène (2X)	2 min
Alcool 100% (2X)	2 min
Alcool 95%	2 min
Alcool 80%	2 min
Rincer à l'eau du robinet	

Coloration

Héματοxyline de Harris	10 min
Rincer à l'eau du robinet	
Alcool chlorydrique	4-5 sec
Rincer à l'eau du robinet	
Carbonate de Lithium	20 sec
Rincer à l'eau du robinet	
Phloxine	2-3 min
Rincer à l'eau du robinet	
Alcool 95% (2X)	2 min chaque
Alcool 100%	2 min
Safran	4 min
Tremper 2-3 fois dans alcool 100%	
Toluène (2X)	2 min
Monter au Permout	

Préparation des solutions**Hématoxyline de Harris**

Hématoxyline (Aldrich Chemical)	2.5 g
Alun (Aluminium ammonium sulfate) (Fischer Scientific)	50 g
Éthanol	25 mL
Eau distillée	500 mL
Oxyde de Mercure (Aldrich Chemical)	1.25 g
Glycérol (Biopharm)	150 mL

L'Hématoxyline a été mélangée à l'éthanol et bien dissoute. L'Alun a été mélangé à l'eau distillée. Les deux solutions ont ensuite été mises ensemble et finalement, la Glycérol a été ajouté. Ce mélange a été chauffé et porté à ébullition pendant 1 minute. Une fois le mélange reposé, l'oxyde de mercure y a été ajouté. Le mélange a ensuite été refroidi et filtré.

Phloxine

Phloxine B (BDH Laboratory)	9 g
Eau distillée	900 mL

Le pH a été ajusté entre 5.5 et 5.7 avec de l'acide acétique glacial.

Safran

Safran (Mecalab LTD)	5 g
Éthanol 100%	500 mL

Le Safran et l'Éthanol ont été mélangés et portés à ébullition dans un erlenmeyer muni d'un bouchon perforé monté d'une tige de verre. La première bouillotte a été décantée en gardant le Safran. Un autre 500 mL d'Éthanol est ajouté et porté à ébullition. À cette deuxième bouillotte ont été ajoutés 500 mL d'Éthanol et cette dernière solution est portée à ébullition. Le liquide ainsi obtenu est gardé et filtré.

Alcool Chlorhydrique 1%

Éthanol 100%	400 mL
HCl	4 mL

Carbonate de Lithium

Carbonate de Lithium (Mallinckrodt)	7.5 g
Eau distillée	500 mL

PRÉPARATION DES SOLUTIONS POUR LA M.E:

Fixateur	500 mL
CaCl ₂ anhydre (0.05% finale)	0.25 g
Na cacodylate (0.1M)	10.7 g
glutaraldéhyde (2.5%)	25 mL
pH ajusté entre 7.3-7.4.	

Tampon	
CaCl anhydre (0.05% finale)	0.25 g
Na cacodylate (0.1M)	10.7 g
Sucrose	20.0 g
pH ajusté entre 7.3-7.4 .	

Épon	250 mL
Épon 812	11.5 g
DDSA	18.5 g
NMA	24.7 g
DMP	0.5 mL

Protocole pour l'Épon

Le DMP a été ajouté à l'Épon sous la hotte et mélangé. Ensuite le mélange a été mis sous vide afin d'enlever toute les bulles d'air.

PRÉPARATION DU RÉACTIF DE GREISS

MATÉRIEL:

1-Sulfanilamide: (Sigma).

2-N-1 (1-naphtyl) ethylendiamine, dihydrochloride: (Sigma).

3-Acide Phosphorique-d3: (Sigma).

Solution 1: 1.25 mL du #3 et 500 mg du #1 ont été mis dans 48.75 mL d'eau bidistillée et conservée à 4°C.

Solution 2: 50 mg du #2 a été mis dans 50 mL d'eau bidistillée. Cette solution finale est conservée à l'abris de la lumière à 4°C.

Juste avant l'utilisation une partie de la solution 1 pour une partie de la solution 2 étaient mélangées ensemble.