

Université de Montréal

**EFFET DE *STREPTOCOCCUS SUIS*
SUR LA CAPACITÉ DE PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE
DE CELLULES DENDRITIQUES**

par

CORINNE LETENDRE

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M. Sc.)

en sciences vétérinaires

option microbiologie

Avril 2016

© Corinne Letendre, 2016

RÉSUMÉ

S. suis est un important pathogène porcine et humaine, causant méningites et septicémies. Des études suggèrent que *S. suis* dispose de facteurs de virulence, notamment sa capsule polysaccharidique (CPS), qui lui permettent de moduler les fonctions des cellules dendritiques (DCs), situées à l'interface entre l'immunité innée et adaptative. Les difficultés à développer un vaccin efficace suggèrent aussi une altération de la voie T dépendante.

L'objectif général du projet était d'évaluer l'effet de *S. suis* sur l'activation des cellules T CD4⁺ ainsi que sur la capacité de présentation antigénique des DCs.

Nous avons étudié dans un modèle murin *in vivo* la réponse T CD4⁺ mémoire lors d'infections primaire et secondaire. Une faible réponse mémoire centrale a été obtenue, suggérant que la réponse adaptative générée contre *S. suis* est limitée.

Étant donné l'importance du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) de classe II dans la présentation antigénique, nous avons évalué *in vitro* et *in vivo* l'expression de ces molécules chez les DCs. Une modulation de l'expression du MHC-II par *S. suis* a été observée. L'analyse de la transcription de gènes impliqués dans la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle du MHC-II nous permet de suggérer que *S. suis* régule à la baisse la synthèse de nouvelles molécules et favorise leur dégradation lysosomale. Cette stratégie, dans laquelle la CPS ne jouerait qu'un rôle partiel, permettrait à *S. suis* d'échapper à la réponse adaptative T dépendante.

Les résultats de cette étude fourniront de nouvelles perspectives dans la compréhension de la réponse adaptative lors de l'infection par *S. suis*.

Mots-clés : *Streptococcus suis*, cellules dendritiques, lymphocytes T CD4⁺, complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, présentation antigénique, réponse mémoire, maturation cellulaire, capsule polysaccharidique, réponse immunitaire adaptative

SUMMARY

S. suis is an important swine and human pathogen causing meningitis and septicemia. Recent studies suggest that *S. suis* possesses several virulence factors, including the capsular polysaccharide, which enable this pathogen to modulate dendritic cell (DCs) functions. DCs are key immune cells that bridge innate and adaptive immunity. Moreover, the difficulties in developing an effective vaccine suggest that *S. suis* interferes with the T-cell dependent response.

The main objective of the project was to evaluate the effect of *S. suis* on CD4⁺ T-cell activation, as well as on the antigen presentation ability of DCs.

We investigated the CD4⁺ T-cell memory response in an *in vivo* mouse model. A poor central memory response was obtained following primary and secondary infections with *S. suis*, thus suggesting that the adaptive immune response against this pathogen is limited.

The major histocompatibility complex (MHC) class II is central to the antigen presentation pathway. We thus investigated *in vitro* and *in vivo* the expression of these molecules on DCs. We observed a modulation in the expression of MHC-II by *S. suis*. Transcriptional analysis of genes involved in transcriptional and post-transcriptional regulation of MHC-II suggests that *S. suis* downregulates synthesis of MHC-II molecules and promotes their lysosomal degradation. This strategy, in which the CPS would play only a partial role, might allow *S. suis* to evade the T-cell dependent adaptive response.

Overall, these results provide new insights into the comprehension of the adaptive immune response during the infection by *S. suis*.

Key-words : *Streptococcus suis*, dendritic cells, CD4⁺ T cells, major histocompatibility complex class II, antigen presentation, memory response, cell maturation, capsular polysaccharides, adaptive immune response

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
SUMMARY	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	xi
REMERCIEMENTS	xiii
I. INTRODUCTION	1
II. RECENSION DE LA LITTÉRATURE	4
1. <i>Streptococcus suis</i>	5
1.1 Généralités.....	5
1.2 <i>Streptococcus suis</i> chez le porc.....	6
1.2.1 Épidémiologie.....	6
1.2.2 Signes cliniques et lésions	8
1.2.3 Traitement.....	9
1.2.4 Prévention.....	9
1.3 Infections zoonotiques causées par <i>Streptococcus suis</i>	11
1.3.1 Épidémiologie.....	11
1.3.2 Signes cliniques et lésions	12
1.3.3 Traitement et prévention.....	12
1.4 <i>Streptococcus suis</i> chez les autres espèces animales	13
1.5 Pathogenèse.....	14
1.5.1 Adhérence et invasion des surfaces épithéliales.....	14
1.5.2 Survie dans le sang	15
1.5.3 Activation inflammatoire et choc septique.....	16
1.5.4 Invasion du système nerveux central et méningite.....	17

2. Immunité adaptative	19
2.1 Cellules présentatrices d'antigènes	20
2.1.1 Cellules dendritiques	21
2.1.1.1 Origine et développement des DCs murines	22
2.1.1.2 Sous-types de DCs murines	24
2.1.1.3 Maturation et activation des DCs	25
2.2 Lymphocytes T CD4 ⁺	27
2.2.1 Activation des lymphocytes T CD4 ⁺	28
2.2.2 Différenciation en lymphocytes T CD4 ⁺ effecteurs	29
2.2.3 Différenciation en lymphocytes T CD4 ⁺ mémoires	31
2.3. Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (MHC-II)	32
2.3.1 Structure et fonctions des molécules classiques du MHC-II	33
2.3.2 Voie exogène de la présentation antigénique	35
2.3.2.1 Capture de l'antigène et protéolyse	35
2.3.2.2 Synthèse <i>de novo</i> des molécules du MHC-II	37
2.3.2.3 Transport des molécules du MHC-II vers le MIIC	40
2.3.2.4 Chargement peptidique du MHC-II dans le MIIC	42
2.3.2.5 Devenir du complexe pMHC-II	42
3. Réponse adaptative contre <i>Streptococcus suis</i>	45
3.1 Maturation et activation des DCs	45
3.1.1 Reconnaissance de <i>S. suis</i>	45
3.1.2 Phagocytose et élimination intracellulaire de <i>S. suis</i>	46
3.1.3 Expression des molécules du MHC-II	48
3.1.4 Expression des molécules de costimulation	48
3.1.5 Production de cytokines polarisantes	49
3.2 Réponse humorale	50
4. Problématique, hypothèse et objectifs	51
III. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS	53
Article I : Immune-responsiveness of CD4⁺ T cells during <i>Streptococcus suis</i> serotype 2 infection.	
Soumis à <i>Scientific Reports</i>, #SREP-16-18210	54
Article II : <i>Streptococcus suis</i> serotype 2 infection modulates expression of major histocompatibility complex class II molecules on dendritic cells. En préparation.	93

IV. DISCUSSION.....	119
V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	136
VI. RÉFÉRENCES	139
VII. ANNEXES	xv
Annexe I : Group B <i>Streptococcus</i> Induces a Robust IFN-γ Response by CD4+ T Cells in an <i>In Vitro</i> and <i>In Vivo</i> Model. <i>Journal of Immunology Research</i>, vol. 2016, Article ID 5290604.....	xvi
Annexe II : Licences de droits d'auteurs pour l'utilisation des figures.....	xliii

LISTE DES TABLEAUX

III. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

Article I : Immune-responsiveness of CD4⁺ T cells during *Streptococcus suis* serotype 2 infection.

Tableau SI : Splenic histopathological scores in naïve and infected mice 90

Article II : *Streptococcus suis* serotype 2 infection modulates expression of major histocompatibility complex class II molecules on dendritic cells.

Tableau I : Primer sequences used for real-time RT-qPCR..... 109

LISTE DES FIGURES

II. RECENSION DE LA LITTÉRATURE

Figure 1 : Facteurs impliqués dans l'adhérence et l'invasion des surfaces épithéliales par <i>S. suis</i>	15
Figure 2 : Facteurs et modifications structurales de la paroi bactérienne permettant à <i>S. suis</i> de déjouer la réponse immunitaire innée de l'hôte.....	16
Figure 3 : Facteurs impliqués dans l'invasion du CNS par <i>S. suis</i>	18
Figure 4 : Différenciation et transit des sous-types de DCs.....	22
Figure 5 : Influence de différents facteurs sur la différenciation des progéniteurs de DCs.....	23
Figure 6 : Stimuli conduisant à la maturation des DCs de façon directe ou indirecte.....	25
Figure 7 : Réponse des lymphocytes T naïfs à la suite d'une stimulation par une DC	26
Figure 8 : Synapse immunologique et voies de signalisation menant à l'activation du lymphocyte.....	27
Figure 9 : Différenciation et fonctions générales des principaux sous-types de lymphocytes T helper.	31
Figure 10 : Structure d'une molécule classique du MHC-II	34
Figure 11 : Voies d'endocytose des antigènes exogènes chez les DCs.....	36
Figure 12 : Régulation de l'expression du maître régulateur CIITA.....	38
Figure 13 : Différences de synthèse, dégradation, localisation et fonctions du MHC-II chez les DCs selon le signal à l'origine de leur maturation	39
Figure 14 : Transit du MHC-II dans la voie exogène de la présentation antigénique	41
Figure 15 : Modèle proposé de la reconnaissance de <i>S. suis</i> par les DCs.....	46
Figure 16 : Modèle proposé de la modulation des fonctions des DCs par <i>S. suis</i>	47
Figure 17 : Schématisation de la problématique du projet	51

III. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

Article I : Immune-responsiveness of CD4⁺ T cells during *Streptococcus suis* serotype 2 infection.

Figure 1. CD4KO are more susceptible to <i>S. suis</i> infection than control C57BL/6 mice at a low infectious dose.....	79
Figure 2 : Total splenocytes produce <i>ex vivo</i> type-1 pro-inflammatory cytokines in response to <i>S. suis</i> systemic infection.....	80
Figure 3 : CD3 ⁺ T cells produce low <i>ex vivo</i> levels of IFN- γ and show poor activation in response to <i>S. suis</i> systemic infection	81
Figure 4 : CD4 ⁺ T cells produce low <i>ex vivo</i> levels of IFN- γ , TNF- α , and IL-2 in response to <i>S. suis</i> systemic infection.....	82
Figure 5 : CD4 ⁺ T cells produce similar levels of IFN- γ , TNF- α , IL-2, and IL-10 during primary and secondary <i>S. suis</i> infections.....	83
Figure 6 : <i>S. suis</i> induces no expansion of the effector memory and central memory CD4 ⁺ T cell splenic subsets during primary and secondary infections	84
Figure 7 : <i>S. suis</i> capsular polysaccharide interferes with cytokine production by CD4 ⁺ T cells <i>in vitro</i>	85
Figure 8 : <i>S. suis</i> modulates CD4 ⁺ T cell surface expression of CD69 and CD40L <i>in vitro</i>	86
Figure 9 : Spleens from <i>S. suis</i> -infected mice show reduced numbers of CD4 ⁺ T cells concurrently with histopathological changes, as compared to control mice	87
Figure 10 : <i>S. suis</i> induces low serum levels of specific antibodies during a primary infection	88
Figure 11 : The production of ovalbumin (OVA)-specific antibodies is reduced in <i>S. suis</i> pre-infected mice as compared to control mice.....	89
Figure S1 : Total memory CD4 ⁺ T cell population remains unchanged in the spleens of <i>S. suis</i> -infected mice during a secondary infection	91
Figure S2 : Serum levels of OVA-specific antibodies correlate with clinical signs developed by <i>S. suis</i> -infected mice.....	92

Article II : *Streptococcus suis* serotype 2 infection modulates expression of major histocompatibility complex class II molecules on dendritic cells.

Figure 1 : MHC-II cell surface expression on <i>S. suis</i> -stimulated bmDCs	110
Figure 2 : CD86 and MHC-II cell surface expression on splenic DCs derived from <i>S. suis</i> -infected mice.....	111
Figure 3 : <i>Ciita</i> , <i>March1</i> and <i>March8</i> mRNA expression in <i>S. suis</i> -stimulated bmDCs.....	112

Figure 4 : <i>Ciita</i> , <i>March1</i> and <i>March8</i> mRNA expression in splenic DCs derived from <i>S. suis</i> -infected mice	112
Figure S1 : CD86 cell surface expression on <i>S. suis</i> -stimulated bmDCs	113

IV. DISCUSSION

Figure 1 : Chargement des molécules du MHC-II retrouvées à la surface cellulaire	124
Figure 2 : Étude de l'expression du MHC-II dans les radeaux lipidiques de bmDCs stimulées avec <i>S. suis</i>	128
Figure 3 : Étude de la stabilité des peptides sur les molécules du MHC-II chez des bmDCs stimulées avec <i>S. suis</i>	130

V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Figure 1 : Modèle proposé des mécanismes utilisés par <i>S. suis</i> pour déjouer la voie T dépendante....	137
--	-----

VII. ANNEXE

Annexe I : Group B *Streptococcus* Induces a Robust IFN- γ Response by CD4⁺ T Cells in an *In Vitro* and *In Vivo* Model.

Figure 1 : Survival curves and bacteremia levels of GBS-infected C57BL/6 mice	xxxI
Figure 2 : <i>Ex vivo</i> cytokine and chemokine production profile by total splenocytes	xxxII
Figure 3 : <i>Ex vivo</i> analyses of cellular sources of IFN- γ during GBS infection.....	xxxIII
Figure 4 : <i>Ex vivo</i> analyses of CD4 ⁺ T cell contribution to cytokine production	xxxIV
Figure 5 : <i>In vivo</i> CD4 ⁺ T cell contribution to cytokine production during primary and secondary GBS infections	xxxV
Figure 6 : <i>In vivo</i> generation of memory CD4 ⁺ T cells during GBS infection	xxxVI
Figure 7 : Role of bacterial capsular polysaccharide in the modulation of cytokine production by CD4 ⁺ T cells	xxxVII
Figure 8 : Role of bacterial capsular polysaccharide in the modulation of CD4 ⁺ T cell surface expression of CD69.....	xxxVIII

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
APC	Cellule présentatrice d'antigène
ARN	Acide ribonucléique
BBB	Barrière hémato-encéphalique
BCSFB	Barrière hémato-méningée
bmDCs	Cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse
BMECs	Cellules endothéliales microvasculaires cérébrales
CDPs	Cellules progénitrices communes des DCs
CIITA	Transactivateur de classe II
CLIP	Fragment associé à la chaîne invariable
CLPs	Cellules lymphoïdes progénitrices
CMPs	Cellules myéloïdes progénitrices
CNS	Système nerveux central
CPECs	Cellules épithéliales du plexus choroïde
CpG	Cytosine-phosphate-Guanosine
CPS	Capsule polysaccharidique
cSMAC	Complexe d'activation supramoléculaire central
DAMPs	Motifs moléculaires associés à des signaux de danger
DCs	Cellules dendritiques
ELISA	« Enzyme-linked immunosorbent assay »
ESCRT	« Endosomal sorting complex required for transport »
FACS	Cytométrie en flux
GBS	Streptocoque du groupe B
GILT	Thiol réductase lysosomale inductible par l'interféron- γ
GM-CSF	Facteur stimulant de colonies de granulocytes et de macrophages
HSCs	Cellules souches hématopoïétiques
IFN	Interféron

Ig	Immunoglobuline
Ii	Chaîne invariable du MHC-II
IL	Interleukine
ILVs	Vésicules intra-luminales
LPS	Lipopolysaccharide
MARCH	Ubiquitine ligase RING-CH associée à la membrane
MDPs	Progéniteurs des macrophages et des DCs
MHC	Complexe majeur d'histocompatibilité
MIIC	Compartiment du MHC-II
MyD88	Protéine adaptatrice ou facteur de différenciation myéloïde 88
NKs	Cellules « natural-killer »
NOD	Récepteur à domaines d'oligomérisation liant les nucléotides
OVA	Ovalbumine
PAMPs	Motifs moléculaires associés aux pathogènes
pSMAC	Complexe d'activation supramoléculaire périphérique
pMHC-II	Complexe peptide-MHC-II
RE	Réticulum endoplasmique
RT-qPCR	PCR quantitative en temps réel après transcription inverse
ST	« Sequence type »
STSLs	Syndrome apparenté au choc toxique streptococcique
STSS	Choc toxique streptococcique
TCR	Récepteur du lymphocyte T
Th	Lymphocyte T helper
Treg	Lymphocyte T régulateur
TLR	Récepteur de type Toll
TNF	Facteur de nécrose tumorale
WT	Souche sauvage

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements vont bien sûr à ma directrice, Dre Mariela Segura. Merci d'avoir cru en mon potentiel et de m'avoir donné la chance de travailler sur un projet de maîtrise qui me passionnait! Vous avez été pour moi une véritable mentor : merci pour la confiance que vous m'avez accordée, votre support constant et votre grande disponibilité, vos conseils et toutes les opportunités que vous m'avez offertes si généreusement et qui m'ont permis de grandir sur tous les plans. Je vous en suis extrêmement reconnaissante!

J'aimerais également remercier mes co-directeurs, Dr Marcelo Gottschalk et Dr Jacques Thibodeau, pour leur aide généreuse et efficace ainsi que pour leurs précieux conseils.

Merci à tous les membres et professeurs du GREMIP pour leurs conseils et l'intérêt porté à mon projet ainsi qu'au Dr Jean-Pierre Lavoie et à la Dre Josée Harel pour le temps investi dans l'évaluation de ce mémoire.

Merci aussi à tous les membres du secrétariat aux affaires étudiantes pour leur aide inestimable tout au long de mon cursus ainsi qu'au comité d'éthique et au personnel du FANI qui ont rendu possible la réalisation de ce projet chez un modèle animal.

Je ne peux passer sous silence tout le plaisir que j'ai eu à côtoyer les membres des laboratoires Segura, Gottschalk et Thibodeau. Un merci tout spécial à Paul qui m'a pratiquement tout appris; Cynthia ma *barista* préférée pour ses conseils et ses encouragements; Jean-Philippe et Guillaume pour les grignotines chocolatées et les discussions scientifiques enrichissantes; Tristan et Maxime pour leur aide précieuse lors de mes passages à Montréal; David, Léa, Audrey, Annabelle, Agustina, Sarah, Sonia et Claudia pour tous les sourires et les regards complices!

Merci aussi à mes formidables amies du DMV pour leurs encouragements constants et sans qui la conciliation DMV / M.Sc. / vie sociale équilibrée n'aurait pas été possible!

Je me dois également de remercier mes parents, ma famille et mes amis pour leur support indéfectible depuis toutes ces années. Merci de m'appuyer encore et toujours dans la réalisation de mes ambitions – même les plus folles qui me mèneront à l'autre bout du monde!

Enfin, un immense merci aux organismes subventionnaires pour leurs généreuses contributions qui m'ont permis de mener à bien ce projet : le Fonds DMV / M.Sc. de la Faculté de médecine vétérinaire, le Fonds Zoetis d'Investissement dans l'innovation ainsi que le Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG).

MERCI !

I. INTRODUCTION

Streptococcus suis est un important pathogène du porc qui est retrouvé mondialement. Cette bactérie encapsulée entraîne une variété de signes cliniques en causant par exemple la méningite, la pneumonie, la septicémie ou l'arthrite, autant d'affections qui compromettent le bien-être animal et constituent de graves pertes économiques pour la filière porcine (1, 2). De plus, alors que *S. suis* était traditionnellement considéré comme un agent de zoonose professionnelle pour les travailleurs de l'industrie porcine, les récentes épidémies asiatiques de cas sévères, voire fatals, liés à la consommation de viande de porcs infectés ont considérablement changé la perception de cette zoonose au cours des dernières années (3). Le contrôle de la maladie chez les porcs apparaît donc essentiel à tous les niveaux. Malheureusement, les mesures de contrôle traditionnellement utilisées en pratique porcine se sont avérées à ce jour inefficaces dans la lutte contre ce pathogène : les protocoles d'antibioprophylaxie et d'antibiothérapie ne fournissent que des résultats mitigés et pourraient contribuer au développement d'antibiorésistance, les programmes de sevrage précoce avec ségrégation sont inutiles puisque la grande majorité des porcelets sont porteurs/colonisés à peine quelques jours après leur naissance, le repeuplement des troupeaux avec des porcs exempts obtenus par césarienne est souvent peu rentable économiquement, et la vaccination à l'aide de bactérines et de souches vivantes atténuées n'offre que des résultats peu satisfaisants (1). Ainsi, le développement de nouvelles stratégies vaccinales s'impose (2).

Dans cet optique de développement vaccinal, une meilleure compréhension du type de réponse immunitaire requise pour la protection contre *S. suis* apparaît essentielle. C'est d'ailleurs dans ce sens qu'un nombre croissant d'études se sont intéressées aux interactions de *S. suis* avec les cellules immunitaires de l'hôte. Parmi les types cellulaires étudiés, les cellules dendritiques (DCs) offrent certainement une perspective unique dans la réponse contre *S. suis*, puisque ces cellules jouent un rôle clé dans l'initiation de la réponse adaptative via leur capacité de présentation de l'antigène aux lymphocytes T CD4⁺. Or, il a été suggéré que *S. suis* dispose d'un arsenal de facteurs de virulence, notamment sa capsule polysaccharidique (CPS), qui lui permettent de moduler les fonctions des DCs (4-6). Des effets de *S. suis* ont notamment été démontrés sur les capacités de reconnaissance, de phagocytose et d'élimination intracellulaire (« killing ») des DCs. De plus, il semble que *S. suis* puisse moduler la capacité des DCs à fournir les signaux requis pour l'activation des lymphocytes T CD4⁺, soit

l'expression de marqueurs de maturation et la production de cytokines polarisantes (4-6). Cependant, les mécanismes impliqués dans la modulation de ces signaux, et plus particulièrement le premier signal via la présentation de peptides antigéniques sur les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) de classe II à la surface de la DC, demeurent encore largement incompris. Une modulation de l'expression de ces molécules pourrait avoir des conséquences profondes sur le développement de la réponse adaptative subséquente, tel que rapporté pour d'autres pathogènes bactériens (7, 8). Les difficultés à développer un vaccin efficace contre *S. suis* suggèrent également une altération de la voie T dépendante.

Nous avons émis comme hypothèse que *S. suis* interfère avec le développement d'une réponse immunitaire adaptative efficace en modulant, à l'aide de sa CPS, la capacité des DCs à présenter des antigènes via le MHC-II aux cellules T CD4⁺. L'objectif général du projet est donc d'évaluer l'effet de *S. suis* sur l'activation des cellules T CD4⁺ ainsi que sur la capacité présentatrice de l'antigène des DCs. Plus spécifiquement, nous nous sommes intéressés à :

1. La **réponse T CD4⁺ mémoire** puisqu'elle constitue en soi un reflet de la qualité de la réponse adaptative générée contre *S. suis*.
2. La **régulation de l'expression du MHC-II** chez les DCs puisqu'une modulation de cette voie peut mener à la présentation de peptides plus ou moins appropriés dans l'initiation de la réponse adaptative contre *S. suis*.

Un mutant non-encapsulé de *S. suis* a par ailleurs été utilisé pour le deuxième objectif afin d'étudier l'effet de cet important facteur de virulence sur la voie du MHC-II.

II. RECENSION DE LA LITTÉRATURE

1. *Streptococcus suis*

Streptococcus suis est un pathogène commun du porc retrouvé mondialement et qui est responsable de graves pertes économiques dans la filière porcine (2). *S. suis* entraîne chez cette espèce une variété d'infections, telles que la méningite, la pneumonie, la septicémie et l'arthrite (1). Il s'agit également d'un agent zoonotique capable de causer, entre autres, la mort par choc septique ou une méningite (3).

1.1 Généralités

S. suis est un coque ovoïde encapsulé non-motile à Gram positif, d'un diamètre inférieur à 2 μm . Il est fréquemment observé sous forme isolée ou en paire, rarement en courtes chaînes (9, 10). Cet organisme anaérobie facultatif forme habituellement des colonies mucoïdes grises-blanches α -hémolytiques sur gélose au sang de mouton (9-11).

Au début des années 1950, des septicémies causées par des streptocoques hémolytiques ont été rapportées comme cause de méningite et d'arthrite chez des porcs âgés de un à six mois aux Pays-Bas (1951) et chez des porcelets de deux à six semaines d'âge au Royaume-Uni (1954) (12). Puis, en 1963, De Moor a décrit des streptocoques similaires chez des porcs septicémiques. Ces streptocoques pouvaient être différenciés biochimiquement et sérologiquement des autres espèces connues de streptocoques et ont donc été erronément considérés comme appartenant à de nouveaux groupes du système de classification de Lancefield, un système basé sur les antigènes de la paroi cellulaire (12, 13). Les souches de *S. suis* sont aujourd'hui classifiées en 35 sérotypes sur la base de l'antigénicité de leurs polysaccharides capsulaires, soit les sérotypes 1-34 et 1/2 (14). Cependant, il est à noter que des réactions croisées entre différents sérotypes peuvent survenir, comme c'est le cas notamment entre les sérotypes 1/2 et 1, 1/2 et 2 et 1 et 14 (15-17). Par ailleurs, il a été démontré que des isolats de même sérotype tout comme des isolats de sérotypes différents peuvent présenter de l'hétérogénéité génomique et phénotypique (18). Ainsi, les souches de *S. suis* sont aussi classifiées en « sequence types » (STs) à l'aide de la technique moléculaire « multilocus sequence typing » (3).

S. suis possède un arsenal de facteurs de virulence potentiellement impliqués dans la pathogenèse, mais dont le rôle demeure encore souvent peu compris (19), pour toutes sortes de raisons (1). Néanmoins, la capsule polysaccharidique (CPS) est certainement le facteur de virulence le mieux caractérisé (1, 20). Chez des souches de sérotypes 1 à 8 et 1/2 observées en microscopie électronique à transmission, la CPS a été décrite comme une couche de 20 à 30 nm d'épaisseur (21). De plus, la composition et la structure chimique de la CPS des sérotypes 1, 1/2, 2 et 14 est maintenant connue (17, 20, 22), de même que la séquence des groupes de gènes codant pour la synthèse de la CPS chez tous les sérotypes (14). La CPS est parfois présentée comme le seul facteur de virulence prouvé essentiel pour *S. suis* (16). Toutefois, il faut savoir que des souches non-encapsulées peuvent aussi envahir les tissus de l'hôte, bien que cela se produise à un niveau plus restreint qu'avec les souches encapsulées. De plus, plusieurs souches non-virulentes sont encapsulées. Enfin, des différences importantes dans le degré de virulence ont été rapportées au sein d'un même sérotype. Cela indique que plusieurs facteurs sont nécessaires à la pleine virulence de *S. suis* (23).

1.2 *Streptococcus suis* chez le porc

1.2.1 Épidémiologie

Les infections causées par *S. suis* chez le porc sont rapportées partout dans le monde : Amérique du Nord (États-Unis et Canada), Amérique du Sud (Brésil), Europe (Royaume-Uni, Pays-Bas, France, Belgique, Danemark, Norvège, Finlande, Espagne, Allemagne, Irlande et Pologne), Asie (Chine, Thaïlande, Viet Nam, Corée du Sud, Japon et Taïwan) et Océanie (Australie et Nouvelle-Zélande) (13, 24, 25). Bien que le sérotype 2 soit le plus prévalent dans la plupart des pays, surtout en Asie et en Europe, il existe des différences géographiques et temporelles importantes dans la distribution des sérotypes (16, 23, 26-28). Un article de synthèse décrivant la distribution mondiale des sérotypes et STs dans la population porcine entre 2002 et 2013 est d'ailleurs paru récemment (3).

L'habitat naturel de *S. suis* comprend les voies respiratoires supérieures ainsi que les tractus génital et digestif du porc. Cet organisme est fréquemment isolé chez des porcs sains, particulièrement dans les amygdales et les cavités nasales (29, 30). Le taux de porteurs

asymptomatiques peut être aussi élevé que 80% et le taux de morbidité varie entre <1% et >50% (24). Sur des fermes européennes, il a été démontré que jusqu'à 81% des porteurs asymptomatiques transportaient un ou plusieurs sérotypes simultanément et que différents génotypes d'un même sérotype pouvaient être isolés simultanément chez un même animal (29, 31). Cependant, bien que différentes souches d'un même sérotype puissent être présentes au sein d'un troupeau fermé, une seule souche s'établit généralement et est responsable de la majorité des cas cliniques (31, 32). La caractérisation génotypique est donc essentielle pour établir l'origine de l'infection et suivre la cinétique de l'éclosion (33).

Les porteurs asymptomatiques de *S. suis* sont importants dans l'épidémiologie de l'infection (34). Par conséquent, leur détection est essentielle pour le contrôle de la maladie. De nouvelles technologies dérivées de la biologie moléculaire ont d'ailleurs été mises au point pour améliorer la surveillance et la détection des porteurs asymptomatiques (1, 33, 35). *S. suis* est habituellement introduit dans un élevage par l'arrivée de porteurs sains. Ces derniers constituent une source de contamination au sein de l'élevage, au même titre que les porcs malades qui peuvent infecter les porcs sains par contact direct ou indirect (30, 33, 34). La transmission horizontale se fait principalement par voie respiratoire ou par blessures cutanées. Il est généralement admis que *S. suis* se transmet par contact direct « nez à nez » entre animaux, mais il a été démontré que *S. suis* se transmet également sous forme d'aérosols sur une distance de 40 cm, sans contact direct (36). Les objets contaminés ainsi que les mouches sont des vecteurs à l'intérieur d'une ferme infectée et entre différentes fermes (1). De plus, *S. suis* peut se transmettre verticalement. En fait, les truies sont considérées comme la source d'infection la plus importante pour leur portée. Les porcelets se contaminent avec les fèces de la truie ou lors de la parturition avec ses sécrétions vaginales, et ce, parfois avec plusieurs sérotypes différents. Les porcelets colonisés introduisent ensuite *S. suis* dans la pouponnière où la bactérie pourra être transmise aux autres porcelets et causer une maladie clinique au moment du déclin de l'immunité maternelle (32, 37-39).

La plupart des manifestations cliniques surviennent entre l'âge de cinq et dix semaines, mais quelques cas sporadiques chez des nouveaux-nés et des adultes ont aussi été décrits (40, 41). Les porcelets seraient particulièrement susceptibles après le sevrage en raison des

différents stress auxquels ils sont confrontés à cet âge : séparation de la mère, fin de l'immunité passive, changements liés à leur environnement et à leur diète (42). Il est aussi bien connu que certaines pratiques d'élevage (fluctuations excessives de température, humidité relative élevée, mauvaise ventilation, entassement, écart d'âge de plus de deux semaines entre les porcelets à l'intérieur d'une même pièce) ainsi que le stress lié au transport et à la vaccination constituent des facteurs augmentant la susceptibilité à l'infection (43, 44). Enfin, le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP) et celui de la maladie d'Aujeszky (pseudorage) ont été décrits comme d'autres facteurs prédisposant (1, 45).

1.2.2 Signes cliniques et lésions

S. suis peut causer de l'arthrite, des méningites, des pneumonies, des endocardites, des encéphalites, des polysérosites fibrineuses, des avortements, des abcès et même des morts subites dans certains cas suraigus de septicémie (13, 46). D'autres infections telles que la rhinite et la vaginite ont aussi été rapportées (1). Le premier signe clinique à la suite de l'infection est généralement une hyperthermie, souvent accompagnée d'une perte d'appétit et de dépression. Une bactériémie est habituellement détectable à ce stade, voire même une septicémie prononcée pouvant persister durant trois semaines si aucun traitement n'est entrepris (1). Les animaux atteints de méningite manifestent différents signes neurologiques (incoordination, difficultés ambulatoires, pédalage en décubitus latéral, opisthotonos, convulsions et nystagmus), tandis que les animaux atteints d'endocardite ou de pneumonie souffrent de dyspnée, de cyanose et de dépérissement (1). Il est intéressant de noter que les porcs infectés ne présentent généralement pas d'atteinte neurologique et respiratoire de façon simultanée (47).

Les lésions d'importance attribuées à *S. suis* sont habituellement caractérisées par des infiltrations neutrophiliques (inflammation suppurative) parfois accompagnées de dépôt de fibrine et sont globalement les mêmes pour tous les sérotypes, du moins sur le plan microscopique (1). Le rôle de *S. suis* comme agent primaire de méningite est bien établi, puisqu'il s'agit généralement de la seule bactérie isolée dans ces cas. En revanche, le rôle de *S. suis* comme agent primaire de pneumonie demeure controversé. En effet, en Amérique du

Nord, cet organisme causant des lésions de bronchopneumonie avec ou sans pleurésie est généralement considéré comme un envahisseur secondaire (47).

1.2.3 Traitement

L'utilisation judicieuse d'antimicrobiens pour *S. suis* est essentielle pour minimiser la sélection de souches résistantes et préserver l'efficacité thérapeutique d'antimicrobiens à large spectre. La surveillance de la virulence et des profils de résistance est d'autant plus importante que ce pathogène est zoonotique (48). Les profils de résistance varient de pays en pays, mais également en fonction des sérotypes et de certains facteurs de virulence (1, 49). La résistance aux antimicrobiens communément utilisés chez le porc (notamment les lincosamides, les macrolides, les sulfonamides et la tétracycline) a été documentée à travers le monde chez jusqu'à 85% des souches de *S. suis*, souvent même avec des profils de multirésistance (48, 49). L'utilisation continue de ces antimicrobiens dans la filière porcine pourrait être à l'origine de la sélection et de la dispersion de ces souches résistantes (48).

Le choix de l'antimicrobien devrait toujours reposer sur une culture et un test de sensibilité bactérienne (1, 48). De plus, il est à noter qu'un traitement ne garantit pas l'élimination du statut de porteur (48). Dans les cas où la maladie est très aiguë et où la réponse au traitement parentéral est faible, il semble préférable de traiter tous les animaux d'un enclos via la nourriture ou l'eau de boisson (41). Par ailleurs, puisque les signes cliniques de méningite sont associés à l'inflammation, l'administration d'un agent anti-inflammatoire a été suggérée comme pouvant améliorer la réponse au traitement (1).

1.2.4 Prévention

La prévention de la maladie dans un troupeau passe avant tout par le contrôle des facteurs prédisposant à l'infection (voir section 1.2.1) (1). Une antibioprofylaxie débutée quelques jours avant des manipulations stressantes ou l'introduction d'un sujet de remplacement a également été proposée comme mesure préventive (41), mais des résultats contradictoires ont été obtenus avec ce genre de pratique (1). Quant aux programmes de sevrage précoce avec ségrégation, ils ne sont pas efficaces contre les infections causées par *S. suis* puisque cette bactérie peut être isolée des amygdales de porcelets dès un jour d'âge

(50). En fait, seuls les animaux obtenus par césarienne et privés de colostrum seraient exempts de *S. suis*, mais la dépopulation suivie du repeuplement avec des porcs exempts est peu rentable économiquement pour la plupart des troupeaux (1, 51, 52). La vaccination apparaît donc comme une mesure de contrôle importante dans le contexte des infections causées par *S. suis*. En fait, de nombreux efforts ont été, et sont encore, déployés dans ce domaine (2).

L'approche vaccinale initialement utilisée dans la lutte contre *S. suis*, et encore aujourd'hui en vigueur dans certains élevages, implique l'administration chez les truies ou les porcelets de bactérines commerciales ou autogènes, soit des bactéries entières inactivées par la chaleur ou un traitement au formol (2). Cependant, l'efficacité et la sécurité des bactérines demeure mitigée et de nombreux échecs vaccinaux sont rapportés (1, 2). Ceux-ci offrent en fait rarement une protection hétérologue contre les différents sérotypes (voire même les différentes souches d'un même sérotype) pouvant être présents dans les élevages (53, 54).

L'intérêt en recherche s'est donc déplacé vers le développement de vaccins sous-unitaires ciblant des antigènes protéiques de *S. suis*, qui seraient idéalement communs à plusieurs souches et sérotypes afin de garantir une réponse protectrice universelle (2). En fait, dans les dernières décennies, la liste de nouvelles protéines immunogéniques de *S. suis* évaluées comme candidats vaccinaux n'a cessé de s'allonger. De nombreuses divergences existent cependant dans la dose et le mode d'administration, le type d'adjuvant et le modèle animal utilisé, rendant difficile la comparaison entre les études (1, 2). De plus, bien que la plupart des candidats testés aient été choisis en raison de leur expression par différentes souches de différents sérotypes, leur capacité à induire une protection croisée n'a seulement été évaluée que pour quelques-uns de ces candidats (2). Le type et la magnitude de la réponse humorale induite ainsi que le niveau de protection obtenu face à un challenge avec *S. suis* ont été répertoriés, pour chaque candidat sous-unitaire, dans un article de synthèse récent (2). À ce jour, le développement de vaccins sous-unitaires à base d'antigènes protéiques de *S. suis* est encore au stade expérimental.

Une avenue prometteuse dans la lutte contre *S. suis* semble être le développement d'un vaccin dirigé contre la CPS. En effet, les anticorps contre la CPS du sérotype 2 augmentent *in vitro* l'opsonophagocytose et l'élimination intracellulaire (« killing ») de *S. suis* par les

cellules phagocytaires, et confèrent par immunisation passive une résistance à un challenge avec *S. suis* *in vivo* chez la souris (55, 56). De plus, un tel vaccin aurait le potentiel de protéger contre toutes les souches d'un même sérotype (2). Néanmoins, la CPS étant une molécule très peu immunogénique, le développement d'un tel vaccin demeure un défi considérable (2).

1.3 Infections zoonotiques causées par *Streptococcus suis*

1.3.1 Épidémiologie

Le premier cas d'infection humaine causé par *S. suis* a été observé au Danemark en 1968 (46). Depuis, des cas ont été décrits en Amérique du Nord et du Sud, en Europe, en Asie et en Océanie (3). Le nombre de cas humains rapportés (plus de 1600 à ce jour) a augmenté de façon très significative dans les dernières années, particulièrement dans les pays d'Asie du Sud-Est (3). La surveillance accrue, l'amélioration des méthodes diagnostiques et les épidémies asiatiques survenues dans les dernières années (notamment en Chine en 1998 et 2005) ont contribué à cette hausse (3, 24). Cependant, la situation en Asie diffère grandement de celle en Occident : la prévalence de cas humains est très élevée en Asie, relativement élevée en Europe et faible en Amérique du Nord (57). De plus, les taux de mortalité varient de moins de 3% dans la plupart des pays occidentaux à 26% dans certains pays asiatiques (57). Ainsi, *S. suis* a été identifié comme la première cause de méningite chez les adultes au Viêt-Nam, la deuxième en Thaïlande et la troisième cause la plus fréquente de méningite bactérienne acquise dans la collectivité à Hong Kong. En revanche, seuls des cas sporadiques ont été rapportés au Canada et aux États-Unis (3). Cette différence pourrait s'expliquer par des erreurs de diagnostic, mais aussi par une plus faible prévalence de souches virulentes pour les humains en Amérique du Nord (3). En effet, le bagage génétique semble influencer la capacité de *S. suis* à causer des infections zoonotiques puisque les isolats de patients humains appartiennent presque toujours au sérotype 2 et sont étroitement liés génétiquement (3, 58).

L'infection causée par *S. suis* était traditionnellement connue comme une zoonose occupationnelle pour les travailleurs de l'industrie porcine (24, 46). L'infection survenait typiquement via des lésions cutanées lors de la manipulation de porcs cliniquement sains ou malades (57). La rareté de l'infection suggérait que sa survenue nécessitait l'implication

d'autres facteurs comme l'immunosuppression, le diabète, l'alcoolisme, l'asplénie ou le cancer (59). Cependant, le caractère épidémique des cas asiatiques a changé la perception de cette zoonose (1) et il est maintenant généralement admis que l'infection peut survenir lors de consommation de viande de porc avec une charge bactérienne importante et consommée insuffisamment cuite (3, 59). La voie d'infection orale n'a toutefois jamais été démontrée expérimentalement, tant chez le porc que chez la souris. D'autre part, des cas de porteurs asymptomatiques ont été décrits chez l'humain (28), mais la probabilité de transmission entre humains n'a jamais été prouvée (60). Enfin, il est intéressant de noter que l'infection ne semble pas conduire au développement d'une immunité protectrice, puisqu'un patient aurait été infecté deux fois à 15 ans d'intervalle (61).

1.3.2 Signes cliniques et lésions

Chez l'humain, *S. suis* cause une infection systémique après une période d'incubation variant généralement de quelques heures à deux jours (1). La méningite est la manifestation clinique la plus fréquente, mais elle peut également se manifester sous la forme aiguë d'un choc septique, particulièrement dans le cas du syndrome apparenté au choc toxique streptococcique (« streptococcal toxic shock-like syndrom » ; STSLS) associé aux épidémies asiatiques (3). En plus d'une fièvre élevée, de frissonnements, de maux de tête, de vomissements et de douleur abdominale, des signes cliniques d'hypotension, de tachycardie, de dysfonction hépatique, de coagulation intravasculaire disséminée, de défaillance rénale aiguë et du syndrome de détresse respiratoire aigu sont alors observés (3, 60). Alors que la mort suit souvent le choc septique, la séquelle la plus fréquente après la guérison d'une méningite suppurative est une perte auditive (60) ainsi que des vertiges et de l'instabilité posturale en raison d'une atteinte vestibulaire (62).

1.3.3 Traitement et prévention

L'approche thérapeutique dépend évidemment des signes cliniques du patient. Dans les cas de méningite, une antibiothérapie agressive est habituellement recommandée pour un minimum de six semaines puisque des cas de rechute ont été rapportés (46). De plus, le traitement antibiotique semble malheureusement avoir un effet limité chez les patients ayant

développé un choc septique. Des traitements et des soins de support intensifs sont alors souvent requis (60).

Il n'existe actuellement aucun vaccin humain contre *S. suis*. Par conséquent, la prévention de la transmission aux humains dépend directement du contrôle de la maladie chez les porcs, soit via l'amélioration des conditions d'élevage ou la vaccination des porcs (62). Des mesures de santé publique telles qu'une vigilance accrue de la maladie chez les populations à risque (sur le plan professionnel ou selon les habitudes alimentaires) ainsi que des campagnes de sensibilisation concernant les mesures d'hygiène à adopter devraient également permettre de réduire le nombre d'infections humaines (60).

1.4 *Streptococcus suis* chez les autres espèces animales

Des cas d'infections causées par *S. suis* ont été rapportés chez le cheval, le bovin, le cerf, le mouton, le chat, le chien et même certaines espèces d'oiseaux. De plus, des porteurs asymptomatiques ont été rapportés chez des sangliers sauvages, des ruminants, des chiens et des chats (63-67). Cette diversité d'hôtes porteurs est inquiétante, car ceux-ci pourraient potentiellement agir comme réservoirs et transmettre des souches virulentes au porc ou à l'humain (1). Un cas de transmission zoonotique à partir d'un bovin a d'ailleurs été décrit (68).

Au niveau expérimental, un modèle d'infection *in vivo* a été établi chez la souris adulte et permet de reproduire les deux phases de la maladie causée par *S. suis* sérotype 2 : un syndrome aigu apparenté au choc septique menant à la mort et une seconde phase plus tardive associée à des dommages cérébraux (69). Il est intéressant de noter que ce modèle permet d'induire des signes cliniques de méningite/encéphalite à la suite d'une injection par voie intrapéritonéale. Cette approche est nettement plus représentative de la pathogenèse naturelle que lors d'inoculation directe de la bactérie dans le système nerveux central (69, 70). Depuis sa publication originale en 2007 (69), ce modèle a été repris dans de nombreuses publications (71-76). Les interactions de *S. suis* avec différents types cellulaires ont également été étudiées *in vitro* chez la souris, notamment chez des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (bmDCs), un modèle qui sera discuté plus en détails à la section 2.1.1.1 (4, 77, 78).

1.5 Pathogenèse

Les animaux colonisés par *S. suis* hébergent habituellement la bactérie dans leur cavité oropharyngée, plus particulièrement dans leurs amygdales (1). Certains porcs demeureront porteurs asymptomatiques, alors que d'autres développeront une bactériémie, une septicémie et/ou une méningite associée à la dissémination de *S. suis*, le plus souvent au moment du déclin de l'immunité maternelle (16, 32). De façon plus spécifique, pour causer une maladie, *S. suis* doit traverser les barrières épithéliales, atteindre la circulation sanguine et y survivre, envahir différents organes et déclencher une réponse inflammatoire exagérée (19). Plusieurs des mécanismes proposés ci-dessous ne sont toutefois encore que des hypothèses.

1.5.1 Adhérence et invasion des surfaces épithéliales

Les mécanismes par lesquels *S. suis* parvient à franchir les épithéliums (tant oropharyngés que cutanés ou intestinaux) demeurent encore peu connus (19). En fait, il semble que les niveaux d'adhérence et d'invasion soient très faibles (1). De plus, la production de biofilm par *S. suis* pour survivre et coloniser les amygdales et les autres organes demeure controversée (19). Néanmoins, il est généralement admis que l'adhérence de *S. suis* aux cellules épithéliales dépend de différentes adhésines bactériennes (décrites dans la Figure 1). Ces adhésines étant partiellement masquées par la CPS, il a été proposé que *S. suis* puisse réguler à la baisse l'expression de cette dernière durant les premières étapes de l'infection afin de favoriser l'accessibilité aux ligands. D'ailleurs, il est intéressant de noter que seules les souches non-encapsulées ont la capacité d'envahir les cellules épithéliales (19). La suilysine (une toxine produite par certaines souches de *S. suis*) participerait également, sans être essentielle, à la perturbation de la surface épithéliale avec son activité cytotoxique (16). Une fois la barrière épithéliale traversée, *S. suis* adhérerait ensuite aux composantes de la matrice extracellulaire (19).

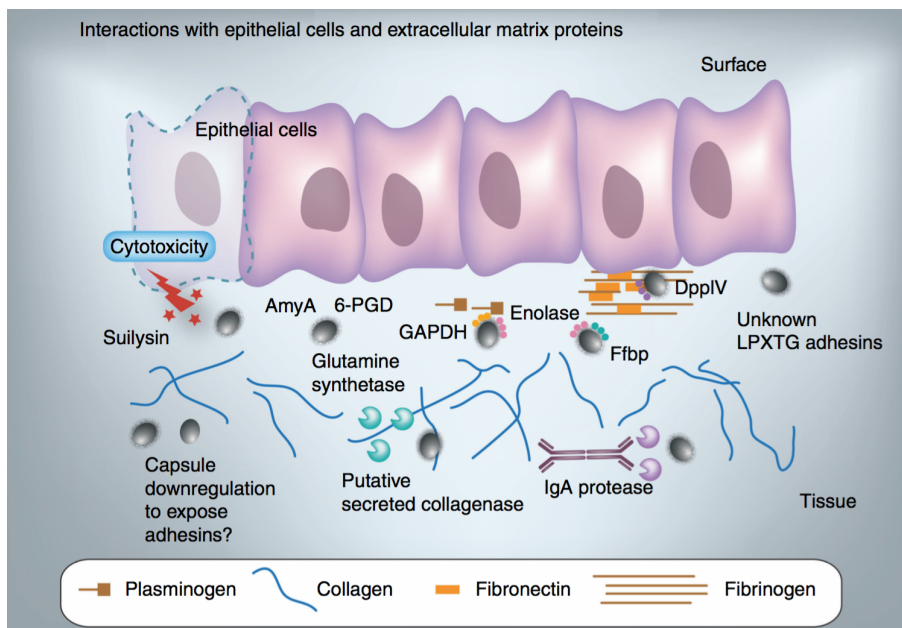


Figure 1. Facteurs impliqués dans l'adhérence et l'invasion des surfaces épithéliales par *S. suis*.

AmyA : amylopullulanase A; *6-PGD* : 6-phosphogluconate déshydrogénase; *DppIV* : dipeptidylpeptidase IV; *Ffbp* : protéine de liaison au fibrinogène et à la fibronectine; *GAPDH* : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase. Reproduit avec la permission de Future Medicine Ltd : [Future Microbiology], de Fittipaldi *et al.* (19), copyright (2012).

1.5.2 Survie dans le sang

Chez le porc, le tissu lymphoïde des amygdales est recouvert d'un épithélium avec de profondes invaginations où *S. suis* semble initialement contenu en raison de ses interactions avec différentes cellules de l'immunité innée (neutrophiles, macrophages) ainsi que les cellules épithéliales (19). Cependant, une fois la barrière épithéliale franchie, *S. suis* parviendrait à échapper à la surveillance immunitaire (19). En effet, la CPS de *S. suis* est très faiblement immunogénique, en plus d'assurer une protection contre la phagocytose et l'élimination intracellulaire (5, 79, 80). Il a été suggéré que l'acide sialique présent dans la CPS joue un rôle dans l'évasion immunitaire de *S. suis*, mais cela demeure peu démontré (19). Néanmoins, il semble que *S. suis* régule à la hausse l'expression de sa CPS une fois entré dans la circulation sanguine et qu'il y voyagerait aussi bien sous forme libre qu'adhérée à la surface des monocytes (hypothèse modifiée du Cheval de Troie) (16, 23). De plus, *S. suis* posséderait plusieurs facteurs ainsi que des modifications structurales de la paroi bactérienne lui permettant de déjouer la réponse immunitaire innée (décrits dans la Figure 2).

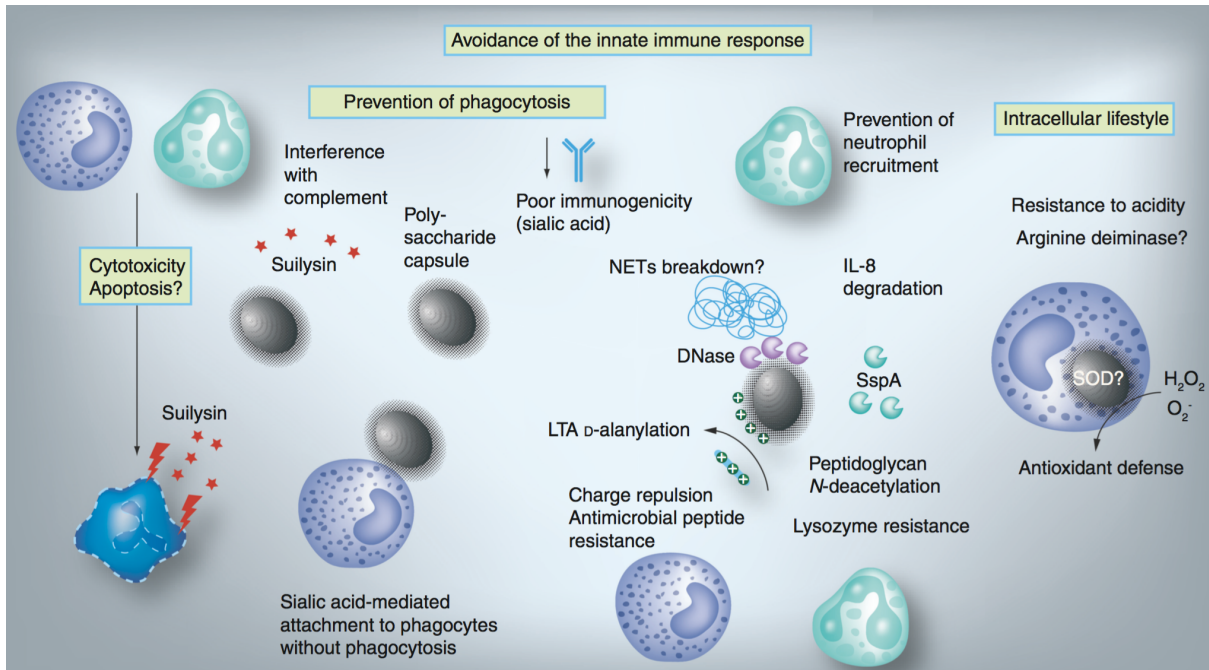


Figure 2. Facteurs et modifications structurales de la paroi bactérienne permettant à *S. suis* de déjouer la réponse immunitaire innée de l'hôte.

LTA : acide lipotéichoïque; *NET* : pièges extracellulaires du neutrophile; *SOD* : superoxyde dismutase; *IL-8* : interleukine-8.

Reproduit avec la permission de Future Medicine Ltd : [Future Microbiology], de Fittipaldi *et al.* (19), copyright (2012).

1.5.3 Activation inflammatoire et choc septique

Bien que l'activation du système immunitaire durant une infection microbienne soit généralement protectrice, un choc septique peut se développer comme conséquence d'une réponse immunitaire pauvrement régulée contre l'organisme pathogène (81). Cette relâche excessive de composés inflammatoires endogènes peut être dommageable pour l'hôte, en perturbant notamment son homéostasie vasculaire et/ou son hémostasie, ce qui peut alors conduire à une dysfonction multi-organique (81). Or, il semble que certaines souches virulentes de *S. suis*, notamment celles responsables des épidémies asiatiques de STSLS, manipulent ainsi à leur avantage le système immunitaire de l'hôte. En effet, il a pu être démontré que *S. suis* induit *in vitro* une relâche de médiateurs pro-inflammatoires par des cellules porcines, murines et humaines (19). Des niveaux systémiques élevés de cytokines de type inflammatoire ont aussi été observés durant la phase de choc septique *in vivo* chez la

souris, de même que dans les cas humains de STSLS (69, 82). De plus, *S. suis* induit l'expression de molécules d'adhésion impliquées dans l'inflammation, provoquant ainsi le recrutement massif de leucocytes et l'aggravation de la relâche de médiateurs inflammatoires (19). Par ailleurs, la production de l'interleukine (IL)-10, une cytokine anti-inflammatoire, a été observée dans le modèle murin *in vivo* et pourrait indiquer un mécanisme de rétrocontrôle négatif visant à contrôler l'étendue de la réponse inflammatoire (69). L'activation cellulaire par *S. suis* impliquerait des récepteurs de reconnaissance et de motifs moléculaires, notamment CD14 et le récepteur de type Toll (TLR)-2, mais d'autres TLR pourraient aussi intervenir (19). Enfin, bien que des études à l'aide de mutants non-encapsulés aient démontré le rôle important des composantes de la paroi bactérienne dans l'induction de la réponse inflammatoire, les composantes bactériennes impliquées n'ont pas encore été identifiées de façon précise (19). De plus, il semble que les cas de STSLS ne puissent être expliqués par la présence chez *S. suis* d'un superantigène ou d'autres facteurs habituellement mis en cause lors de choc toxique streptococcique (« streptococcal toxic-shock syndrom » ; STSS) (83, 84). Cependant, des souches de *S. suis* hautement virulentes ont un effet mitogénique accru par rapport à des souches moins virulentes, ce qui contribuerait potentiellement à leur capacité d'induire le STSLS (71).

1.5.4 Invasion du système nerveux central et méningite

Dans les cas où l'hôte survit à la première phase de l'infection, *S. suis* peut alors gagner le système nerveux central (CNS) en traversant la barrière hémato-encéphalique (« blood-brain barrier » ; BBB) et/ou la barrière hémato-méningée (« blood-cerebrospinal fluid barrier » ; BCSFB), deux barrières assurant l'homéostasie de l'environnement interne du cerveau (19). Alors que les microvaisseaux cérébraux de la BBB sont formés essentiellement de cellules endothéliales (BMECs), la BCSFB est composée des cellules épithéliales du plexus choroïde (CPECs) et d'un endothélium fenestré (85). Bien que certains points soient encore controversés, il semble que *S. suis* soit capable d'adhérer et d'envahir ces différents types cellulaires, du moins chez le porc (Figure 3) (19).

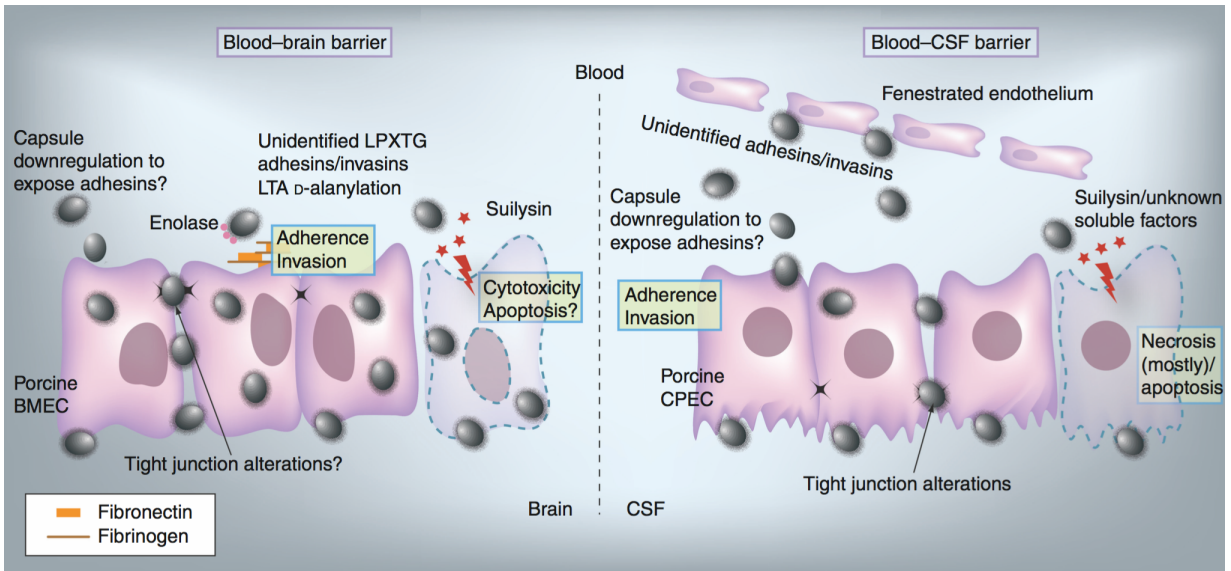


Figure 3. Facteurs impliqués dans l'invasion du CNS par *S. suis*.

LTA : acide lipotéichoïque; *BMEC* : cellules endothéliales microvasculaires cérébrales; *CPEC* : cellules épithéliales du plexus choroïdien; *CSF* : liquide cérébro-spinal.

Reproduit avec la permission de Future Medicine Ltd : [Future Microbiology], de Fittipaldi *et al.* (19), copyright (2012).

Une fois dans le parenchyme cérébral ou le liquide cérébro-spinal (pauvre en cellules phagocytaires, en éléments du complément et en immunoglobulines) (86), *S. suis* peut alors se multiplier de façon incontrôlée. Une réaction inflammatoire contre les composantes bactériennes survient conséquemment, et cela via l'activation des cellules de la microglie, des astrocytes, des BMECs et des CPECs (19, 87). Malheureusement, cette réponse inflammatoire ne fera que contribuer, ultimement, aux dommages cérébraux (88).

2. Immunité adaptative

L'immunité adaptative aurait émergé au début de l'évolution des vertébrés, plus spécifiquement avec l'apparition des vertébrés à mâchoire, un groupe d'animaux chez qui le risque d'acquérir des infections était possiblement accru en raison de leur rythme de croissance plus lent et de leur diète alimentaire plus diversifiée (89, 90). En effet, alors que le système immunitaire inné permet la détection et l'élimination des pathogènes de façon simple, rapide et relativement non-spécifique (91, 92), l'immunité adaptative fournit un répertoire beaucoup plus large et mieux adapté à la reconnaissance des antigènes du soi et du non-soi (91, 93). Cela est possible grâce au réarrangement d'ensembles de segments de gènes qui survient durant l'ontogénèse et génère les récepteurs spécifiques d'antigène des lymphocytes (« T- or B-cell receptor » ; TCR et BCR). Ce vaste répertoire de récepteurs (10^{14} combinaisons possibles) permet de reconnaître les différentes composantes de tous les pathogènes potentiels, du moins en théorie, et d'y répondre de façon spécifique (90, 93, 94).

La génération de ce répertoire de récepteurs spécifiques d'antigène se produit lors du développement des lymphocytes dans les organes lymphoïdes primaires, soit la moelle osseuse pour les lymphocytes B et le thymus pour les lymphocytes T (89). Quant aux organes lymphoïdes secondaires (nœuds lymphatiques avec centres germinatifs, rate et tissus lymphoïdes des muqueuses), ils sont colonisés par des lymphocytes B et T matures où ces derniers interagissent entre eux et avec d'autres types cellulaires (89, 95). Les lymphocytes T sont des joueurs clés de la réponse immunitaire adaptative, non seulement par le rôle des T CD8⁺ dans l'immunité à médiation cellulaire, mais surtout en raison de l'impressionnante capacité des T CD4⁺ à initier et diriger l'ensemble de la réponse adaptative, y compris la production d'anticorps par les lymphocytes B (réponse humorale T dépendante) (91). Étant donné leur rôle crucial dans la réponse contre un pathogène bactérien extracellulaire, les lymphocytes T CD4⁺ et les signaux requis pour leur pleine activation feront donc ici l'objet de ce deuxième chapitre de la recension de la littérature.

2.1 Cellules présentatrices d'antigènes

L'activation des lymphocytes T ne peut survenir sans l'aide des cellules présentatrices d'antigène (« antigen-presenting cells » ; APCs). Ces cellules ont pour fonction de patrouiller l'organisme à la recherche d'invasisseurs potentiels (7, 96). Lorsqu'une APC rencontre un pathogène envahissant, celui-ci est capturé et dégradé en fragments antigéniques. L'APC voyage alors jusqu'au tissu lymphoïde régional où elle présente ces antigènes aux lymphocytes T de façon à activer les cellules dont les TCR sont spécifiques pour ces antigènes (91). Les APCs sont donc situées à l'interface entre l'immunité innée et adaptative (7, 97).

Pour être reconnu par le TCR d'un lymphocyte T CD4⁺, l'antigène doit être de nature peptidique et être présenté sur une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (« major histocompatibility complex » ; MHC) de classe II (96), un concept qui sera discuté plus en détails à la section 2.3. C'est précisément cette capacité à présenter des peptides associés à des molécules du MHC-II qui définit les APCs (96). Il existe deux types d'APCs : non-professionnelles et professionnelles (91). Comme leur nom le laisse supposer, les APCs non-professionnelles ne présentent pas d'antigènes aux T CD4⁺ en temps normal, mais elles peuvent être amenées à le faire pour de courtes périodes durant une réponse inflammatoire prolongée (96). C'est le cas notamment des entérocytes, chez qui l'interféron (IFN)- γ induit l'expression du MHC-II (98). Les fibroblastes, les cellules gliales, les cellules pancréatiques bêta, les cellules épithéliales thymiques, les cellules épithéliales thyroïdiennes et les cellules endothéliales vasculaires sont d'autres types d'APCs non-professionnelles (96). Quant aux APCs professionnelles, elles font référence aux cellules dendritiques (DCs), aux macrophages et aux lymphocytes B (96). Parmi ces trois types d'APCs, les DCs sont les plus puissantes (99). Il s'agit en fait du seul type capable d'activer des lymphocytes T naïfs et d'initier une réponse immunitaire spécifique primaire et mémoire (100). La grande efficacité des DCs en termes de présentation antigénique s'explique par le fait que ces cellules ne dégradent les protéines que de façon partielle (100). Cette capacité à préserver l'information contenue dans les peptides contraste avec la grande activité protéolytique et catabolique observée chez les macrophages. En effet, la principale fonction de ces derniers demeure l'élimination des pathogènes (100, 101), quoiqu'ils puissent dégrader et présenter des antigènes aux T CD4⁺

sous certaines conditions (100). Enfin, la présentation antigénique par les lymphocytes B aux T CD4⁺ est essentielle pour la pleine activation des lymphocytes B, mais elle n'est pas aussi efficace que celle réalisée par les DCs (102, 103). Par conséquent, étant donné le rôle unique des DCs dans la présentation antigénique et l'activation de lymphocytes T CD4⁺ naïfs, les caractéristiques et fonctions de ce type cellulaire seront davantage développées ci-dessous.

2.1.1 Cellules dendritiques (DCs)

Les DCs ont été décrites pour la première fois au début des années 1970 par Ralph Steinman qui a observé un type cellulaire de morphologie étoilée ou « dendritique » dans la rate de souris. Ces cellules étaient non-phagocytaires, faiblement adhérentes et de faible flottabilité (104). Les DCs forment un groupe très hétérogène de populations cellulaires qui se distinguent sur la base de leur phénotype, leur localisation et leurs fonctions. Par conséquent, la définition de ce qui constitue une DC ne fait pas l'unanimité. En fait, il n'existe aucune définition moléculaire spécifique pour les DCs comme c'est le cas par exemple pour les lymphocytes (101, 105). Les DCs sont plutôt définies par leurs propriétés fonctionnelles et une combinaison de marqueurs cellulaires (notamment une expression élevée de CD11c et du MHC-II) (105). En raison de leur capacité à capturer et présenter les antigènes sur les molécules du MHC-II qu'elles expriment constitutivement (104), les DCs sont impliquées dans une multitude de fonctions immunologiques : 1) induction d'une immunité liée aux lymphocytes T ou d'une tolérance selon leur état d'activation; 2) génération de lymphocytes T régulateurs; 3) activation des cellules « natural killer » (NK); 4) promotion de l'expansion homéostatique des lymphocytes T et des cellules NK lors de lymphopénie (105). Les DCs jouent également un rôle dans la stimulation des lymphocytes B dans les organes lymphoïdes secondaires, autant dans les régions où se trouvent les lymphocytes T que dans les centres germinatifs (104). Cette recension de la littérature s'intéressera plus particulièrement au rôle des DCs dans l'activation des lymphocytes T CD4⁺ via la présentation antigénique sur le MHC-II.

2.1.1.1 Origine et développement des DCs murines

Les DCs originent dans la moelle osseuse de cellules souches hématopoïétiques (HSCs) différenciées en cellules myéloïdes progénitrices (CMPs) (104, 106). La population de CMPs FLT3⁺ se différencie ensuite en progéniteurs des macrophages et des DCs (MDPs), dont sont issues les cellules progénitrices communes des DCs (CDPs). Celles-ci donnent à leur tour naissance aux précurseurs des DCs (pré-DCs) ainsi qu'aux DCs plasmacytoïdes (Figure 4). Une faible proportion de DCs peut aussi être dérivée de cellules lymphoïdes progénitrices (CLPs) (106). Cependant, la contribution précise des CMPs et des CLPs aux populations de DCs est encore aujourd'hui source de débat (101), mais celles-ci semblent pouvoir produire de façon redondante plusieurs sous-types de DCs (107).

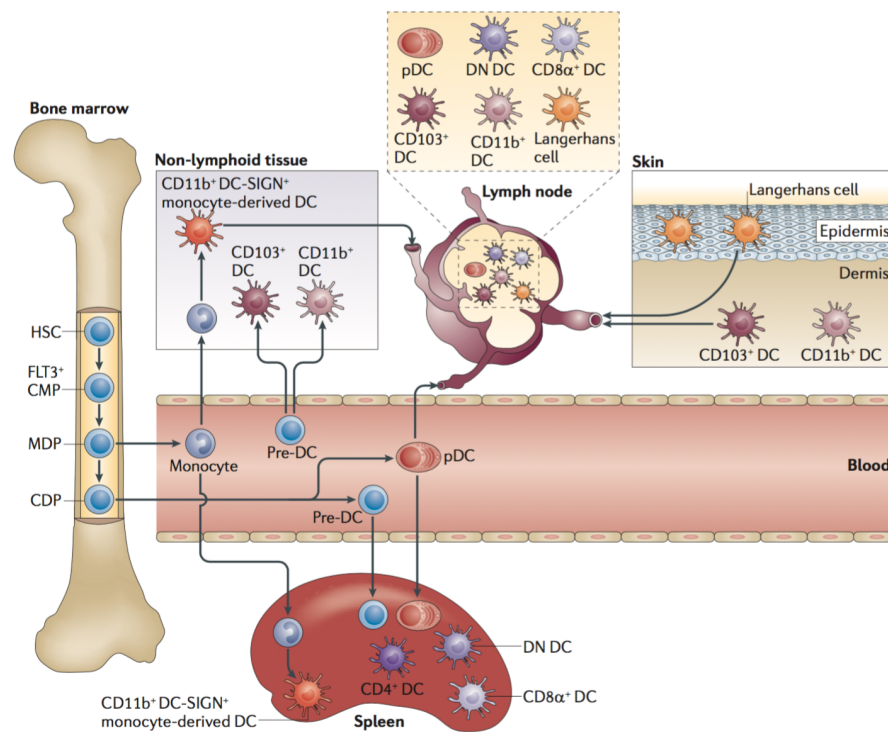


Figure 4. Différenciation et transit des sous-types de cellules dendritiques (DCs). Les DCs peuvent être retrouvées dans différents compartiments selon leur stade de développement. De façon simplifiée, on retrouve les cellules progénitrices dans la moelle osseuse ; les précurseurs dans le sang et la lymphe ; les DCs immatures et matures dans les tissus et/ou les organes lymphoïdes secondaires. Les DCs résidentes des tissus lymphoïdes comprennent les DCs DN, CD4⁺ ou CD8α⁺. Les DCs migratoires comprennent les DCs CD103⁺, CD11b⁺ et de Langerhans. *HSC* : cellules souches hématopoïétiques; *CMP* : cellules myéloïdes progénitrices; *MDP* : progéniteurs des macrophages et des DCs; *CDP* : cellules progénitrices communes des DCs; *pDC* : DCs plasmacytoïdes; *DN DC* : DC CD4⁺CD8α⁻. Reproduit avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : [Nature Reviews Immunology], de Belz *et al.* (106), copyright (2012).

L'exposition à certains facteurs joue un rôle clé dans la différenciation des MDPs et des CDPs (Figure 5) (107). Plus particulièrement, l'ajout de facteur stimulant de colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF) à des cultures de monocytes ou de précurseurs de la moelle osseuse conduit à une forte différenciation en DCs (105) qui expriment de façon plus ou moins homogène le MHC-II : cellules MHC-II^{low/interm} et MHC-II^{high} (108, 109). En fait, un article paru récemment a révélé que la population CD11c⁺MHC-II⁺ de cellules de la moelle osseuse différenciées à l'aide de GM-CSF comprenaient à la fois des DCs dérivées des CDPs et des macrophages dérivés des monocytes. Bien que la maturation de ces deux types cellulaires puisse être induite avec un lipopolysaccharide (LPS), ceux-ci développeraient des propriétés fonctionnelles différentes (109). Par conséquent, l'hétérogénéité des cellules primaires obtenues par ce protocole de différenciation *in vitro* doit être considérée dans l'analyse des études réalisées (109).

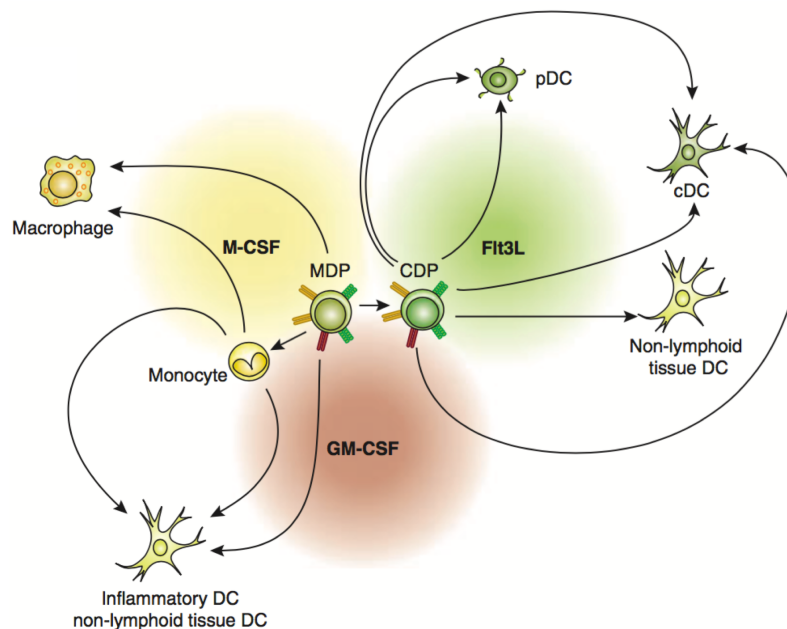


Figure 5. Influence de différents facteurs sur la différenciation des progéniteurs de cellules dendritiques (DCs). Le M-CSF oriente le développement des MDPs en macrophages, tandis que le GM-CSF conduit à leur différenciation en DCs inflammatoires dérivées (ou non) de monocytes. Le Flt3L induit la différenciation des CDPs en pDCs, cDCs ou DCs non-résidentes des tissus lymphoïdes. (*G*)M-CSF : facteur stimulant de colonies de (granulocytes) et de macrophages; Flt3L : ligand de tyrosine kinase 3 analogue à Fms; MDP : progéniteurs des macrophages et des DCs; CDP : cellules progénitrices communes des DCs; pDC : DCs plasmacytoïdes; cDC : DCs conventionnelles.

Reproduit avec la permission de John Wiley and Sons Inc : [Immunological Reviews], de Schmid *et al.* (107), copyright (2010).

2.1.1.2 Sous-types de DCs murines

Quatre principaux sous-types spécialisés de DCs ont été décrits chez la souris : 1) les DCs conventionnelles ou classiques (cDCs) qui prédominent à l'état d'équilibre et sont spécialisées dans l'apprêtement et la présentation antigénique aux T CD4⁺; 2) les DCs plasmacytoïdes (pDCs) qui sont responsables de la sécrétion d'importantes quantités d'IFN de type I lors d'infection virale, mais très peu efficaces en termes de présentation antigénique; 3) les cellules de Langerhans (LCs) qui résident dans la peau et migrent aux nœuds lymphatiques pour présenter l'antigène, mais qui sont dérivées d'un précurseur myélomonocytaire de la peau; 4) les DCs dérivées des monocytes qui sont induites en réponse à l'inflammation et pourraient potentiellement constituer un réservoir d'APCs utiles en situation d'urgence (101, 106). Étant donné le rôle clé des cDCs dans la présentation antigénique aux T CD4⁺, ce sous-type cellulaire sera développé plus en détails ci-dessous.

Les cDCs sont spécialisées dans l'apprêtement et la présentation des antigènes. Elles sont dotées d'une forte activité endocytaire à l'état immature et d'une forte capacité de production de cytokines après leur maturation. Elles régulent les réponses des lymphocytes T autant à l'état d'équilibre qu'au cours d'une infection (101, 106, 110). Ces cellules ont une courte demi-vie d'approximativement trois à cinq jours et sont continuellement renouvelées à partir des précurseurs de la moelle osseuse (101). Les cDCs peuvent être subdivisées en DCs migratoires et DCs résidentes des tissus lymphoïdes selon leur localisation tissulaire (Figure 4) (106). Les DCs migratoires se développent dans les tissus périphériques où elles agissent comme des sentinelles détectant et capturant des antigènes. Puis, une fois matures, elles migrent aux nœuds lymphatiques régionaux via les vaisseaux lymphatiques afférents ou les veinules à endothélium épais pour présenter les antigènes aux T CD4⁺ (104, 110, 111). Contrairement aux DCs migratoires, les DCs résidentes des tissus lymphoïdes peuvent être retrouvées non seulement dans les nœuds lymphatiques, mais également dans la rate et le thymus. Cette localisation privilégiée leur permet de rencontrer les antigènes transportés dans le sang. Ces DCs résidentes peuvent être sous-classifiées selon l'expression des marqueurs de surface CD4 et CD8 α et leur habilité de présentation antigénique (106) : il semble que les cDCs CD8 α ⁻ soient les APCs les plus efficaces dans la présentation des antigènes aux T CD4⁺

via le MHC-II (112). Il est intéressant de noter que les DCs générées *in vitro* à partir de précurseurs de la moelle osseuse différenciés avec du GM-CSF sont CD4⁺CD8α⁻ (113, 114), tandis que les DCs résidant dans la rate peuvent être CD4⁻CD8α⁻, CD4⁺ et CD8α⁺ (106).

2.1.1.3 Maturation et activation des DCs

Les cDCs se caractérisent à l'état immature par une forte capacité endocytique ainsi que par une faible expression du MHC-II et des molécules de costimulation CD80, CD86 et CD40 (115-117). Lors d'une infection, la maturation des DCs peut survenir de deux façons : 1) directe via la reconnaissance de motifs moléculaires associés au pathogène (PAMPs) par les TLRs et les récepteurs à endocytose notamment, ou 2) indirecte via la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux dommages cellulaires (DAMPs) tels que les médiateurs inflammatoires produits *in vivo* par la réponse innée (Figure 6) (97, 115, 117). Dans les deux cas, la reconnaissance du pathogène déclenche habituellement un programme de maturation chez la DC se traduisant par la hausse de l'expression en surface du MHC-II et des molécules de costimulation (115-117).

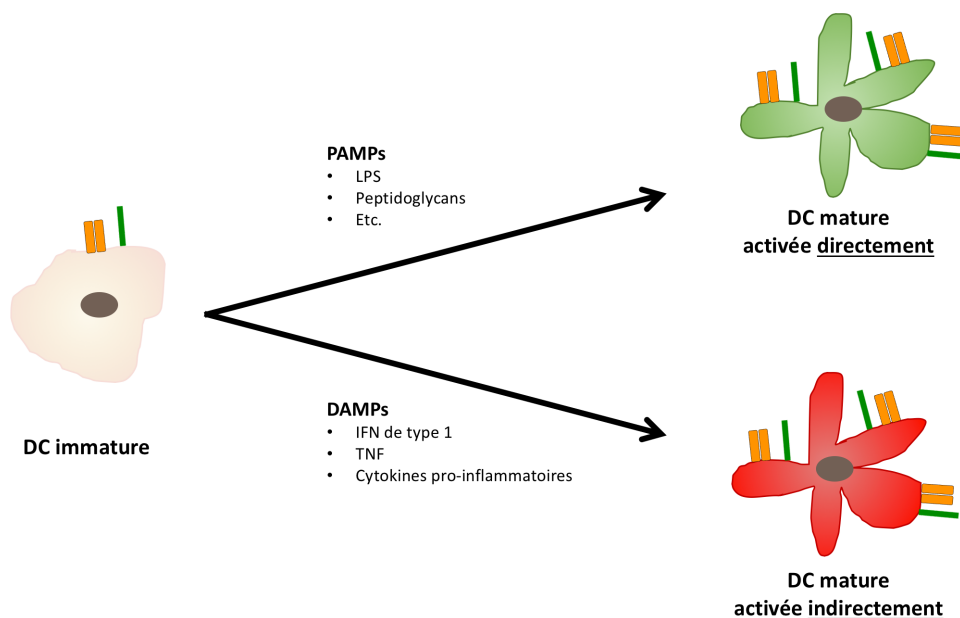


Figure 6. Stimuli conduisant à la maturation des cellules dendritiques (DCs) de façon directe ou indirecte. *PAMPs* : motifs moléculaires associés aux pathogènes; *DAMPs* : motifs moléculaires associés à des signaux de danger; *LPS* : lipopolysaccharide; *IFN* : interféron; *TNF* : facteur de nécrose tumorale; molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (en orange); molécules de costimulation (en vert).
Figure originale, Corinne Letendre (2016), données tirées de Vega-Ramos *et al.* (97).

Cependant, l'état « mature » de la DC ne semble pas suffisant pour définir une DC immunogénique. En effet, la capacité d'initier une réponse T effectrice dépend de l'état d'activation de la DC, un état caractérisé par sa capacité à produire des cytokines, particulièrement l'IL-12. Or, les DCs ayant subi un processus de maturation indirecte ne parviennent pas à fournir ce signal aux lymphocytes T (115, 117, 118). Ainsi, bien que ces DCs matures puissent induire une réponse proliférative marquée chez les lymphocytes T, ceux-ci ne développeront pas de véritables fonctions effectrices et l'initiation de la réponse adaptative sera compromise. Par conséquent, il semble que seules les DCs matures activées par reconnaissance directe du pathogène soient en mesure d'initier une réponse T effectrice (Figure 7) (115). Les signaux requis pour la pleine activation des T CD4⁺ seront développés davantage dans la section suivante.

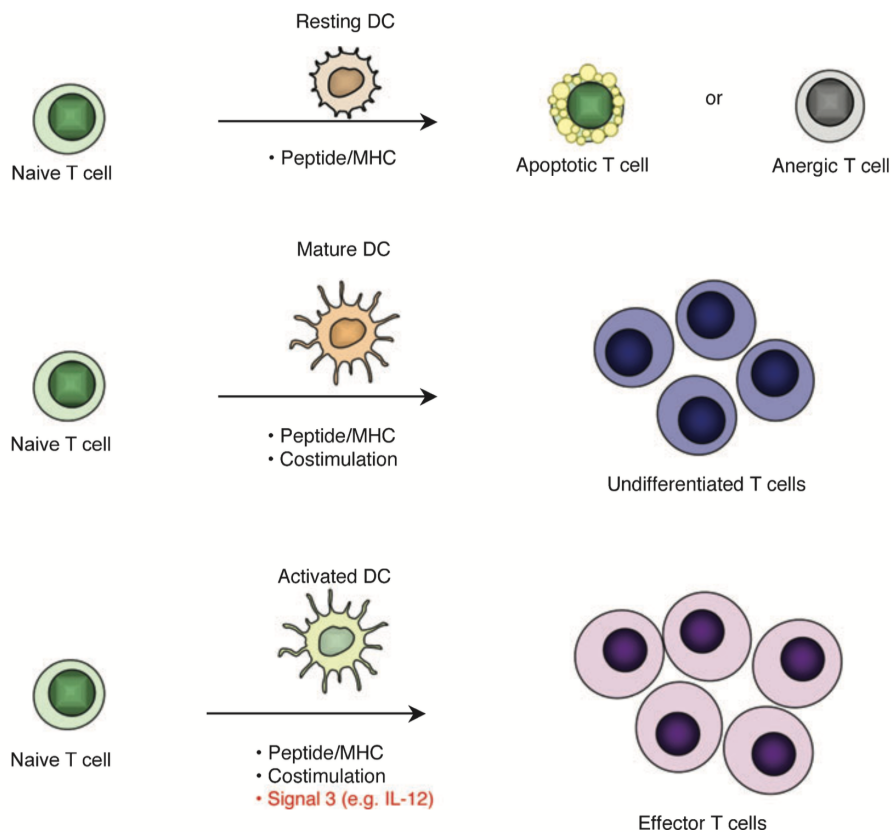


Figure 7. Réponse des lymphocytes T naïfs à la suite d'une stimulation par une cellule dendritique (DC).

La qualité de l'activation d'un lymphocyte T diffère selon l'état de la DC (état basal, mature ou activée). *MHC* : complexe majeur d'histocompatibilité; *IL-12* : interleukine-12.

Reproduit avec la permission de John Wiley and Sons Inc : [Immunological Reviews], de Joffre *et al.* (115), copyright (2009).

2.2 Lymphocytes T CD4⁺

Les lymphocytes T CD4⁺ quittent le thymus et entrent dans la circulation à l'état quiescent (phase G₀ du cycle cellulaire). Ces lymphocytes T naïfs sont matures, mais ils n'ont pas encore rencontré l'antigène pour lequel leur TCR est spécifique : seul un sur 10⁵ lymphocytes T naïfs sera spécifique pour un antigène donné (96). Les lymphocytes T naïfs recirculent donc constamment chaque 12 à 24 heures à travers le sang, la lymphe et les organes lymphoïdes secondaires à la recherche d'une APC exprimant un complexe peptide-MHC-II auquel ils peuvent se lier (96). Lorsque cela se produit, il y a formation d'une synapse immunologique à l'interface DC-lymphocyte T. Cette zone de contact est organisée dans le temps et dans l'espace et implique la ségrégation et le regroupement concentrique de protéines membranaires et de molécules cytosoliques (Figure 8) (119).

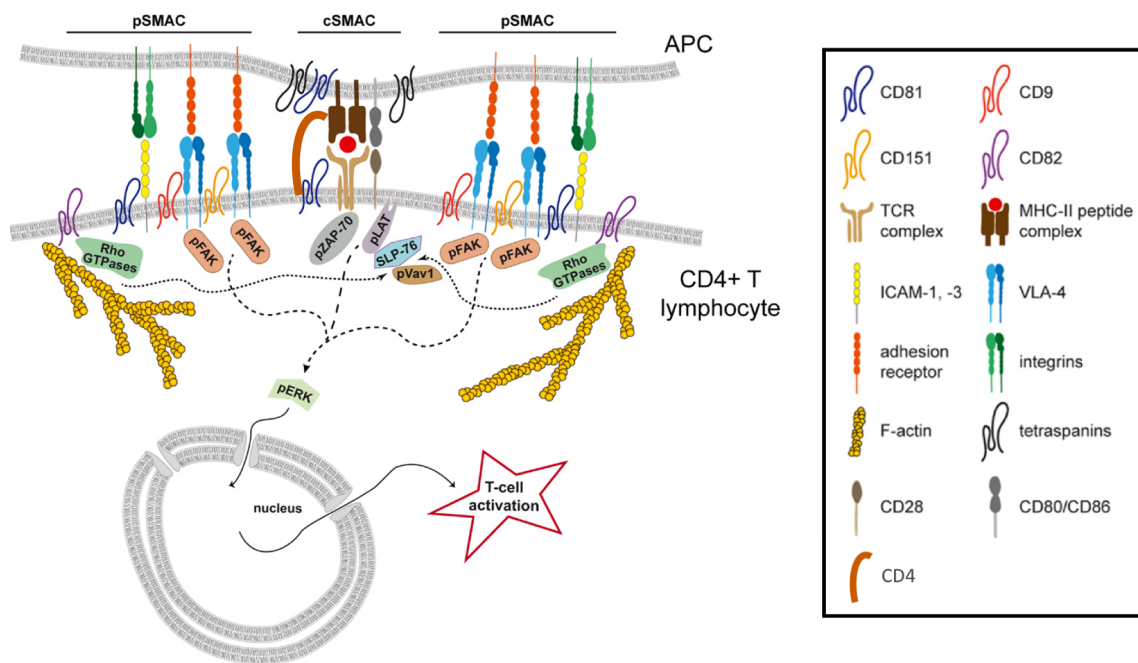


Figure 8. Synapse immunologique et voies de signalisation menant à l'activation du lymphocyte.

p,cSMAC : complexe d'activation supramoléculaire périphérique ou central; *APC* : cellule présentatrice d'antigène; *Rho GTPases* : protéines de la famille Rho (Ras homologue) clivant la guanosine triphosphate; *pFAK* : phosphorylation de la kinase d'adhésion focale; *pZAP-70* : phosphorylation de la protéine kinase 70 associée à la chaîne zeta; *pLAT* : phosphorylation de la protéine de liaison pour l'activation des lymphocytes T; *SLP-76* : protéine cytosolique des lymphocytes-2; *pVav1* : phosphorylation du proto-oncogène *Vav1*; *pERK* : phosphorylation des kinases régulées par un signal extracellulaire; *TCR* : récepteur du lymphocyte T; *ICAM-1,-3* : molécule d'adhésion intercellulaire-1,-3; *MHC-II* : complexe majeur d'histocompatibilité de classe II; *VLA-4* : antigène-4 d'activation très tardive.

Librement adapté sous licence CC BY de Frontiers Media Sa : [Frontiers in Immunology], de Rocha-Perugini et al. (120), copyright (2014). Le récepteur CD4 a été ajouté sur la figure.

La série d'évènements de signalisation initiés à la suite de la formation de la synapse immunologique altère les programmes génétiques du lymphocyte de façon à promouvoir la survie de ce dernier, son entrée dans le cycle cellulaire et sa différenciation en une variété de sous-types cellulaires effecteurs et mémoires qui coordonneront l'élimination du pathogène (96). Cette interaction entre l'APC et le lymphocyte T survient dans les organes lymphoïdes secondaires et dure typiquement de six à huit heures (91, 96).

2.2.1 Activation des lymphocytes T CD4⁺

Le premier signal d'activation du lymphocyte T CD4⁺ implique la reconnaissance d'un complexe peptide-MHC-II (pMHC-II) spécifique : parmi les 10⁵ pMHC présents à la surface d'une APC, seuls quelques-uns présentent le peptide reconnu par un TCR donné (94, 121). L'interaction entre le TCR et le pMHC-II est consolidée au centre de la synapse (cSMAC) par l'action du corécepteur CD4 ainsi que par des molécules d'adhésion, en périphérie de la synapse (pSMAC) (Figure 8) (96). Ces interactions permettraient de réduire le nombre de peptides antigéniques requis pour l'activation du lymphocyte T et d'améliorer la production subséquente de cytokines par le lymphocyte (122, 123). L'ensemble de ces interactions constitue le premier signal à l'origine de l'initiation du programme d'activation du lymphocyte T (124). On observe alors notamment un remodelage du cytosquelette d'actine et de microtubules : le lymphocyte T prend une forme arrondie tout en étendant de larges pseudopodes et des lamellipodes vers l'APC (119, 125). Une hausse de l'expression et de l'activité des gènes impliqués dans la survie cellulaire (notamment *bcl-2*) ainsi que de la transcription des gènes codant pour l'IL-2 (un facteur stimulant la prolifération et la différenciation des lymphocytes) et la chaîne α (CD25) du récepteur à haute affinité pour l'IL-2 sont également observées chez le lymphocyte sous l'effet de ce premier signal (96).

Un deuxième signal d'activation est ensuite crucial pour l'expansion clonale et la détermination du rôle du lymphocyte T spécifique (126). Tout comme le premier signal, il contribue à la hausse de l'expression des gènes impliqués dans la survie cellulaire et de ceux codant pour l'IL-2 et CD25 (96). La cosignalisation, qui survient au centre de la synapse, peut induire des signaux activateurs (notamment via l'interaction costimulatrice du CD28 du lymphocyte T avec les molécules CD80/CD86 exprimées par la DC) ou tolérogènes

(notamment via l'interaction coinhibitrice du CTLA-4 du lymphocyte T avec les molécules CD80/CD86 sur la DC) (121, 126). La nature de ce deuxième signal détermine donc la qualité des réponses subséquentes des lymphocytes T et promeut l'immunité ou la tolérance (121). De plus, si le lymphocyte ne reçoit pas ce deuxième signal, il entrera en anergie et ne répondra plus aux stimulations subséquentes, et ce, malgré une avidité importante associée à toutes les autres interactions intercellulaires du premier signal (96). Le lymphocyte pourrait également entrer en apoptose en absence de costimulation suffisante (Figure 7) (104).

Enfin, le troisième signal d'activation est généré par les cytokines inflammatoires produites par l'APC ou les autres cellules présentes au site d'activation du lymphocyte : il s'agit de la polarisation (121, 127, 128). Il faut souligner ici que la « décision » de conduire la réponse immune dans une certaine direction ne dépend pas d'un seul signal, mais plutôt de différents éléments qui agissent en synergie, en antagonisme et via des boucles de rétrocontrôle positif (129). Un à deux jours suivant son interaction activatrice avec la DC, le lymphocyte T CD4⁺ naïf augmente de taille et devient un blastocyte qui entreprend plusieurs cycles de division cellulaire (jusqu'à deux à trois fois par jour pendant quatre à cinq jours), principalement sous l'effet de la liaison de l'IL-2 à son récepteur (96). Des clones spécifiques de lymphocytes reconnaissant le même pMHC-II sont ainsi produits (129). Cette prolifération clonale est essentielle afin de générer un nombre suffisant de T CD4⁺ en mesure d'aider à la fois les T CD8⁺ et les lymphocytes B (130). La plupart des cellules T CD4⁺ se différencient en cellules effectrices T helper qui pourront migrer au site de l'infection, mais quelques-unes se différencient en cellules mémoires qui seront activées en cas de réexposition à l'antigène (104, 130-132). Ces différents sous-types seront présentés succinctement dans les sections suivantes.

2.2.2 Différenciation en lymphocytes T CD4⁺ effecteurs

Les lymphocytes T helper recrutent et activent les autres cellules immunitaires incluant les lymphocytes B et T CD8⁺, les macrophages, les mastocytes, les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles (133). De façon générale, les principaux sous-types de lymphocytes Th sont caractérisées par un *patron de cytokines polarisantes* qui induisent l'expression d'un *gène régulateur « maître »* régulant à son tour l'expression d'un *patron de cytokines effectrices* (96). Ainsi, les lymphocytes Th différenciés à partir de lymphocytes T

CD4⁺ naïfs sont généralement classifiés en cinq sous-types : Th1, Th2, Th17, T régulateurs induits (iTreg) et folliculaires (Tfh) (96, 126). D'autres sous-types existent également, mais pour le moment, ceux-ci sont davantage considérés comme des variantes développementales ou fonctionnelles des sous-types déjà décrits (96, 133). En effet, tous les sous-types Th sont dotés d'une grande hétérogénéité et plasticité (133, 134). De plus, la régulation croisée via la sécrétion de cytokines par un sous-type afin d'améliorer sa différenciation et son expansion tout en inhibant celles des autres est bien connue, plus particulièrement pour les paires Th1 et Th2 ainsi que Th17 et Treg (96).

Bien que les patrons de cytokines et les facteurs de transcription dirigeant la différenciation des lymphocytes Th soient de mieux en mieux caractérisés, certains éléments ne font pas encore l'unanimité dans la littérature (96, 127, 129, 133-135). Néanmoins, la Figure 9 semble fournir la meilleure synthèse des connaissances actuelles des caractéristiques des différents sous-types Th. Dans le cas d'une réponse contre un pathogène bactérien extracellulaire, la sécrétion ou le manque de sécrétion d'IL-12 par la DC apparaît déterminante dans la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en Th1 ou Th2, respectivement (104). Bien que les lymphocytes Th2 soient les principaux responsables du développement de la réponse humorale et que les Th1 soient principalement associés à l'immunité à médiation cellulaire (135), les deux types de lymphocytes Th peuvent induire la production d'anticorps. Cependant, les sous-classes d'immunoglobulines produites diffèrent dans leur rôle protecteur selon le type de réponse Th (2). En effet, les IgG de type 1 (IgG2b, IgG2c et IgG3 chez la souris) sont associées aux réponses Th1 dominées par l'IFN- γ et sont particulièrement efficaces pour médier la lyse bactérienne via l'activation de la cascade du complément à la surface du pathogène (opsonolyse) ou pour favoriser l'opsonophagocytose bactérienne chez la souris. En revanche, les IgG de type 2 (IgG1 chez la souris) induites lors des réponses Th2 dominées par l'IL-4 ont habituellement un rôle moins protecteur (2).

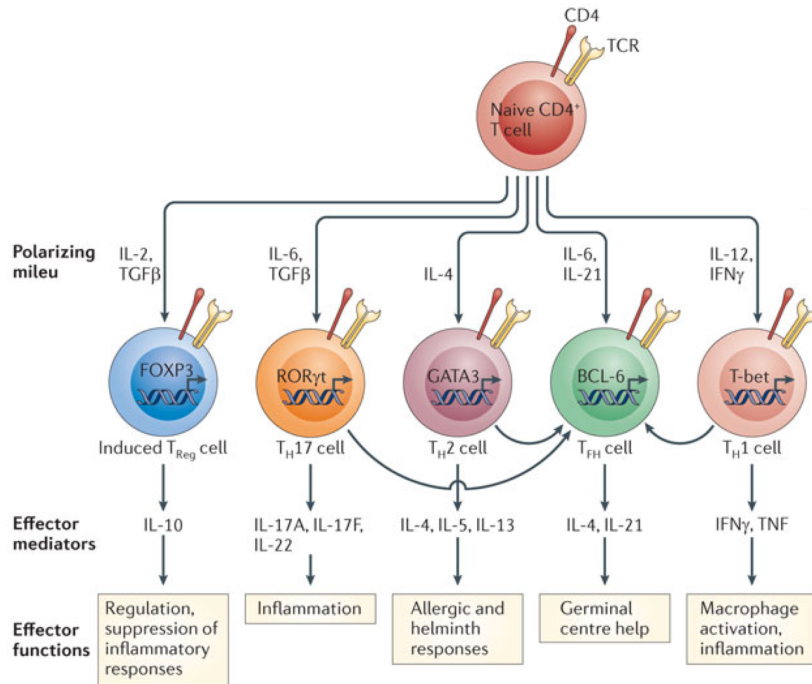


Figure 9. Différenciation et fonctions générales des principaux sous-types de lymphocytes T helper (T_H).

TCR : récepteur du lymphocyte T; *IL-* : interleukine; *TGFβ* : Facteur de croissance transformant β; *IFNγ* : interféron-γ; *T_{Reg}* : lymphocyte T régulateur; *T_{FH}* : lymphocyte T helper folliculaire.

Adapté avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : [Nature Reviews Immunology], de Swain *et al.* (136), copyright (2012). Les $T\ CD4^+$ cytolytiques, principalement retrouvés dans le contexte des infections virales, ont été retirés ici afin d'alléger la figure.

2.2.3 Différenciation en lymphocytes $T\ CD4^+$ mémoires

Les lymphocytes $T\ CD4^+$ effecteurs sont essentiels pour la génération de lymphocytes B et $T\ CD8^+$ pleinement fonctionnels : il en va de même lors de la réexposition à l'antigène (130). Les $T\ CD4^+$ mémoires ont la capacité d'être activés par de plus faibles niveaux de pMHC-II et de signaux de co-stimulation que les $T\ CD4^+$ naïfs. De plus, la prolifération des $T\ CD4^+$ mémoires est modeste, mais elle induit une réponse effectrice supérieure (130).

De nombreux modèles, vraisemblablement complémentaires, ont été proposés pour expliquer la génération des lymphocytes $T\ CD4^+$ mémoires (96, 130). D'abord, une interaction forte et durable entre le TCR et le pMHC-II (donc une grande affinité du TCR pour l'antigène) semble être un facteur déterminant dans l'orientation du lymphocyte vers un profil mémoire (104, 130, 137). Cependant, certains auteurs suggèrent que les lymphocytes $T\ CD4^+$ mémoires puissent être générés, tout comme les $T\ CD8^+$ mémoires, par division cellulaire asymétrique,

un phénomène indépendant de l'affinité du TCR où les deux cellules filles reçoivent un bagage différent et poursuivent une voie de différenciation distincte, soit effectrice ou mémoire (96, 130). Néanmoins, il est clair que les lymphocytes T CD4⁺ mémoires peuvent être générés à partir de cellules effectrices ayant été différenciées au cours de la réponse primaire (130, 138). Des cellules mémoires pourraient d'ailleurs émerger aussi tôt que trois jours après une infection primaire (96).

Bien que la caractérisation phénotypique des lymphocytes T CD4⁺ mémoires ne soit pas encore définitivement établie, les marqueurs CD44 et IL-7R α sont habituellement utilisés (139). En effet, l'expression du récepteur de l'IL-7 sur des T CD4⁺ activés (CD44^{high}) est corrélée avec la survie cellulaire (130, 139). De plus, le récepteur de localisation (« homing receptor ») CD62L permet de subdiviser davantage la population T CD4⁺ mémoire en cellules mémoires centrales (CD62L⁺) et mémoires effectrices (CD62L⁻) (96, 139). Les cellules mémoires centrales résident essentiellement dans les tissus lymphoïdes secondaires, notamment la rate, et sont en mesure de proliférer rapidement et de se différencier en sous-types effecteurs lorsqu'elles rencontrent l'antigène contre lequel elles sont spécifiques (96, 138). Les cellules mémoires effectrices, quant à elles, voyagent dans les tissus périphériques et disposent déjà de fonctions effectrices : elles constituent donc la première ligne de défense dans l'éventualité où leur antigène spécifique serait intercepté (96, 138).

2.3. Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (MHC-II)

Tel que mentionné précédemment, la connexion entre l'immunité innée et l'immunité adaptative est grandement tributaire des interactions survenant entre les DCs et les lymphocytes T CD4⁺ et, plus particulièrement, de la présentation antigénique sur les molécules du MHC-II. La structure et les fonctions de ces molécules seront donc détaillées dans la section suivante.

Historiquement, le complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) doit son nom au fait que les gènes de ce locus encodent des protéines déterminantes dans l'acceptation ou le rejet d'une greffe tissulaire. Les molécules du MHC, exprimées à la surface de différentes cellules, agissent en fait comme des supports présentant des fragments antigéniques aux lymphocytes T (96). Il existe différentes protéines du MHC et plusieurs allèles pour la plupart des gènes

encodant ces protéines. Les fragments antigéniques pouvant être liés par ces protéines, puis présentés aux lymphocytes T, peuvent donc varier entre les individus. Ainsi, les allèles du MHC hérités par un individu peuvent jouer un rôle dans sa capacité à reconnaître un pathogène et à combattre l'infection (96).

Le MHC est relativement bien caractérisé chez l'humain et la souris, chez qui il est connu sous le nom de « complexe antigène leucocytaire humain » et « complexe H2 », respectivement (96). On observe actuellement un engouement pour la caractérisation du « complexe antigène leucocytaire porcine », avec l'espoir évident d'identifier des gènes de résistance contre des maladies dommageables pour l'industrie porcine (140, 141).

Les gènes du MHC sont organisés en régions encodant trois classes de molécules : MHC-I, MHC-II et MHC-III. Alors que les molécules du MHC-I et du MHC-II sont très similaires autant sur les plans structurel que fonctionnel, les protéines du MHC-III ne leur sont pas reliées et comprennent des composantes du système du complément et des molécules impliquées dans l'inflammation (96). Les molécules du MHC-I sont exprimées à la surface de presque toutes les cellules nucléées et leur principale fonction est de présenter les antigènes peptidiques endogènes (générés à l'intérieur de la cellule) aux T CD8⁺. Quant aux molécules du MHC-II, elles sont exprimées essentiellement par les APCs et présentent les antigènes peptidiques exogènes (dérivés de l'environnement extracellulaire) aux T CD4⁺ (142).

2.3.1 Structure et fonctions des molécules classiques du MHC-II

Le MHC-II comprend une variété de molécules classiques et non classiques. Les molécules classiques du MHC-II sont caractérisées par leur capacité à lier des peptides ainsi que par leur polymorphisme marqué, contrairement aux molécules non-classiques qui présentent globalement les caractéristiques inverses (143). En effet, ces dernières agissent plutôt à titre de protéines chaperons et accessoires facilitant le repliement des protéines, le transport, le chargement des peptides antigéniques sur le sillon des molécules classiques ainsi que l'édition des peptides (144).

Il existe trois molécules classiques du MHC-II chez l'homme, coexprimées dans la membrane plasmique : DP, DQ et DR (145). Les souris expriment des protéines orthologues

aux deux dernières seulement, I-A et I-E, respectivement (146, 147). Chacune de ces molécules isotypiques du MHC-II est un hétérodimère composé de glycoprotéines transmembranaires, soit une chaîne α (32 kDa) et une chaîne β (29 kDa), associées par des interactions non-covalentes (96, 143, 146). Les chaînes α et β des molécules classiques du MHC-II ont la même conformation générale, soit deux domaines extracellulaires α_1 et α_2 , et β_1 et β_2 , respectivement (146). Les domaines distaux à la membrane (α_1 et β_1) se combinent pour former le sillon de liaison des peptides antigéniques (143, 146-148). Quant aux régions proximales à la membrane (α_2 et β_2), elles correspondent à des domaines de type immunoglobuline (Figure 10) (143).

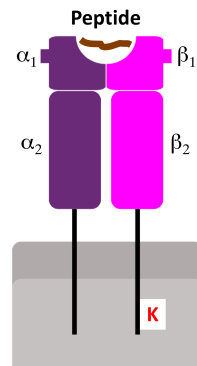


Figure 10. Structure d'une molécule classique du MHC-II. Les isotypes des molécules classiques du MHC-II sont des hétérodimères composés d'une chaîne α et β . Les domaines α_1 et β_1 se combinent pour former le sillon de liaison du peptide antigénique. Les domaines α_2 et β_2 correspondent aux portions adjacentes à la membrane. *MHC* : complexe majeur d'histocompatibilité; *K* : site d'ubiquitination du MHC-II. Librement adapté sous licence CC BY [en.wikipedia], de atropos235, copyright (2007). Le peptide ainsi que le site d'ubiquitination du MHC-II (K) ont été ajoutés sur la figure.

Les différentes variantes alléliques des isotypes des molécules classiques du MHC-II ont chacune la capacité de lier un répertoire d'environ 10^4 peptides (147). De plus, certains peptides peuvent se lier à différentes molécules du MHC-II (96). En effet, les peptides liés peuvent faire protrusion aux deux extrémités du sillon, ce qui permet d'accommoder des peptides de taille variable. Il a d'ailleurs été démontré que les protéines du MHC-II pouvaient lier aussi bien des peptides de deux acides aminés que des protéines non-dépliées de pleine longueur. Néanmoins, la majorité des peptides naturellement liés comprennent entre 13 et 25 acides aminés (143). Il semble que le peptide soit lié au sillon du MHC-II via un réseau de liens hydrogène ainsi que par l'insertion de ses chaînes latérales dans des pochettes tapissées

de résidus hautement polymorphiques : le peptide serait ainsi lié à la fois de manière indépendante et dépendante de sa séquence peptidique (143, 147, 149). Enfin, il a été suggéré que les acides aminés centraux du peptide soient déterminants dans ses capacités de liaison, mais que les acides aminés s'étendant à l'extérieur du sillon puissent interagir avec des protéines membranaires adjacentes. Ceux-ci pourraient aussi, potentiellement, affecter la reconnaissance antigénique par les lymphocytes T CD4⁺ (149).

2.3.2 Voie exogène de la présentation antigénique

Les peptides présentés sur les molécules du MHC-II sont dérivés, de façon générale, de protéines dégradées par la voie exogène (150). Il faut entre une et trois heures à un antigène pour traverser cette voie et apparaître à la surface cellulaire sous la forme de complexes pMHC-II (96).

2.3.2.1 Capture de l'antigène et protéolyse

Chez les DCs, l'internalisation des antigènes exogènes peut se produire via trois principaux modes de capture/endocytose : la phagocytose, l'endocytose via des récepteurs et la macropinocytose (Figure 11) (142, 151). Alors que les DCs immatures démontrent une activité endocytique élevée via ces trois modes, cette activité est rapidement régulée à la baisse après l'activation cellulaire, limitant ainsi l'internalisation subséquente de nouveaux antigènes chez les DCs matures (116, 117, 152). Premièrement, la phagocytose permet l'internalisation d'une grande variété d'antigènes insolubles de plus ou moins grande taille, grâce à la formation de pseudopodes membranaires (96, 151). Elle est habituellement initiée par la liaison de particules opsonisées sur les récepteurs de surface de la DC, mais elle peut également survenir de façon non-spécifique (151). Un pathogène ainsi engouffré se retrouve alors dans un phagosome où le microenvironnement contenant des dérivés réactifs de l'oxygène, des protéases et des agents antimicrobiens favorisent sa destruction (142). Au cours de leur processus de maturation, les phagosomes peuvent échanger du matériel avec les lysosomes et les endosomes précoces (153), avant que leur contenu ne soit ultimement dirigé vers le compartiment endosomal tardif multivésiculaire aussi appelé « compartiment du MHC-II » (MIIC) (142, 151). Deuxièmement, l'endocytose via des récepteurs permet

l'internalisation de petites molécules solubles via leur liaison sur une variété de récepteurs à la surface des DCs (notamment des lectines, récepteurs Fc et récepteurs du complément). Ces antigènes sont ensuite internalisés dans de petites vésicules (0,1 μm) enrobées (ou non) de clathrine, puis délivrés dans les endosomes précoces et le MIIC (142, 151, 154). Quant aux récepteurs, ils peuvent être recyclés lorsque les compartiments se fusionnent à nouveau avec la membrane plasmatique (96). Troisièmement, la macropinocytose est un important processus de capture antigénique présent de manière constitutive chez les DCs qui leur permet de capturer de grandes quantités de matériel extracellulaire soluble de manière non-spécifique. Le matériel est capturé via le froissement de la membrane plasmatique, puis il se retrouve dans des vésicules de grande taille (0,2-5 μm) appelées macropinosomes (142, 151). Ces vésicules sont distinctes des autres types de compartiments endosomaux, mais fusionnent également avec les endosomes précoces et le MIIC (151).

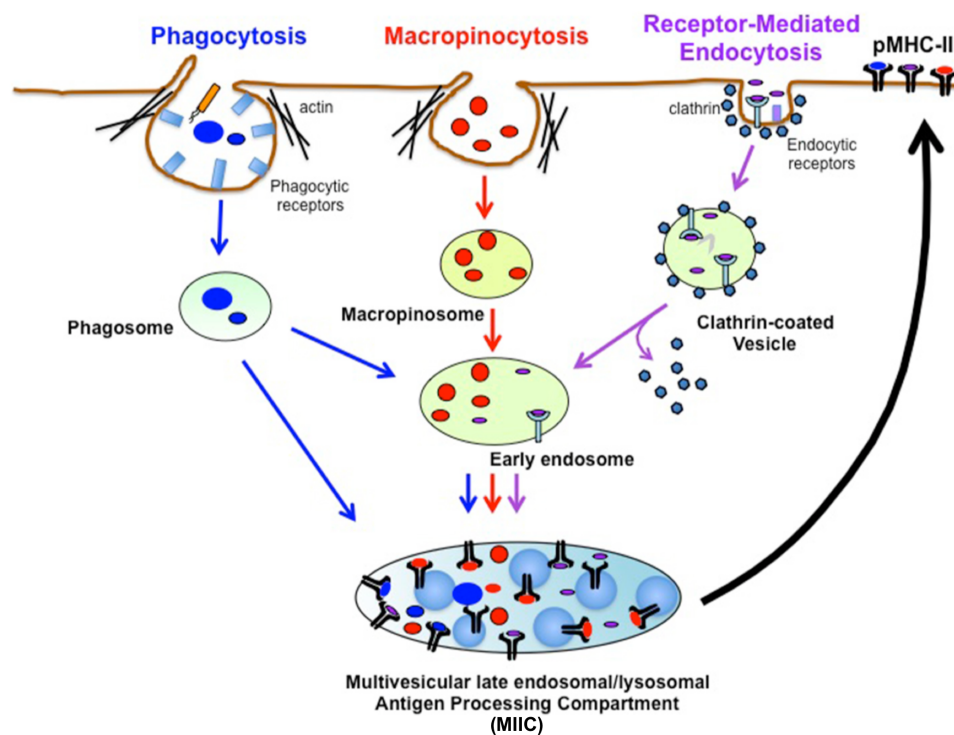


Figure 11. Voies d'endocytose des antigènes exogènes chez les cellules dendritiques (DCs). Les antigènes exogènes peuvent être capturés par phagocytose (bleu), macropinocytose (rouge) ou endocytose via des récepteurs (mauve). Peu importe le mode de capture initial, les antigènes sont ultimement dirigés vers le compartiment endosomal tardif multivésiculaire (MIIC). *MHC-II* : complexe majeur d'histocompatibilité de classe II; *pMHC-II* : complexes peptide-MHC-II; *MIIC* : compartiment du MHC-II. Librement adapté sous licence CC BY de Frontiers Media Sa : [Frontiers in Physiology], de Liu *et al.* (151), copyright (2015). Le terme « MIIC » a été ajouté sur la figure.

Au cours de leur progression à travers les différents compartiments endosomaux, les antigènes internalisés sont confrontés à des enzymes hydrolytiques et à un pH acide : endosomes précoces (pH 6.0 à 6.5), endosomes tardifs (pH 4.5 à 5.0) et lysosomes (pH 4.5) (96). Les antigènes entrent aussi éventuellement en contact avec la thiolréductase lysosomale induite par l'interféron- γ (GILT). Cette enzyme non-protéolytique réduit les ponts disulfures de la protéine : en plus de faciliter le travail des protéases (cathepsines), cela permettrait d'exposer des épitopes enfouis pouvant lier le MHC-II (142, 155). En effet, la GILT et les protéases sont essentielles à la génération d'épitopes antigéniques. Toutefois, ceux-ci pouvant être détruits par une activité protéolytique trop intense, les compartiments endosomaux de la DC possèdent un contenu limité en protéases et une acidité modérée afin de préserver l'information pour la présentation antigénique (100, 142). Il est intéressant de noter que la dégradation des antigènes est retardée chez les DCs immatures, ce qui permet potentiellement d'entreposer et de présenter des antigènes sur des périodes prolongées (150).

2.3.2.2 Synthèse *de novo* des molécules du MHC-II

La transcription des gènes du MHC-II (et donc la synthèse de nouvelles molécules du MHC-II) est régulée par le transactivateur de classe II (CIITA) (156, 157). Bien que CIITA ne lie pas l'ADN directement, il agit comme activateur transcriptionnel et comme facteur général de transcription du MHC-II (157). Chez les DCs, CIITA est ainsi impliqué à la fois dans l'expression constitutive du MHC-II et dans celle induite par l'IFN- γ (Figure 12) (156, 158, 159). L'expression de CIITA peut toutefois être bloquée sous l'effet de la liaison de différents agonistes des TLR (160). En effet, la régulation à la baisse de CIITA chez les DCs ayant subi une maturation lors d'exposition prolongée avec le LPS est bien connue (118, 159). Il est à noter cependant que cette régulation à la baisse de CIITA lors d'activation avec un ligand du TLR est précédée d'une hausse transitoire de l'expression de CIITA chez les DCs (118), bien que les mécanismes impliqués à ce niveau semblent peu compris. Néanmoins, cette cinétique d'expression de CIITA (hausse transitoire suivie d'une régulation à la baisse) rendrait la DC mature plus efficace dans l'activation des T CD4⁺, puisqu'elle privilégierait la présentation des peptides dérivés du pathogène capturé au moment de son activation (160, 161).

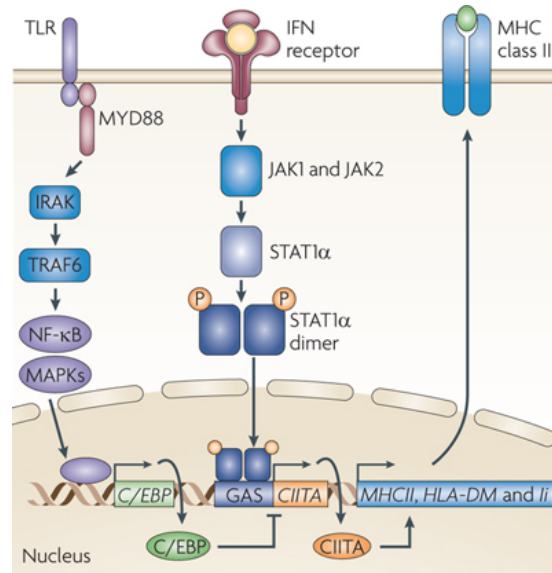


Figure 12. Régulation de l'expression du maître régulateur CIITA. L'expression des gènes du MHC-II et des autres gènes de la présentation antigénique est induite par l'IFN- γ , via l'expression de CIITA. La signalisation par les TLR entraîne l'inhibition de CIITA et, conséquemment, celle de la biosynthèse du MHC-II et des autres gènes associés. Schéma représentant les voies de signalisation décrites chez les macrophages. *TLR* : récepteur de type Toll; *MYD88* : protéine adaptatrice ou facteur de différenciation myéloïde 88; *IRAK* : kinase associée au récepteur de l'interleukine-1; *TRAF6* : facteur 6 associé au récepteur du facteur de nécrose tumorale; *NF- κ B* : facteur nucléaire κ B; *MAPKs* : protéines kinases activées par les mitogènes; *C/EBP* : protéine de liaison de l'amplificateur/CCAAT; *IFN* : interféron; *JAK1,2* : Janus kinase 1,2; *STAT1 α* : signal transducteur et activateur de transcription 1 α ; *GAS* : séquences activées par l'IFN- γ ; *CIITA* : transactivateur du MHC-II; *MHCII* : complexe majeur d'histocompatibilité de classe II; *HLA-DM* : molécule non-classique; *Ii* : chaîne invariable. Reproduit avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : [Nature Reviews Microbiology], de Harding *et al.* (161), copyright (2010).

Pour ajouter à la complexité de la régulation de CIITA chez les DCs, il semblerait que celle-ci dépende du processus de maturation subi par la DC. En effet, des publications récentes ont fait valoir que les DCs devenues matures de manière indirecte sous l'effet de médiateurs inflammatoires (comme l'IFN-I, le TNF et des cytokines pro-inflammatoires) ne régulent pas à la baisse leur expression de CIITA, contrairement à ce qui est observé chez les DCs exposées de façon prolongée à des ligands du TLR (Figure 13) (118, 160). Cette observation suggère donc un continuum, ou du moins une variété, de niveaux de maturation. En fait, il a été proposé que la signalisation via MyD88 (une protéine adaptatrice utilisée par presque tous les TLRs) induise une maturation complète et rapide de la DC, tandis que l'exposition à des médiateurs inflammatoires n'induirait qu'une maturation partielle où la DC conserverait sa capacité à synthétiser de nouvelles molécules du MHC-II (160). Cet état particulier de

maturation serait particulièrement pertinent dans l'éventualité où la DC serait exposée *in vivo* à des médiateurs inflammatoires avant sa rencontre avec le pathogène (117, 160). En effet, puisque la majorité des molécules du MHC-II utilisées pour la présentation antigénique proviennent de la synthèse *de novo* (117), il apparaît important que la DC préserve cette capacité après sa maturation partielle afin d'être en mesure de présenter les peptides dérivés du pathogène fournissant plus tard les stimuli requis pour sa maturation finale.

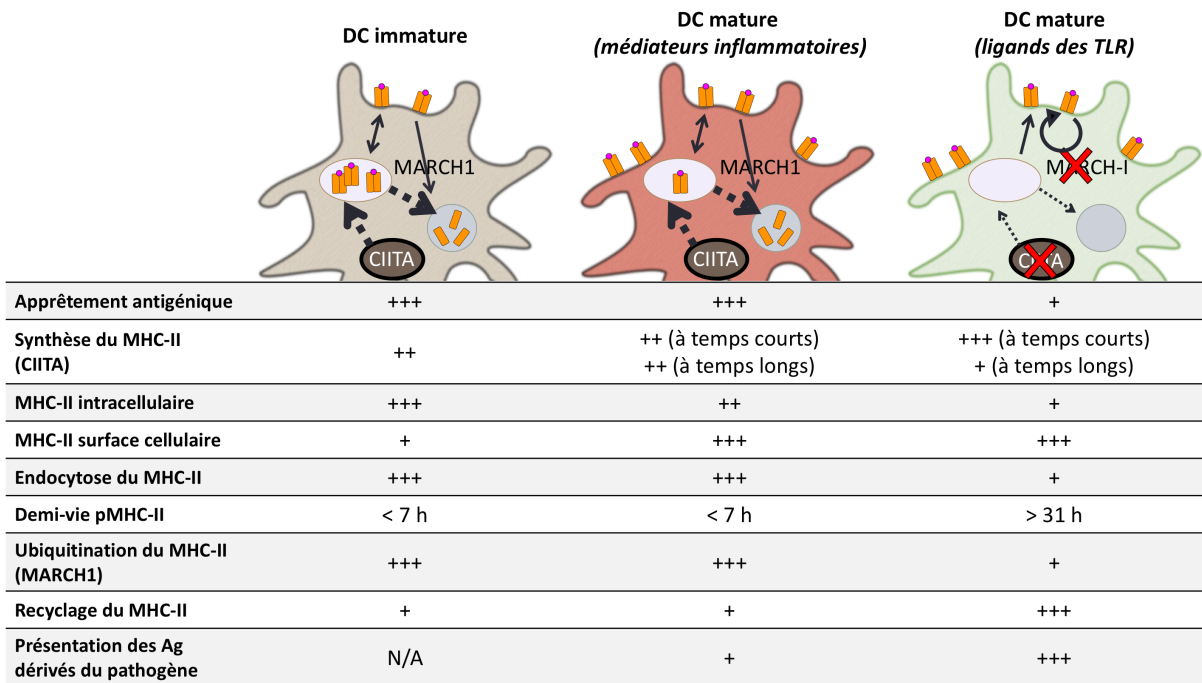


Figure 13. Différences de synthèse, dégradation, localisation et fonctions du MHC-II chez les cellules dendritiques (DCs) selon le signal à l'origine de leur maturation. Les DCs exposées à des médiateurs inflammatoires présentent des propriétés globalement similaires aux DCs immatures, puisqu'elles conservent leur capacité à capturer et apprêter de nouveaux antigènes. La capacité de présentation antigénique de ces DCs dont la maturation est dite « partielle » est toutefois limitée par rapport à celle des DCs exposées à des ligands des TLR. *MHC-II* : complexe majeur d'histocompatibilité de classe II; *TLR* : récepteur de type Toll; *CIITA* : transactivateur de classe II; *pMHC-II* : complexe peptide-MHC-II; *MARCH1* : ubiquitin ligase RING-CH-1 associée à la membrane; *Ag* : antigènes.
Figure originale, Corinne Letendre (2016), données tirées de Vega-Ramos *et al.* (118) et Simmons *et al.* (160).

La modulation de *Ciita* a été rapportée pour quelques pathogènes chez des macrophages. Par exemple, le bacille Calmette-Guérin (*Mycobacterium bovis*), un ligand du TLR-2, entraîne la production d'oxyde nitrique qui, via la protéine KLF4, supprime épigénétiquement l'expression de *Ciita* induite par l'IFN- γ (162). Une telle inhibition de

l'expression de CIITA et de la synthèse du MHC-II pourrait favoriser l'évasion immunitaire et faciliter la persistance du pathogène chez l'hôte (159).

2.3.2.3 Transport des molécules du MHC-II vers le MIIC

Sous le contrôle de CIITA, les protéines du MHC-II sont synthétisées et assemblées dans le réticulum endoplasmique (RE). Les protéines du MHC-I sont également synthétisées et assemblées à cet endroit (96, 150). Cependant, alors que le chargement peptidique des molécules du MHC-I se produit à l'intérieur du RE, celui des molécules du MHC-II survient plus tard, dans le MIIC. Par conséquent, afin de prévenir la liaison de peptides destinés à la voie du MHC-I, les molécules du MHC-II s'associent dans le RE avec une protéine chaperon appelée « chaîne invariable » (Ii) (96, 150). Pour ce faire, des hétérodimères $\alpha\beta$ du MHC-II lient un trimère de Ii sur leur sillon, formant ainsi préférentiellement un complexe nonamérique (156, 163, 164). Ce complexe MHC-II/Ii est ensuite dirigé vers le MIIC (Figure 14, étape 1). C'est là que les protéases dégradent Ii, jusqu'à ce qu'il ne reste plus qu'un petit fragment d'environ 20 résidus (CLIP) dans le sillon de liaison (Figure 14, étape 2) (142, 156).

En plus de prévenir la liaison de peptides endogènes dans le RE ainsi que l'agrégation des molécules du MHC-II, Ii joue un rôle clé dans le transport du MHC-II vers les compartiments endosomaux (96, 150, 156). En effet, en l'absence de Ii, les molécules du MHC-II demeurent principalement dans le RE et ne transitent pas plus loin que le cis-golgi (96). Ii contient dans sa queue cytoplasmique des séquences de signal reconnues par des protéines adaptatrices de la membrane plasmique ou du réseau trans-golgien (150). Chez les DCs immatures, la voie de transit via la membrane plasmique est privilégiée et cela se traduit par une grande proportion de complexes MHC-II/Ii d'abord exportés à la membrane plasmique avant d'être réinternalisés par endocytose à un rythme très élevé, pour finalement être dirigés vers le MIIC (Figure 14, étape 1) (116, 148, 150). Ainsi, plusieurs complexes MHC-II/Ii sont présents à la surface de la DC, simultanément à des molécules chargées d'un peptide antigénique (pMHC-II) (150). En revanche, chez les DCs matures, c'est le transport direct des complexes MHC-II/Ii vers le MIIC qui prédomine, parallèlement à la réduction de la capacité d'endocytose associée à la maturation de la DC (non illustré sur la Figure 14) (116, 150).

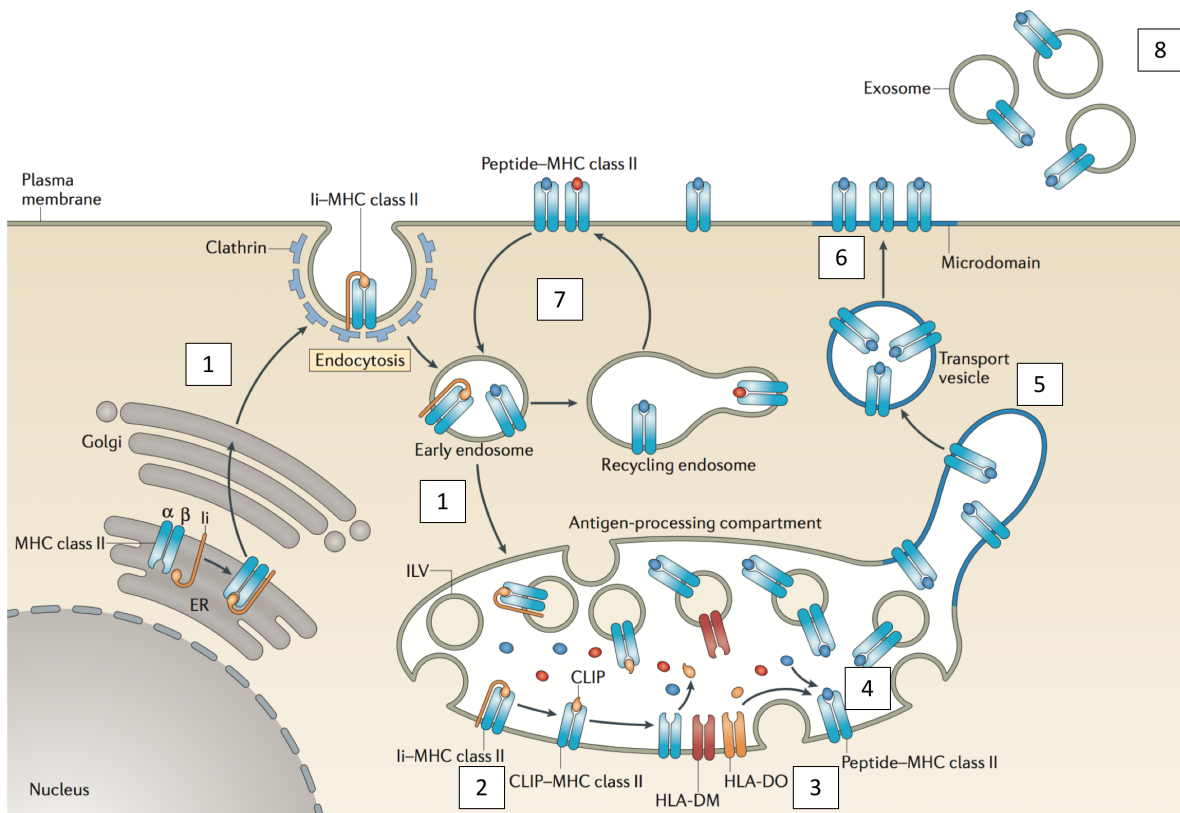


Figure 14. Transit du MHC-II dans la voie exogène de la présentation antigénique. Les complexes MHC-II/Ii nouvellement synthétisés sont transférés via l'appareil de Golgi vers la voie d'endocytose grâce à Ii [1]. Une fois dans le compartiment d'apprêtement antigénique (le MIIC), Ii est dégradée [2]. Le fragment de Ii restant dans le sillon du MHC-II (CLIP) est substitué par un peptide antigénique avec l'aide des molécules non-classiques (HLA-DM, -DO) [3]. Chez les DCs immatures, une fois Ii détachée, les molécules du MHC-II peuvent être ubiquitinées, ce qui favorise leur transit vers les ILVs [4], des vésicules destinées à la dégradation lysosomale. Chez les DCs matures exposées directement au pathogène, les pMHC-II nouvellement synthétisés ne sont plus ubiquitinés et sont plutôt redirigés du MIIC vers la membrane plasmatique via des extensions tubulaires [5]. Les pMHC-II sont ainsi insérés dans la membrane plasmatique sous forme de microdomaines [6], une organisation qui favorise potentiellement la présentation antigénique aux lymphocytes T CD4⁺. Une fois à la surface cellulaire, les pMHC-II non-ubiquitinés peuvent également être endocytés puis recyclés à la membrane plasmatique via des compartiments endosomaux précoces [7]. Alternativement, la fusion de la membrane limitante du MIIC avec la membrane plasmatique peut conduire à la relâche extracellulaire de pMHC-II via des exosomes [8]. *MHC-II* : complexe majeur d'histocompatibilité de classe II; *ER* : réticulum endoplasmique; *Ii* : chaîne invariable; *MIIC* : compartiment du MHC-II; *CLIP* : fragment associé à la chaîne invariable; *HLA-DM, -DO* : molécules non-classiques du MHC-II; *ILV* : vésicules intra-luminales; *pMHC-II* : complexes peptide-MHC-II. Adapté avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : [Nature Reviews Immunology], de Roche et Furuta (165), copyright (2015). Les chiffres de renvoi à la légende [] ont été ajoutés sur la figure.

L'expression de Ii est régulée positivement par CIITA ainsi que par l'activation de la voie du NF- κ B (156). De plus, il a été démontré récemment chez l'humain qu'une souche de *Escherichia coli* entérohémorragique possède un facteur de virulence capable de bloquer le transit des complexes MHC-II/Ii, du moins pour une isoforme de Ii (164).

2.3.2.4 Chargement peptidique du MHC-II dans le MIIC

Dans cette recension de la littérature, le MIIC fait référence au compartiment endosomal où se déroule le chargement peptidique du MHC-II : c'est là que les peptides issus de la dégradation du matériel extracellulaire capturé rencontrent les molécules classiques et non-classiques du MHC-II. Le MIIC n'est cependant pas un compartiment homogène et cet endosome tardif semble exister sous de multiples morphologies (multivésiculaire, mixte et multilamellaire) qui correspondraient possiblement à différents états de maturation (148, 150, 166). Le lieu exact de chargement peptidique des molécules du MHC-II est donc encore débattu (148, 150, 156, 167-169), mais l'échange du fragment CLIP contre un peptide antigénique sur le sillon des molécules du MHC-II (Figure 14, étape 3) semble pouvoir se produire autant dans des vésicules intraluminales (ILVs) qu'au niveau de la membrane limitante de l'endosome tardif (168). L'intervention des molécules non-classiques du MHC-II est requise pour l'échange peptidique. En favorisant la liaison de peptides de haute affinité sur le MHC-II, ces molécules éditrices jouent un rôle crucial dans la sélection des épitopes antigéniques immunodominants qui seront présentés aux lymphocytes T (142, 170, 171).

2.3.2.5 Devenir du complexe pMHC-II

Les DCs immatures sont bien connues pour leur fonction de sentinelles puisqu'elles capturent et présentent continuellement des peptides dérivés de protéines endogènes ou d'antigènes quelconques acquis par la voie exogène (148, 172, 173). Ainsi, tant que la cellule n'a pas été activée, il n'est pas nécessaire pour les complexes pMHC-II générés de se retrouver à la surface cellulaire de façon prolongée, car la présentation aux lymphocytes T CD4⁺ n'est pas requise à ce stade. Les complexes pMHC-II à la surface des DCs immatures sont donc renouvelés à un taux très rapide (« turnover »), et possèdent une courte demi-vie (moins de dix heures) : une grande proportion des pMHC-II se retrouvent conséquemment localisés au niveau intracellulaire, plus particulièrement dans les ILVs (Figure 14, étape 4) (116, 148, 160, 166, 172). En effet, à la suite du chargement peptidique, la queue cytoplasmique des molécules du MHC-II est ubiquitinée chez les DCs immatures (Figure 10, site K). Sous l'effet de cette modification post-traductionnelle, les pMHC-II sont alors redirigés vers les ILVs, vraisemblablement via le système de transport ESCRT (« endosomal

sorting complex required for transport »). Les complexes pMHC-II sont ensuite majoritairement exportés vers les lysosomes pour être dégradés, bien que certains complexes puissent momentanément s'échapper au niveau de la membrane plasmatique (non illustré sur la Figure 14) (148, 166, 174). L'ubiquitination des molécules du MHC-II est réalisée par des protéines de la famille MARCH (« membrane-associated RING-CH »), une famille qui regroupe près d'une douzaine d'ubiquitine ligases E3 ciblant d'importants éléments de la réponse immunitaire (175). MARCH1 est la principale ligase E3 responsable de l'ubiquitination des molécules du MHC-II et de CD86 chez les DCs et elle partage ces cibles avec MARCH8, le plus proche membre de sa famille (175, 176). En plus de son rôle dans le transit intracellulaire du MHC-II, l'ubiquitination par ces protéines serait impliquée dans la promotion de la production de cytokines inflammatoires en réponse aux ligands du TLR chez les DCs ainsi que dans la potentialisation de la capacité des DCs à activer des lymphocytes T CD4⁺ naïfs spécifiques en présence d'une faible quantité d'antigènes présentés à la surface (173).

En revanche, chez les DCs matures prêtes à présenter des antigènes aux lymphocytes T CD4⁺, le réservoir intracellulaire de complexes pMHC-II est nettement réduit au profit de l'exportation des complexes vers la membrane plasmatique (116, 148, 160, 166, 172, 177). En effet, les complexes pMHC-II s'accumulent et persistent à la surface cellulaire avec un taux de renouvellement inférieur à celui des DCs immatures et une demi-vie prolongée (jusqu'à plus de 100 heures) leur permettant de stimuler des lymphocytes T même après plusieurs jours (116, 148, 160, 166, 172). Bien que le lien entre l'arrêt de l'ubiquitination des molécules du MHC-II chez les DCs matures et l'augmentation de la demi-vie des complexes pMHC-II ne soit pas encore parfaitement défini (150), il est toutefois clair que l'arrêt de l'ubiquitination des complexes pMHC-II nouvellement formés se produit via la baisse de l'expression de MARCH1 et MARCH8 (148, 160, 175). Plutôt que d'être dirigés vers les ILVs pour la dégradation lysosomale comme ce qui survient chez les DCs immatures, ces complexes pMHC-II sont exportés vers la membrane plasmatique via des extensions tubulaires du MIIC (Figure 14, étape 5). Les complexes pMHC-II se retrouvent ainsi insérés dans la membrane plasmatique sous forme de microdomaines où ils coexistent avec d'autres immunorécepteurs du MIIC, une organisation qui favorise potentiellement la présentation antigénique (Figure 14,

étape 6) (148, 177, 178). Une fois arrivés à la surface cellulaire, les complexes pMHC-II non-ubiquitinés peuvent également être endocytés puis recyclés à la membrane plasmique via des compartiments endosomaux précoces (Figure 14, étape 7). Ce mécanisme serait extrêmement rapide et contribuerait à la diversité des peptides antigéniques présentés à la surface cellulaire, puisque les molécules du MHC-II pourraient échanger des peptides à l'intérieur de ces compartiments de recyclage (148, 156, 179, 180). Quant aux complexes pMHC-II ubiquitinés avant la maturation de la DC, leur séquestration intracellulaire et leur dégradation lysosomale se poursuit, privilégiant ainsi la présentation à la surface cellulaire de peptides uniquement dérivés du pathogène ayant induit la maturation de la DC (non illustré sur la Figure 14). Alternativement, de façon indépendante à l'ubiquitination, la fusion de la membrane limitante du MIIC avec la membrane plasmique peut conduire à la relâche extracellulaire de complexes pMHC-II dans des « exosomes », soit des microvésicules capables de se propager via les fluides biologiques, de disséminer des antigènes et d'établir des communications entre les cellules immunitaires (Figure 14, étape 8) (148, 181). Enfin, il faut noter que les différences liées aux processus de maturation des DCs ayant été relevées à la section 2.3.2.2 semblent s'appliquer ici aussi. En effet, les DCs « matures » chez qui l'expression de MARCH1 est régulée à la baisse font typiquement référence aux DCs dont la maturation a été induite de façon directe par un ligand du TLR, communément le LPS. Or, il semble que les DCs soumises à un processus de maturation indirecte présentent des niveaux d'expression de MARCH1 légèrement différents et une demi-vie des complexes pMHC-II davantage similaire à celle rapportée chez les DCs immatures (97, 160). À ce jour, il n'existe aucun marqueur de surface permettant de discriminer ces deux types de DCs matures, ce qui limite pour le moment la compréhension des mécanismes inhérents à ces différences (118).

L'expression de MARCH1 peut être modulée de différentes façons. Il est notamment connu que l'IL-10 induit l'expression de *March1* et la séquestration/dégradation du MHC-II chez les monocytes et les macrophages (182, 183), tandis qu'elle inhibe ces phénomènes chez les lymphocytes B (184). Cependant, chez les bmDCs murines, l'IL-10 ne stimule pas l'expression de *March1* : l'altération de la capacité présentatrice de l'antigène par l'IL-10 chez ce type cellulaire serait donc médiée par d'autres mécanismes (182). Par ailleurs, il a été démontré chez des macrophages que *Francisella tularensis* diminuait l'expression en surface

du MHC-II via la régulation à la hausse de l'expression de *March1*. Ce mécanisme serait dépendant de la production d'IL-10 et surviendrait grâce à la production par l'hôte d'un facteur induit par la prostaglandine E₂ (185). Cette stratégie permettrait potentiellement à la bactérie d'échapper à la présentation antigénique (7, 185).

3. Réponse adaptative contre *Streptococcus suis*

3.1 Maturation et activation des DCs

Au cours des dernières années, quelques études se sont intéressées aux fonctions des DCs murines, porcines et humaines dans le contexte de la réponse adaptative contre *S. suis* (4-6). Ces études suggèrent que *S. suis* utilise ses facteurs de virulence pour moduler les fonctions des DCs et ainsi échapper à la surveillance immunitaire (4).

3.1.1 Reconnaissance de *S. suis*

Des études *in vitro* chez des bmDCs murines stimulées avec *S. suis* ont démontré que l'expression des molécules de costimulation et la production de cytokines dépendaient fortement de voies de signalisation impliquant MyD88 (Figure 15). Ceci suggère que les DCs reconnaissent principalement *S. suis* via la signalisation des TLRs, bien que NOD2 semble aussi impliqué (77). Ces résultats corroborent les observations faites avec des astrocytes murins, des souris TLR2^{-/-} *in vivo* et des bmDCs porcines (5, 74, 186). Ces résultats sont d'autant plus intéressants que la présence de la CPS à la surface de *S. suis* module l'exposition des ligands du TLR et l'activation subséquente des DCs, dont la production de plusieurs cytokines pro-inflammatoires (77). Par exemple, chez des DCs humaines, le mutant non-encapsulé du sérotype 2 induit des niveaux de NF-κB supérieurs à ceux induits par la souche sauvage (6).

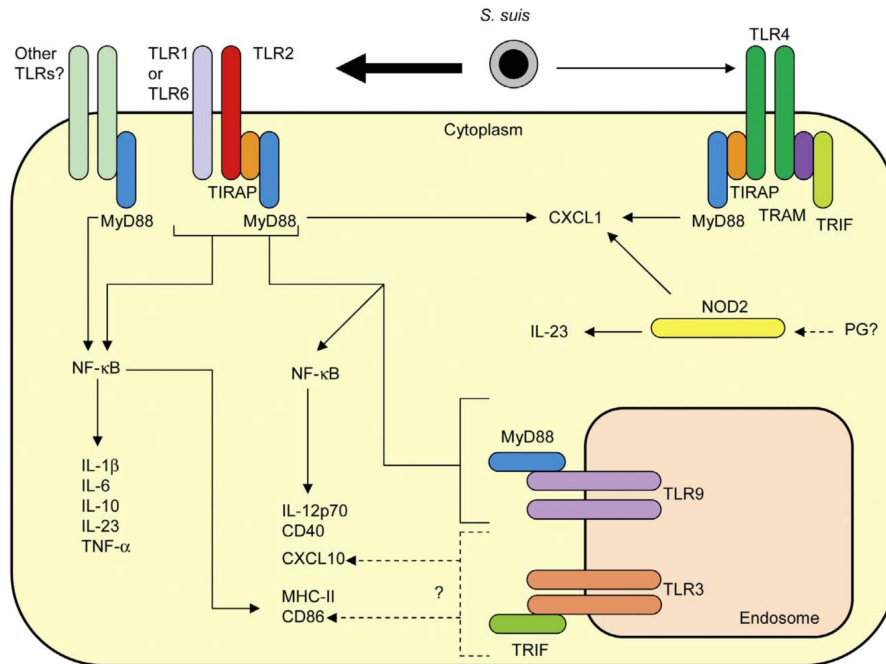


Figure 15. Modèle proposé de la reconnaissance de *S. suis* par les cellules dendritiques (DCs). *S. suis* serait principalement reconnu par les DCs via le TLR-2, mais d'autres TLR ainsi que NOD2 pourraient aussi intervenir. TLR : récepteur de type Toll; TIRAP : protéine adaptatrice contenant le domaine du récepteur de type Toll-interleukine-1 (TIR); MyD88 : protéine adaptatrice ou facteur de différenciation myéloïde 88; TRAM : molécule adaptatrice du récepteur de type Toll; TRIF : adaptateur induisant l'interféron-β contenant un domaine TIR; NF-κB : facteur nucléaire κB; PG : peptidoglycane; NOD : récepteur à domaines d'oligomérisation liant les nucléotides; IL : interleukine; CXCL : ligand de la chimiokine CXC; TNF-α : facteur de nécrose tumorale-α; MHC-II : complexe majeur d'histocompatibilité de classe II. Librement adapté sous licence CC BY de Public Library of Science (PLOS) : [PLOS One], de Lecours *et al.* (77), copyright (2012). Les codes de renvoi à la légende originale ont été retirés ici pour alléger la figure.

3.1.2 Phagocytose et élimination intracellulaire de *S. suis*

Le pouvoir anti-phagocytaire de la CPS de *S. suis* est bien connu et a été abondamment décrit chez différents types cellulaires, incluant les DCs (80). Chez des bmDCs murines, en conditions non-opsonisantes (en absence de sérum), la CPS de *S. suis* suffit pour bloquer la phagocytose par la DC, soit en agissant comme une barrière physique ou en inhibant des voies de signalisation (4), tel que décrit chez les macrophages (80). En conditions opsonisantes cependant, la CPS n'est pas suffisante pour résister à elle seule à l'opsonophagocytose et à l'élimination intracellulaire (4). Néanmoins, des modifications de la paroi cellulaire et la production de suilysine permettent à *S. suis* de réduire le dépôt du complément à sa surface, limitant ainsi sa reconnaissance par les récepteurs du complément et son élimination par la

phagocytose. Cette faible capture bactérienne survenant même en conditions opsonisantes pourrait avoir comme conséquences un apprêtement antigénique limité et une activation cellulaire qui l'est tout autant (Figure 16) (4). Chez des bmDCs porcines, il a pu être démontré de façon similaire que la CPS interférait avec la phagocytose par la DC, autant sous des conditions opsonisantes que non-opsonisantes. Néanmoins, puisque la souche sauvage et le mutant non-encapsulé sont détruits à des niveaux équivalents à l'intérieur de la DC, la CPS ne semble pas protéger la bactérie contre l'élimination intracellulaire chez les DCs porcines (5). Enfin, chez les DCs humaines, la capacité de *S. suis* à résister à la phagocytose varie en fonction du sérotype : le sérotype 2 serait le plus efficace à ce niveau (6).

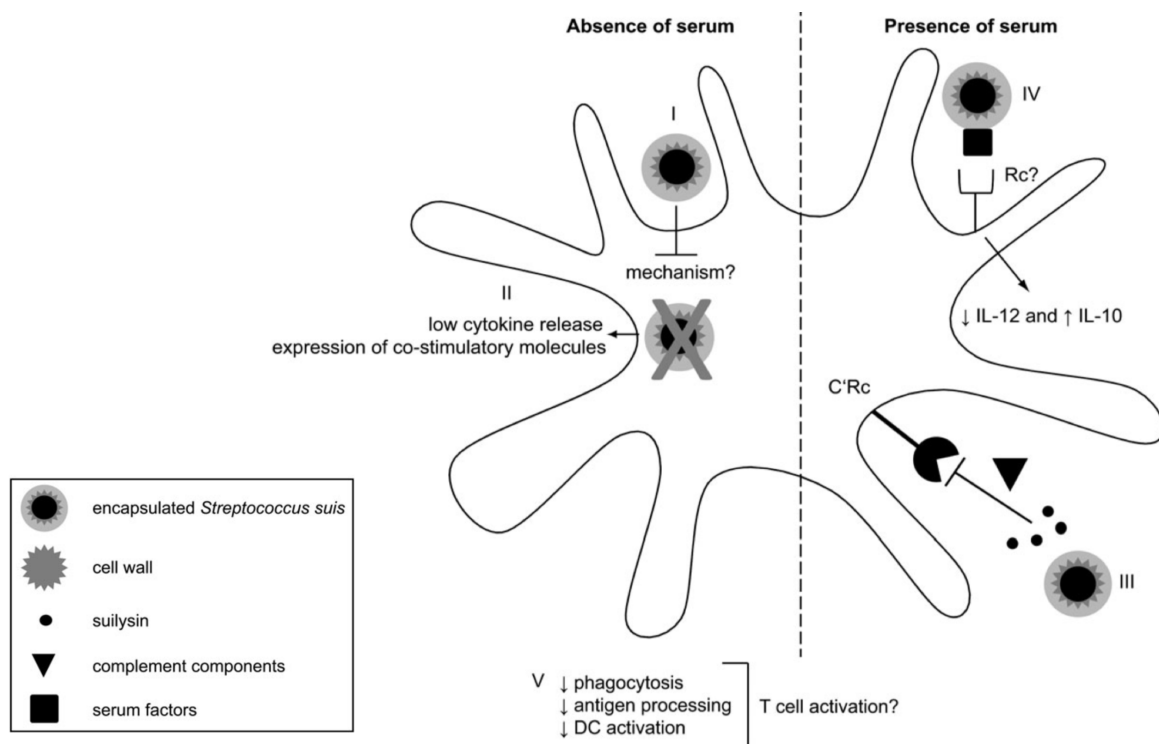


Figure 16. Modèle proposé de la modulation des fonctions des cellules dendritiques (DCs) par *S. suis*. (I) En l'absence de sérum, la CPS est suffisante pour bloquer la phagocytose de *S. suis* en agissant comme barrière physique et/ou en inhibant les voies de signalisation. (II) La présence de la CPS réduit la relâche de cytokines, malgré une expression normale des molécules de costimulation. (III) En présence de sérum, la CPS, la paroi cellulaire et la sulfolysine contribuent à réduire le dépôt du C' à la surface de *S. suis* et, conséquemment, la reconnaissance par les C'Rc, limitant ainsi l'élimination de la bactérie. (IV) La liaison d'autres facteurs du sérum à la surface de *S. suis* réduit la relâche d'IL-12 et augmente la relâche d'IL-10 par les DCs. (V) La faible capture bactérienne pourrait avoir des conséquences sur l'apprêtement antigénique, l'activation des DCs et des lymphocytes T. Rc : récepteur; C' : complément; IL : interleukine.
Reproduit avec la permission de Oxford University Press : [Journal of Infectious Diseases], de Lecours *et al.* (4), copyright (2011).

3.1.3 Expression des molécules du MHC-II

À ce jour, l'expression du MHC-II à la surface cellulaire des DCs n'a été étudiée qu'à des temps longs dans le contexte de *S. suis*. De plus, aucune information n'est disponible concernant le chargement peptidique des molécules du MHC-II lors de l'infection (4, 5). Chez la souris, des bmDCs stimulées *in vitro* durant 16 heures avec *S. suis* ont démontré une augmentation de la sous-population MHC-II^{high} par rapport à des cellules non-infectées. Cette augmentation ne semblait pouvoir être attribuée spécifiquement à aucun des facteurs de virulence testés avec les mutants disponibles (4). L'opsonisation de *S. suis* induisait quant à elle une diminution, quoique modeste, de l'expression du MHC-II. Cette diminution est intéressante et pourrait potentiellement s'expliquer par la production accrue d'IL-10 survenant chez les DCs stimulées avec des souches opsonisées (4). Chez des bmDCs porcines stimulées *in vitro* durant 16 heures avec *S. suis*, la souche sauvage n'induit pas l'expression du MHC-II, contrairement au mutant non-encapsulé (5). Ces différences entre le porc et la souris pourraient s'expliquer notamment par l'origine cellulaire différente des DCs (porc versus souris) ainsi que par la grande variabilité dans l'expression du MHC-II entre les individus porcins par rapport aux individus murins (porcs d'élevage commercial relativement *outbred* versus lignées de souris *inbred*) (5). Par ailleurs, il a été démontré par RT-qPCR que l'expression des gènes codant pour les molécules du MHC était régulée à la hausse dans le cerveau de porcs infectés par le sérotype 2 (187). Chez l'humain, aucune donnée n'est actuellement disponible concernant l'expression du MHC-II lors de l'infection par *S. suis*.

3.1.4 Expression des molécules de costimulation

Chez les bmDCs murines stimulées avec *S. suis*, l'expression des molécules de costimulation suit essentiellement le même patron que celui décrit pour le MHC-II, soit une augmentation de CD40 et CD86, sans différence entre la souche sauvage et le mutant non-encapsulé (Figure 16) (4). En revanche, chez les bmDCs porcines et les DCs humaines, l'induction de CD86 se produit à des niveaux supérieurs avec le mutant non-encapsulé (5, 6). De plus, il est intéressant de noter que le sérotype 2 a été identifié comme étant le sérotype le moins efficace dans l'initiation du processus de maturation de DCs humaines, sur la base de l'expression de CD83 et CD86 (6).

3.1.5 Production de cytokines polarisantes

Chez la souris, la stimulation des bmDCs par *S. suis* entraîne la relâche de cytokines de façon temps-dépendante, mais indépendante de la phagocytose (4). Après une incubation de 16 heures avec la souche sauvage, les bmDCs produisent des quantités significatives d'IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12p70, IL-23, IL-10, CXCL1, CCL2, CXCL9 et CXCL10. Quant au mutant non-encapsulé, il induit des niveaux plus élevés pour toutes les cytokines, à l'exception de l'IL-1 β et de CCL2, ce qui suggère que les antigènes de la paroi cellulaire de *S. suis* sont les principaux responsables de l'activation de la DC (4). Des résultats similaires ont été obtenus chez le porc. En effet, la souche sauvage de *S. suis* induit la relâche d'IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p40 et TNF- α par les bmDCs porcines, et ces niveaux sont significativement supérieurs avec le mutant non-encapsulé (5). Chez des DCs humaines, de faibles ratios IL-10 : IL-12 ont été obtenus pour tous les sérotypes, à l'exception du sérotype 2. Ce ratio est souvent utilisé comme indicateur du potentiel de polarisation de la réponse des lymphocytes T vers un phénotype Th1 (ratio faible) ou Th2/Treg (ratio élevé). Ce résultat est d'autant plus intéressant que le mutant non-encapsulé du sérotype 2 induit un ratio IL-10 : IL-12 bien plus faible que celui de la souche sauvage. Cela suggère que la CPS du sérotype 2 pourrait réguler à la baisse la réponse Th1 de l'hôte face à *S. suis* via une faible production d'IL-12 par les DCs (6). Des résultats similaires ont été obtenus chez la souris, chez qui la liaison à la surface de *S. suis* de facteurs du sérum autres que ceux du complément induit une faible relâche d'IL-12 par les DCs, tout en induisant des niveaux élevés d'IL-10 (Figure 16) (4). Cette modulation des cytokines produites par les DCs, tant murines qu'humaines, pourrait entraîner la diminution de la capture antigénique et de l'activation subséquente des lymphocytes T (4).

La perception du rôle de la CPS dans la modulation des profils d'activation des DCs a grandement évolué au cours des dernières années : d'abord perçue comme un facteur contribuant de façon relativement active à la modulation des fonctions des cellules de l'hôte, il semble en fait s'agir d'un matériel inerte n'induisant pas par lui-même de production de cytokines (à l'exception d'une production de CCL2 et CCL3) et n'exerçant pas de véritables propriétés immunosuppressives, si ce n'est une diminution de la transcription du facteur d'activation des lymphocytes B (« B-cell activating factor » ; BAFF) (78). Ainsi, bien que la

CPS purifiée parvient notamment à inhiber la phagocytose de particules indépendantes (80), le rôle de la CPS dans la modulation de l'activation des DCs semble davantage être celui d'une barrière physique gênant l'accessibilité des DCs aux antigènes de surface de *S. suis*.

3.2 Réponse humorale

L'immunité humorale est connue comme étant le principal mécanisme de l'immunité adaptative impliqué dans la défense contre les bactéries extracellulaires. En effet, grâce à leurs fonctions biologiques d'opsonolyse et/ou d'opsonophagocytose, les anticorps spécifiques permettent l'élimination du pathogène par le système immunitaire inné (76). Ainsi, il semble que l'immunité humorale soit importante dans la prévention de la maladie causée par *S. suis*, puisque le transfert passif d'anticorps permet de protéger des porcs et des souris contre un challenge homologue avec le sérotype 2 (1, 76). Cependant, bien que la réponse humorale dirigée contre les protéines de *S. suis* se caractérise chez la souris par des titres relativement élevés, une commutation isotypique (production d'IgM remplacée par la production d'IgG, principalement) ainsi qu'une réponse mémoire, la protection conférée par ces types d'anticorps semble limitée lors d'un challenge avec des souches hétérologues, tel que vu sur le terrain chez le porc (2, 76). En revanche, les anticorps anti-CPS joueraient un rôle protecteur clé contre toutes les souches d'un même sérotype, mais les titres d'anticorps dirigés contre la CPS sont très faibles tant chez la souris que chez le porc, et ne semblent pas présenter de commutation isotypique ni de véritable réponse mémoire, du moins selon les études ayant pu être réalisées chez la souris (2, 76). Cette faible réponse humorale contre la CPS pourrait s'expliquer notamment par la faible immunogénicité de cette dernière puisque, de par sa nature polysaccharidique, elle ne peut recruter l'aide des lymphocytes T pour faciliter les fonctions des lymphocytes B (2). Néanmoins, étant donné le potentiel protecteur des anticorps anti-CPS, une stratégie vaccinale permettant d'induire une réponse T dépendante dirigée contre la CPS constituerait une approche fort prometteuse dans le contrôle de la maladie causée par *S. suis*. Une compréhension plus approfondie des mécanismes impliqués dans la voie T dépendante lors de l'infection par *S. suis* apparaît donc essentielle.

4. Problématique, hypothèse et objectifs

Les infections causées par *S. suis* sont omniprésentes dans la population porcine mondiale. En plus d'être à l'origine de pertes économiques considérables pour l'industrie, ce pathogène pose un risque sérieux pour le bien-être animal, le développement d'antibiorésistance et la santé humaine. Malheureusement, les mesures de contrôle traditionnellement utilisées en pratique porcine se sont avérées à ce jour inefficaces dans la lutte contre *S. suis* et le développement de nouvelles stratégies vaccinales s'impose. Au cours des dernières années, un nombre croissant d'études se sont intéressées aux interactions de *S. suis* avec les cellules immunitaires de l'hôte. Ces études suggèrent que *S. suis* dispose d'un arsenal de facteurs de virulence, notamment sa CPS, qui lui permettent de moduler la réponse immune. De plus, les difficultés à développer un vaccin efficace contre ce pathogène suggèrent une altération de la voie T dépendante. Or, celle-ci n'a encore jamais été bien caractérisée dans le contexte de l'infection par *S. suis*. En effet, bien que des modulations dans l'expression des marqueurs de maturation ainsi que dans la production de cytokines aient été décrites chez des DCs stimulées avec *S. suis*, les mécanismes impliqués dans la modulation des signaux requis pour la pleine activation des lymphocytes T CD4⁺, et plus particulièrement le premier signal, demeurent encore largement incompris (Figure 17).

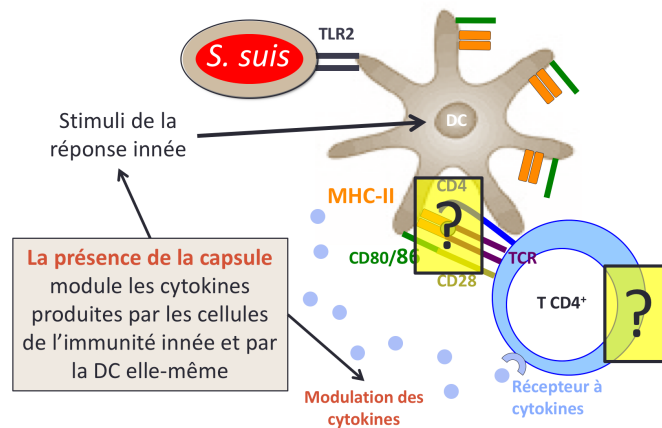


Figure 17. Schématisation de la problématique du projet. Différentes évidences suggèrent une altération de la voie T dépendante par *S. suis*. Cependant, les mécanismes impliqués dans la modulation des signaux requis pour la pleine activation des lymphocytes T CD4⁺, et plus particulièrement le premier signal, demeurent encore largement incompris. DC : cellule dendritique; TLR : récepteur de type Toll; MHC : complexe majeur d'histocompatibilité; TCR : récepteur du lymphocyte T.
Figure originale, Corinne Letendre (2016).

Nous avons émis comme hypothèse que *S. suis* interfère avec le développement d'une réponse immunitaire adaptative efficace en modulant, à l'aide de sa CPS, la capacité des DCs à présenter des antigènes via le MHC-II aux lymphocytes T CD4⁺. L'objectif général du projet est donc d'évaluer l'effet de *S. suis* sur l'activation des lymphocytes T CD4⁺ ainsi que sur la capacité présentatrice de l'antigène des DCs. Plus spécifiquement, nous nous sommes intéressés à :

1. La **réponse T CD4⁺ mémoire** puisqu'elle constitue en soi un reflet de la qualité de la réponse adaptative générée contre *S. suis*.
2. La **régulation de l'expression du MHC-II** chez les DCs puisqu'une modulation de cette voie peut mener à la présentation de peptides plus ou moins appropriés dans l'initiation de la réponse adaptative contre *S. suis*.

Un mutant non-encapsulé de *S. suis* a par ailleurs été utilisé pour le deuxième objectif afin d'étudier l'effet de cet important facteur de virulence sur la voie du MHC-II.

III. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

ARTICLE I

Immune-responsiveness of CD4⁺ T cells during *Streptococcus suis* serotype 2 infection

Marie-Pier Lecours^{1,4}, Corinne Letendre¹, Damian Clarke¹, Paul Lemire¹, Tristan Galbas², Marie-Odile Benoit-Biancamano³, Jacques Thibodeau², Marcelo Gottschalk⁴ & Mariela Segura^{1*}

¹Laboratory of Immunology, ³Pathology Division and ⁴Laboratory of *Streptococcus suis*, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, St-Hyacinthe, Quebec, Canada.

²Laboratory of Molecular Immunology, Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

* Corresponding author

Soumis à *Scientific Reports*, # SREP-16-18210

Rôle de la candidate dans la conception de l'article :

Je suis co-auteure de cet article. J'ai participé activement à la conception et au design des expériences sur les T CD4⁺ mémoires. J'ai effectué les manipulations, analysé les résultats, conçu les graphiques et rédigé les sections du manuscrit propres à ce volet de l'article.

Abstract

Streptococcus suis is an important swine and human pathogen. Following infection, dendritic cells (DCs) undergo maturation, a process involving up-regulation of co-stimulatory molecules and cytokine production. However, *S. suis* virulence factors, particularly its capsular polysaccharide (CPS), enable this pathogen to modulate DC functions and potentially impair the immune response. This study aimed to evaluate the consequences of DC function modulation on T cell activation. *S. suis*-stimulated total mouse splenocytes readily produced TNF- α , IL-6, IFN- γ , CCL3, CXCL9, and IL-10. *Ex vivo* and *in vivo* analyses revealed the involvement of CD4⁺ T cells and a Th1 response. Nevertheless, during *S. suis* infection, levels of Th1-derived cytokines TNF- α and IFN- γ were very low. Moreover, CD4⁺ T cells secreted IL-10 and failed to up-regulate optimal levels of CD40L and CD69. The CPS hampered release of several T cell-derived cytokines *in vitro*. A clinical infection resulted in low levels of not only anti-*S. suis* antibodies, but also of those directed against a reporter antigen, ovalbumin. This interference was correlated with severe clinical signs of *S. suis* disease. A transient splenic depletion of CD4⁺ T cells and a poor memory response were also observed. Altogether, these results suggest *S. suis* interferes with the adaptive immune response.

Introduction

Streptococcus suis is a major swine pathogen mainly associated with meningitis, although other systemic infections have been described¹. *S. suis* is now emerging as a threat to human health, especially in Asian countries where it has recently been identified as the leading cause of adult meningitis in Vietnam, the second in Thailand, and the third in Hong Kong¹. Moreover, important human outbreaks of streptococcal toxic shock-like syndrome (STSLs) due to *S. suis* occurred in Asia during the last years with fatality rates near 20%¹. Among 35 known serotypes, serotype 2 is the most virulent for both pigs and humans, and most of the studies have been performed with this serotype. The capsular polysaccharide (CPS), which defines the serotype, is considered a major virulence factor of *S. suis* serotype 2².

Dendritic cells (DCs) are potent antigen-presenting cells and are critical for bridging innate and adaptive immune responses³. DCs capture and process invading pathogens to present their antigens to corresponding lymphocytes. Following antigen uptake, DCs undergo a maturation process characterized by the expression of different cell surface molecules and the release of cytokines. After DC migration to draining lymph nodes, co-stimulatory molecules bind to naive T cells, leading to T cell activation³. The production of cytokines, such as interleukin (IL)-12, by mature DCs provides additional signals for the acquisition of T cell effector functions⁴.

CD4⁺ T cells are important for the development of immunity to bacterial infections. After interaction with their cognate antigen presented by activated DCs, naive CD4⁺ T cells proliferate and polarize towards different CD4⁺ lineages, which then shape the immune response. The best characterized CD4⁺ lineages are T helper type 1 (Th1), which drives the immune response mainly against intracellular pathogens; Th2, which promotes humoral responses; Th17, which contributes to the elimination of extracellular pathogens; and various regulatory T cell (Treg) populations, which prevent the development of autoimmunity⁵. However, there is accumulating evidence that the CD4⁺ T cell lineages are not as stable as initially thought. Substantial heterogeneity and plasticity, as assessed by cytokine production patterns, have been observed within these subsets, particularly when generated *in vivo* and

during an infection⁵. Hence, it seems more likely that multiple polarized CD4⁺ T cell subsets are generated. These effector cells secrete large quantities of cytokines and chemokines⁶. For example, the Th1 cells secrete great amounts of IFN- γ , TNF- α , and IL-2 whereas the Th2 cells secrete high levels of IL-4, IL-5, IL-9, and IL-13⁶.

Despite the increasing number of studies, the pathogenesis of *S. suis* infection is still not completely understood and, to date, attempts to control the infection are hampered by the lack of an effective vaccine⁷. Mouse bone marrow-derived DCs have been shown to be a valid model to study the host immune response during *S. suis* infection^{8,9}. There is evidence that mouse DCs are activated after *S. suis* infection, undergoing a maturation process characterized by the up-regulation of the co-stimulatory molecules CD40 and CD86 as well as cytokine and chemokine production, including TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12p70, and IL-23^{8,9}. However, *S. suis* possesses virulence factors able to modulate DC functions, particularly cytokine release and opsono-phagocytosis, potentially leading to a diminished immune response^{8,9}. In fact, we and others have shown that the presence of CPS on *S. suis* strongly reduces DC activation/maturation and *S. suis* internalization, and/or modulates the IL-10/IL-12 and IL-10/TNF- α cytokine production in favor of a more anti-inflammatory profile by either human-, mouse- or swine-derived DCs^{8,10,11}. Here, we test the hypothesis that modulation of DC functions by encapsulated *S. suis* affects the development of T cell-dependent immune responses. Indeed, this work addresses for the first time the role of CD4⁺ T cells in the host adaptive immune response against *S. suis* and the potential contribution of the bacterial CPS to the modulation of this response.

Results

Dose-dependent role of CD4⁺ T cells in survival after *S. suis* infection. CD4 knockout (KO) and control C57BL/6 mice were infected with *S. suis* wild-type (WT) strain P1/7 (1×10^7 CFU) in a preliminary investigation of the role of CD4⁺ T cells during *S. suis* infection. Mice devoid of functional CD4⁺ T cells died significantly more rapidly than control mice 14 days after infection (Fig. 1A). The same result was obtained at 21 days after infection (data not shown). CD4KO mice also showed higher levels of bacteremia at 6 h after infection than control mice. However, there was no statistical difference in bacteremia between both groups at later time points (Fig. 1A). Upon infection with a higher infectious dose, CD4KO mice showed similar survival curves and bacteremia levels to those observed in control mice, both after 14 days (Fig. 1B) and 21 days (data not shown). These results suggest that CD4⁺ T cells play only a transient and limited role in the control of *S. suis* infection.

Encapsulated *S. suis* induces a type-1 pro-inflammatory environment in the spleen during systemic infection. In order to characterize the immunological environment during *S. suis* systemic infection, an *ex vivo* approach was first used to measure the production of different cytokines in the spleen. Total splenocytes from mice infected with *S. suis* WT strain P1/7 were collected and incubated in cell culture plates for 48 h. Splenocytes from control (placebo) animals were used as negative controls and ConA-treated splenocytes were used as positive controls. Under these conditions, a significant production of IL-6 and TNF- α as well as high levels of IFN- γ were observed, indicating the development of a type-1 pro-inflammatory response (Fig. 2). Infected splenocytes also released significant amounts of IL-10, suggesting a role of this regulatory cytokine in maintaining homeostasis during the inflammatory process. Interestingly, the presence of CCL3 and CXCL9, important chemokines involved in T cell recruitment, was observed (Fig. 2). The production of IL-4 was not detected (data not shown).

CD4⁺ T cells are involved in the host immune response induced during *S. suis* infection. CD4⁺ T cells are key players in the development of host immune responses; however, their

activation status and cytokine profile in response to *S. suis* infection has never been investigated. Firstly, we performed a multi-parametric flow cytometry (FACS) analysis of *ex vivo* total splenocyte production of IFN- γ , a Th1 signature cytokine. As shown in Fig. 3A, IFN- γ production was overall weak and hardly detectable by intracellular (IC)-FACS within the whole spleen cell population. CD3⁺ T cells contributed to ~ 50% of the IFN- γ response in the spleen of infected mice. However, when considering inter- and intra-experiment variations, this weak IFN- γ production was not statistically significant compared to control mice (Fig. 3B). Natural killer T (NKT) cells (NK1.1⁺CD3⁺) produced low to negligible levels of IFN- γ . Indeed, natural killer (NK) cells (NK1.1⁺) were the major contributors to IFN- γ production within the CD3⁻ population early during infection (M. Segura, unpublished observations). As expected, CD19⁺ cells (B cells) did not produce significant levels of this cytokine (data not shown). Similar findings were obtained when analyzing TNF- α production (Fig. 3C). Nevertheless, a strong expression of the early leukocyte activation marker CD69 was observed in total splenocytes from infected animals compared to control mice. Around 12.8% \pm 2.5% (mean \pm SEM) of cells expressed this marker within the CD3⁺ population, suggesting that a small portion of T cells have been activated during infection (Fig. 3D).

As the frequency of activated CD3⁺ T cells during *S. suis* infection was very low and to better evaluate the role of CD3⁺CD4⁺ T cells, these target cells were MACS-isolated from *ex vivo* total splenocyte cultures and analyzed by IC-FACS. As shown in Fig. 4, CD4⁺ T cells contributed to the release of low, still significant levels of IFN- γ , TNF- α , and IL-2. These data suggest that CD4⁺ T cells indeed differentiate into Th1 cells, although low % of activated cells are observed relatively to positive control ConA-treated cells. Interestingly, a significant % of CD4⁺IL-10⁺ cells was also observed in *ex vivo* total splenocyte cultures (Fig. 4).

With the aim of measuring the frequency and level of activation of CD4⁺ T cells *in vivo* during infection, mice were injected i.p. with Brefeldin A solution and CD4⁺ T cells were directly isolated from the spleen 96 h post-primary infection. The % of CD4⁺IFN- γ ⁺ cells was very low after a primary infection and not significantly different from controls. On the other hand, *in vivo* production of TNF- α and IL-2 by CD4⁺ T cells was significantly higher than control cells (Fig. 5). Similarly to *ex vivo* data, a significant production of IL-10 by CD4⁺

cells was also observed *in vivo* during *S. suis* primary infection. Surviving mice were challenged with a second infectious dose 2 weeks after primary infection and similarly treated with Brefeldin A. When CD4⁺ T cells were isolated 48 h post-boost, % of IFN- γ ⁺, TNF- α ⁺, IL-2⁺, and IL-10⁺ CD4⁺ cells were similar, or only slightly higher, than those observed 96 h post-primary infection (Fig. 5). This is consistent with the poor memory CD4⁺ T cell response that was observed in the spleen both after a primary infection (4 and 7 days) and secondary infection (2 and 7 days). In fact, while % of naive CD4⁺ T cells (CD62L⁺CD44^{low}) showed a significant reduction at all time points after infection (Fig. 6B), % of memory CD4⁺ T cells (CD44^{high}IL-7R α ⁺) remained unchanged when compared to naive mice (Supplementary Fig. S1). More precisely, although the effector (memory) subset (CD62L⁻CD44^{high}) showed a significant and sustained augmentation starting 7 days after a primary infection (Fig. 6B), this increase could not be attributed to the presence of actual memory cells among total spleen cells, as evidenced by the unchanged % in IL-7R α ⁺ cells within this subset (Fig. 6C and D, blue population and histograms). The lack of augmentation of this subset in the spleen could also be explained by cellular migration from primary lymphoid tissues to the periphery. However, the fact that the central memory subset (CD62L⁺CD44^{high}) also remained unchanged and showed no significant increase in % of IL-7R α ⁺ cells, even after a secondary infection, is in agreement with the development of a poor memory CD4⁺ T cell response during *S. suis* infection (Fig. 6B and D, red population and histograms).

***S. suis* CPS impairs cytokine release by T cells.** Previous experiments showed that albeit CD4⁺ cells are involved in the immune response induced during *S. suis* infection, their activation status seems to be compromised and their role in controlling infection limited. To better characterize the effect of *S. suis* on CD4⁺ T cell functions, we performed *in vitro* DC-T cell cocultures. As *S. suis* is an encapsulated bacterium, we also evaluated the impact of CPS on the activation of CD4⁺ T cells *in vitro*, using a non-encapsulated mutant strain. Supernatants from coculture experiments were collected and tested by ELISA for the presence of CD4⁺ T cell-derived cytokines. No significant cytokine production was observed in single cell cultures (DCs or T cells alone) that served as controls (data not shown). The WT strain P1/7 induced the release of low but significant levels of IFN- γ and TNF- α . Low levels of

IL-10 released by CD4⁺ T cells were also observed in response to WT *S. suis* activation *in vitro*. (Fig. 7). In contrast, the non-encapsulated mutant strain $\Delta cpsF$ induced significantly higher levels of TNF- α , IFN- γ , and IL-10 by CD4⁺ T cells. Compared to other cytokines, *S. suis*-activated CD4⁺ T cells released large amounts of IL-2 and this production was not modified in cocultures stimulated with the $\Delta cpsF$ mutant strain (Fig. 7). These results suggest that the presence of CPS on *S. suis* modulates CD4⁺ T cell activation without affecting autocrine IL-2 secretion.

***S. suis* interferes with T cell expression of co-stimulatory molecules.** In addition to cytokine production, expression of surface molecules on CD4⁺ T cells is an essential event for proper T cell activation. To measure the ability of *S. suis* to induce optimal activation of CD4⁺ T cells, we measured surface expression of CD69 and CD40L. Fig. 8 shows that *S. suis* failed to induce a significant increase in surface expression of these molecules *in vitro*, compared to uninfected control cells. Cocultures infected with the non-encapsulated mutant strain $\Delta cpsF$ showed a low increase in CD69 expression by T cells (Fig. 8A); however levels of CD40L expression remained unchanged (Fig. 8B). Similar results were observed independently of the incubation time (3, 8, 24 and 48 h of coculture incubation, not shown).

Reduced numbers of splenic CD4⁺ T cells after *S. suis* infection. To better understand the dynamics of T cell activation *in vivo*, total numbers of splenic CD4⁺ and CD8⁺ T cells were quantified during the *S. suis* infection. Spleens from control and infected mice were collected 2, 4, 6, and 8 days post-primary infection and 2, 4, 6, and 8 days post-boost infection. Similar % of CD4⁺ T cells were observed between infected and non-infected controls during the first 6 d post-primary infection (data not shown). However, a significant decrease in the numbers of these cells was observed at 8 days post-primary infection (Fig. 9A). This reduction in the number of CD4⁺ T cells persisted after challenge infection and gradually came back to normal by 6 to 8 days post-boost infection (data not shown). Only minor and no significant changes in the CD8⁺ T cell population were observed (data not shown). Based on these results, we performed histopathological analysis of spleens at 8 days post-primary infection. We observed a noteworthy increase in extramedullary hematopoiesis and in white pulp, mostly attributable to enhanced granulopoiesis as described¹². Interestingly, lymphatic nodules were also

noticeably reduced in numbers and contained fewer cells than controls (Fig. 9B and Supplementary Table S1).

***S. suis* induces a weak specific antibody response.** As CD4⁺ cells play a major role in B cell activation and thus in the generation of a specific humoral response, the anti-*S. suis* antibody response generated during infection was evaluated. Blood from infected mice was collected 14 days after primary infection. As shown in Fig. 10, titers of total Ig [IgG+IgM] directed against the whole bacteria were relatively low, when compared to those obtained after an immunization with ovalbumin (OVA) (Fig. 11). Nevertheless, isotype switching was observed in infected animals. In agreement with a Th1 profile, levels of *S. suis*-specific antibodies of the type 1 IgG subclasses (IgG2b and IgG2c) were higher than those of the Type 2 IgG1 subclass (Fig. 10).

***S. suis* interferes with the OVA-specific antibody response *in vivo*.** To better understand the overall low antibody response generated during *S. suis* infection, the capacity of *S. suis* to interfere with the development of the antibody response against a bystander antigen was evaluated. C57BL/6 mice were infected with *S. suis* WT strain P1/7 two days prior to the injection of OVA formulated with CpG ODN. Two weeks after primary OVA immunization, serum levels of OVA-specific total Ig, IgG1, IgG2b, and IgG2c were found significantly lower following mice infection with *S. suis* compared to non-infected mice (Fig. 11A). Surviving mice were then boosted with a second dose of OVA to evaluate the effect of *S. suis* infection on the development of anti-OVA memory antibody response. A significantly lower production of anti-OVA total Ig, IgG1, and IgG2b was also observed after boost (Fig. 11B). Levels of IgG2c were also reduced after boost in infected mice; however this difference was not statistically significant compared to control mice. Furthermore, during a *S. suis* infection, some animals display severe clinical signs while others present milder symptoms in spite of similar bacteremia levels. A correlation analysis was thus performed between the presence of severe clinical signs in infected animals and the production of OVA-specific antibodies during the primary response. Effectively, as shown in Supplementary Fig. S2, the anti-OVA antibody production was significantly lower in infected animals displaying severe clinical signs than in infected animals showing milder clinical signs.

Discussion

The mechanisms involved in the innate and adaptive immune responses towards *S. suis* remain poorly known, and the increase in severity of *S. suis* infections in humans underscores the critical need of a better understanding of the interactions between *S. suis* and the immune system to generate an effective response against this pathogen. DCs are activated in the presence of *S. suis*, undergoing a maturation process characterized by the up-regulation of co-stimulatory molecules and the production of pro-inflammatory mediators⁸⁻¹¹. However, *S. suis* was previously shown to possess several virulence factors able to modulate such DC functions, potentially leading to a diminished or ineffective host immune response⁸⁻¹¹. In the present work, we further evaluated the consequences of *S. suis* modulation of DC functions on the development of adaptive immune responses towards this pathogen. This study addresses for the first time the contribution of CD4⁺ T cells in the development of immune functions during *S. suis* serotype 2 infections using *in vivo*, *ex vivo*, and *in vitro* analyses.

T cells are considered essential for the development of the host adaptive immune response. A preliminary experiment conducted in our laboratory with TCRαβ KO mice showed that mice devoid of functional CD4 and CD8 T cells die significantly more rapidly than control mice, suggesting an important role for T cells during *S. suis* infection (unpublished observations). Moreover, experiments conducted with CD4KO mice in the present study further showed that these mice have transiently elevated bacteremia levels and die significantly more rapidly than control mice during the infection. However, this seemingly protective effect of CD4⁺ T cells was lost during infections with higher doses of *S. suis* and at later time points. These results suggest that CD4⁺ T cells play only a limited role in the early control of *S. suis* infection, possibly through activation of innate immune cells and cellular immunity. This prompted us to further evaluate the role of CD4⁺ T cells during *S. suis* infection.

An experimental model of *S. suis* infection has previously been described in our laboratory¹³. During the systemic phase of the infection, among other cytokines, high plasma levels of IL-6, TNF-α, IFN-γ, and IL-10 were observed¹³⁻¹⁵. In this study, total spleen cells

were shown to secrete TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10, CCL3, and CXCL9, suggesting an activation of splenic cells during the infection and a polarization towards a Th1 response. IL-10 production can be related to immune regulation, while the presence of CCL3 and CXCL9 suggests that T cells might be recruited in the spleen through the release of these chemokines, as is the case for other streptococci¹⁶. It is interesting to note that TNF- α and IL-6 have routinely been reported as important mediators of *S. suis* sepsis^{13,14}. This observation might also highlight the particular importance of IL-10 in maintaining homeostasis as reported by Dominguez-Punaro *et al*¹⁴. Evaluation of the production of these cytokines and chemokines through similar experiments conducted in parallel with Group B *Streptococcus* (GBS) has allowed comparison of the levels obtained during *S. suis* and GBS infections. In fact, GBS is often compared to *S. suis*, as both pathogens are encapsulated and cause invasive infection leading to sepsis and meningitis. Furthermore, GBS and *S. suis* are the sole Gram-positive bacteria harbouring terminal sialic acid in their CPSs. However, despite these similarities, the production of TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10, CCL3, and CXCL9 was much lower in the spleen of *S. suis*-infected mice than it was in GBS-infected mice under the same experimental conditions¹⁷.

CD4⁺ T cells are expected to be major contributors to cytokine release as they shape the adaptive immune response following the initial innate inflammatory response to systemic bacteria¹⁸. In the present study, multiple *ex vivo* and *in vivo* analyses of either total splenocytes, CD3⁺ T cells or CD3⁺CD4⁺ T cells suggested that a Th1 response was developed after *S. suis* infection. However, frequency of activated CD4⁺ T cells and levels of IFN- γ , TNF- α , and IL-2 were very low. Production of IL-10 by CD4⁺ T cells activated by *S. suis* was also observed. Besides Treg, IL-10 production has been reported by both Th1 and Th2 differentiated T cells¹⁹. IL-4 production by CD4⁺ T cells was not detected in our system. The very acute course of the *S. suis* infection might thus suggest that CD4⁺IL-10⁺ cells are generated during the type-1 inflammatory process rather than through the expansion or generation of a particular Treg population.

The development of immune memory was also evaluated. Two weeks after primary infection, surviving animals were challenged with a second infection. Results showed that

CD4⁺ T cells responded to infection by producing the same pattern of cytokines. However, this response was engaged much more rapidly as CD4⁺ T cells were isolated and stained 48 h after challenge in comparison to 96 h after the initial infection. Yet, levels of cytokine production were similar to those observed after a primary infection. Limited development of a memory response was further supported by the lack of expansion of the effector memory and central memory CD4⁺ T cell subsets in the spleen of *S. suis*-infected mice, even after a boost infection. In contrast, GBS-infected mice have been reported to display enhanced % of central memory CD4⁺ T cells following a boost-infection under the same experimental conditions¹⁷.

S. suis possesses a thick CPS known to be its most important virulence factor. The presence of CPS is known to hide *S. suis* cell wall antigens and thus reduce cell activation^{8-10,13}. Previous studies with DCs showed that the CPS modulates DC functions, mostly by interfering with *S. suis* internalization and killing by DCs as well as hampering DC activation⁸⁻¹⁰. In order to characterize the role of *S. suis* CPS in the activation of CD4⁺ T cells, an *in vitro* model was used. *In vivo* studies could not be performed as the mutant strain is rapidly eliminated from the host^{20,21}. The CPS was found to interfere with the release of IFN- γ , TNF- α , and IL-10 by CD4⁺ T cells. However, the CPS had no effect on the release of IL-2, suggesting that the presence of the CPS interferes with CD4⁺ T cell activation, but not with T cell proliferation. CD69 is the earliest leukocyte maturation marker and is routinely used to evaluate T cell activation²². However, it has been described that CD69-deficient lymphocytes had a normal proliferative response²². In the case of *S. suis*, only low expression of CD69 was observed on CD4⁺ T cells activated *in vitro*. This is in contrast to GBS and *Streptococcus pneumoniae* which induce a significant up-regulation of CD69 on T cells during the infection^{17,23}. *S. suis* also failed to induce significant levels of surface expression of CD40L, an important co-stimulatory molecule involved in T cell activation. The CPS does not seem to interfere with CD69 or CD40L expression by *S. suis*-stimulated CD4⁺ T cells. Altogether, these findings suggest that *S. suis* uses multiple virulence factors to reduce either cytokine release or co-stimulatory molecule expression by CD4⁺ T cells. T cell activation is known to depend on DC maturation state: while phenotypically mature DCs can induce T cell proliferation, it appears that only fully activated DCs producing cytokines can effectively

activate T cells⁴. Interestingly, *S. suis* is known to modulate DC IL-12 production, which is a critical signal for effective activation of T cells^{8,25}.

During the infection, we also observed that the production of *S. suis*-specific antibodies is low. This prompted us to evaluate the ability of *S. suis* to interfere with the production of antibodies against a bystander antigen. OVA, in formulation with CpG oligodeoxynucleotides (ODN), was injected in infected mice. The production of both Th1- and Th2-dependent antibody isotypes was markedly reduced during the primary infection. The same results were obtained during the memory response, except for the production of IgG2c, for which no significant difference was noticeable. IgG2c is strongly associated with the development of a Th1 response. As CpG has a strong Th1 adjuvant activity²⁴, this could explain why a significant difference during the memory response was difficult to observe.

Another major finding of this work is the correlation between the presence of clinical signs and the production of antibodies against OVA. After the infection with *S. suis*, animals developed a bacteremia accompanied by either mild or severe clinical signs such as rough hair coat, swollen eyes, depression, prostration and weakness. During the primary infection, infected animals displaying severe clinical signs were shown to produce significantly less OVA-specific antibodies compared to animals presenting mild clinical signs. These results suggest that *S. suis* might have immunosuppressive properties. The exact mechanisms responsible for the suppression of the immune response during *S. suis* infection will need further investigations. However, systemic inflammation triggered by pathogens or trauma has already been suggested to lead to prolonged immunosuppression through modulation of DC differentiation and function: although the underlying causes are probably complex, inflammatory signals have been reported to affect the acquisition of antigen presentation functions and this might thus contribute to the immunosuppressive state^{25,26}. Moreover, it has previously been demonstrated that *S. pneumoniae* inhibits IgG responses to a number of co-immunized soluble antigens. More precisely, *S. pneumoniae* was found to mediate a significant reduction in the formation of Ag-specific splenic germinal center T follicular helper and germinal center B cells and antibody-secreting cells in the spleen and bone marrow in response to OVA²⁷. Similarly, in a lethal coinfection model of influenza virus and

S. pneumoniae, coinfection caused depletion of CD4⁺ T cells and B cells in the lung, the mediastinal lymph nodes and the spleen, while virus titers and bacterial cell counts were significantly increased and levels of virus-specific IgG, IgM, and IgA were decreased²⁸. In this regard, a transient depletion of CD4⁺ T cells in the spleen was observed during a primary *S. suis* infection. It is unknown if this is related to cell death or cell emigration to other target tissues or organs. Interestingly, lymphatic nodules were also noticeably reduced in numbers and contained fewer cells than controls, suggesting a possible reduction in T cell-B cell interactions, with consequent reduction in antibody production. Finally, the increase in extramedullary granulopoiesis in the spleen might reflect exhaustion of neutrophil reserves in the bone marrow in response to *S. suis* systemic infection.

To conclude, we observed that total splenocytes produce IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-10, CCL3, and CXCL9 after infection with *S. suis*. Different cell types such as macrophages, NK cells, and DCs could be involved in the release of these cytokines, while the presence of CCL3 and CXCL9 could be involved in the recruitment of CD4⁺ T cells. We in fact demonstrated that CD4⁺ T cells produced TNF- α , IFN- γ , IL-10, and IL-2, thus suggesting the development of a Th1 response during *S. suis* infection. However, *S. suis* CPS and possible other virulence factors interfere with CD4⁺ T cell activation, while having no impact on T cell proliferation. Finally, *S. suis* also hampers the development of specific antibodies during the infection. Animals with altered antibody production are the one displaying the most severe clinical signs. This study is a noteworthy starting point for future research regarding T cell-dependent immunity during *S. suis* infection and its consequences in vaccine development.

Materials and Methods

Bacterial strains and growth conditions. The *S. suis* serotype 2 virulent strain P1/7, originally isolated from a case of porcine meningitis, and its isogenic non-encapsulated mutant strain $\Delta cpsF$ were used. These strains were already characterized and used in previous studies^{10,29}. *S. suis* strains were grown on sheep blood agar plates and isolated colonies were used as inocula for Todd–Hewitt Broth (THB), which was incubated 8 h at 37 °C with agitation. Working cultures were obtained by inoculating 10 μ l of a 10^{-3} dilution of these cultures in 30 ml of THB and incubating for 16 h at 37 °C with agitation. Bacteria were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.3, and appropriately diluted in fresh medium to desired concentrations. The number of CFU/ml in the final suspension was determined by plating samples onto THB agar using an Autoplate 4000 Automated Spiral Plater.

Antibodies. Anti-mouse antibodies used for FACS analysis were as follows: FITC-conjugated anti-CD3 (17A2) and anti-CD4 (GK1.5); PE-conjugated anti-CD4 (GK1.5), anti-CD8 (53-6.7), anti-CD19 (6D5), anti-CD40L (MR1), anti-CD69 (H1.2F3), anti-IFN- γ (XMG1.2), anti-TNF- α (MP6-XT22), anti-IL-2 (JES6-5H4), and anti-IL-10 (JES5-16E3); PE-Cy5-conjugated anti-CD3 (145-2C11); PE-Cy7-conjugated anti-NK-1.1 (PK136) and anti-CD44 (IM7); APC-conjugated anti-IFN- γ (XMG1.2), anti-TNF- α (MP6-XT22), and anti-IL-7R α (A7R34) and BV421-conjugated anti-CD62L (MEL-14).

Mice and experimental infections. 5 week-old female CD4KO (B6.129S2-*Cd4*^{tm1Mak/J}) or control C57BL/6 mice (Jackson Laboratory) were used for the mice experiments. All mice procedures were performed in compliance with the guidelines and policies of the Canadian Council on Animal Care and the principles set forth in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and protocols were approved by the Animal Welfare Committee of the University of Montreal (Research Protocol Number: Rech-1399). On the day of the experiment, a 1 ml volume of either the bacterial suspension or the vehicle solution (sterile THB) was administered by intraperitoneal injection (i.p.). Mice were monitored daily to record mortality and clinical signs of disease, such as depression, rough appearance of hair

coat and swollen eyes^{13,21}. Mice exhibiting extreme lethargy were considered moribund and were humanely euthanized. To determine the level of infection, numbers of viable bacteria in blood were quantified at different times post-infection. Blood (5 μ l) was collected from the tail vein, serially diluted in PBS and plated using an Automated Spiral Plater. After overnight incubation, colonies were counted and expressed as CFU/ml.

Generation of mouse bone marrow-derived dendritic cells. DCs were generated from naive C57BL/6 mice as previously described^{8,9}. Briefly, bone marrow was removed from femurs and tibiae. After red blood cell lysis, total bone marrow cells (2.5×10^5 cells/ml) were cultured in complete medium consisting of RPMI 1640 supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum, 10 mM HEPES, 20 μ g/ml gentamycin, 100 U/ml penicillin-streptomycin, 2 mM L-glutamine and 50 μ M 2-mercaptoethanol. Complete medium was complemented with 20% GM-CSF from a mouse GM-CSF-transfected cell line (Ag8653) as a source of GM-CSF³⁰. Cells were cultured for 7 days and were fed on days 3 and 5. On day 7, clusters were harvested and subcultured overnight to remove adherent cells. Non-adherent cells were collected on day 8, washed, and used as immature DCs for the studies. Cell purity routinely comprised 86-90% CD11c^{high} and F4/80^{-dim} cells, as determined by FACS analysis and as previously reported^{8,9}.

Isolation of splenic CD4⁺ T cells. Untouched CD4⁺ T cells were purified from the spleen of either naive or infected C57BL/6 mice by negative selection using CD4⁺ T cell isolation kit II according to the manufacturer's instructions (MACS, Miltenyi Biotec). Briefly, spleens were harvested from naive or infected mice at the indicated times (see below) and perfused with RPMI complete medium (without antibiotics), teased apart, and pressed gently through a sterile fine wire mesh. After red blood cell lysis, splenocytes were resuspended in sterile PBS containing 2 mM EDTA and separated using Lympholyte-M density gradient. Low-density cells at the interphase were collected and further purified by magnetic-activated cell sorting (MACS) negative selection as mentioned above. The enriched CD4⁺ T cells had > 95% purity as determined by FACS using anti-CD3 and anti-CD4 staining.

***In vivo* infection model.** In the studies with CD4KO mice, mice were injected i.p. with a single dose of 1 or 5×10^7 CFU of *S. suis* strain P1/7, based on previous work¹⁴. For the rest of the experiments, mice were injected with the low dose only (1×10^7 CFU). Surviving animals that had previously displayed clinical symptoms were boosted with a second dose of 1×10^7 CFU of *S. suis* strain P1/7 two weeks after initial infection. Bacteremia was monitored during the first 72 h post-primary infection or the first 24 h post-boost infection. For analysis of CD4⁺ T cell cytokine production, spleens of animals with clinical symptoms and positive bacteremia were harvested 96 h post-primary infection or 48 h post-boost infection (n = 2 per group x 5 individual experimental infections). Five hours prior to spleen collection, mice were injected i.p. with 200 µg of Brefeldin A, a protein transport inhibitor. Control (placebo) animals were similarly treated. Splenic CD4⁺ T cells were purified as described above, in the presence of Brefeldin A during all the purification steps. The selected time points are based on pre-trial analysis using different post-infection times (data not shown). Purified CD4⁺ T cells were analyzed for cytokine production by IC-FACS (see below).

For analysis of CD4⁺ T memory subpopulations, spleens (n = 3 per group x 2 individual experimental infections) were harvested at different times post-primary infection (4 and 7 days) and post-boost infection (2 and 7 days). Total splenocytes were analyzed for memory surface markers by multi-parametric FACS analysis (see below).

For quantification of total number of splenic CD3⁺CD4⁺ T cells or CD3⁺CD8⁺ T cells during the infection, spleens (n = 4 per group x 2 individual experimental infections) were collected at different times post-primary infection (2, 4, 6, and 8 days) and post-boost infection (2, 4, 6, and 8 days) and cells quantified by FACS (see below). In selected experiments, for the time point of 8 days post-primary infection, half-spleens were preserved in formalin for histopathological analysis in parallel to FACS analysis (see below).

To measure the *S. suis* specific primary antibody response, sera from infected mice were collected 14 days after primary infection (n = 10).

***Ex vivo* analysis of total splenocytes.** C57BL/6 mice were injected i.p with a dose of 5×10^7 CFU of *S. suis* strain P1/7. Control mice were injected with the vehicle solution (sterile THB) (n = 3 per group x 3 individual experimental infections). Spleens were harvested 6 h

post-infection. After red blood cell lysis and washing, total splenocytes were plated at a concentration of 5×10^6 cells/ml in RPMI complete medium (without antibiotics) in 24-well flat bottom plates, and incubated for 48 h. However, after the initial 6 h of *ex vivo* incubation, gentamycin was added to the culture to control the bacterial load and prevent cell toxicity as reported previously¹⁷. Total splenocytes from control (placebo) animals were similarly treated. Concanavalin A (ConA, 0.1 $\mu\text{g/ml}$) was used as positive control. Supernatants were harvested at the indicated time point for cytokine analysis by ELISA. In selected experiments, total splenocytes were incubated *ex vivo* for 14 or 48 h as described above. However, Brefeldin A (3 $\mu\text{g/ml}$) was added during the last 5 h, and either total splenocytes or CD4^+ T cells (MACS-isolated from the culture wells) were analyzed by IC-FACS (see below). The above described final culture conditions for *ex vivo* analysis were selected based on multiple pre-trials using different post-infection times (6 and 12 h) combined with 14, 24, 48, and 72 h *ex vivo* incubation times (data not shown). Non-cytotoxic culture conditions were selected.

***In vitro* DC-T cell coculture model.** For the coculture model, 1×10^5 DCs were plated in 48-well flat bottom plates for 1 h at 37°C with 5% CO_2 . Afterwards, 1×10^5 CFU of either *S. suis* WT strain P1/7 or ΔcpsF mutant strain (MOI: 1) were added to the wells for 1 h. Extracellular bacteria were killed using 100 $\mu\text{g/ml}$ of gentamycin and 5 $\mu\text{g/ml}$ of penicillin G as previously described⁹. After 1 h of antibiotic treatment and 3 washing steps, 5×10^5 freshly isolated CD4^+ T cells from naive mice (T cell: DC ratio of 5: 1) were added to the wells. Cocultures incubated with medium alone served as negative controls. Cocultures treated with either ConA (0.1 $\mu\text{g/ml}$) or phorbol myristate acetate (PMA, 15 ng/ml) + ionomycin (150 ng/ml) served as positive controls. For FACS analysis of surface marker expression, coculture plates were incubated for 3, 8, 24 and 48 h, prior to cell harvesting and FACS analysis. For T cell cytokine expression, coculture plates were incubated for 48 h, then centrifuged and replenished with fresh medium containing 10 ng/ml of mouse rIL-2. Plates were incubated for 3 days allowing a resting period for activated T cells. After 3 days, T cells were harvested, washed, and seeded into 96 well flat-bottom culture plates coated with 5 $\mu\text{g/ml}$ of anti-mouse-CD3 mAb at a final concentration of 1×10^5 cells/well. These plates were incubated for 48 h prior to supernatant harvesting for ELISA testing. Single cell cultures (either DCs or T cells alone) were also included as controls.

Cytokine and chemokine quantification by ELISA. Levels of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , CCL3 (MIP-1 α), and CXCL9 (MIG) in cell culture supernatants were measured by sandwich ELISA using pair-matched antibodies from R&D Systems, according to the manufacturer's recommendations. Twofold dilutions of recombinant murine cytokines were used to generate the standard curves. Sample dilutions giving optical density readings in the linear portion of the appropriate standard curve were used to quantify the levels of each cytokine. Absorbance was measured at 450 nm. The results are from at least three independent ELISA measurements.

FACS analysis. For multi-parametric IC-FACS of *ex vivo* cultures of total splenocytes, 10^6 cells were washed and treated for 15 min on ice with FcR-blocking reagent (Fc γ III/II R α Ab) in sorting buffer (PBS-1% fetal bovine serum) prior to surface staining with PE-conjugated anti-CD19, PE-Cy7-conjugated anti-NK-1.1, FITC-conjugated anti-CD3 and/or PE-conjugated CD69 mAbs for 30 min on ice. Cells were then fixed and permeabilized using IC Fixation/Permeabilization eBioscience kit as per the manufacturer's recommendation. Following fixation and permeabilization, intracellular staining was performed with APC-conjugated anti-IFN- γ or anti-TNF- α mAbs for 45 min at room temperature.

For IC-FACS of MACS-purified CD4⁺ T cells from *in vivo* or *ex vivo* experiments, cells (prepared as described above) were stained for 20 min at room temperature with PE-conjugated mAbs directed against the following intracellular molecules: IFN- γ , TNF- α , IL-2, or IL-10.

For multi-parametric FACS analysis of CD4⁺ T memory subpopulations, cells were surface stained with FITC-conjugated anti-CD3, PE-conjugated anti-CD4, PE-Cy7-conjugated anti-CD44, BV421-conjugated anti-CD62L, and APC-conjugated anti-IL-7R α ⁺ mAbs for 45 min on ice. Cells were gated on CD3⁺CD4⁺ cells, followed by gating CD62L⁺CD44^{low} (naive T cells), CD62L⁻CD44^{high} (effector [memory] T cells), and CD62L⁺CD44^{high} (central memory T cells), as shown in Fig. 6A. Analysis of IL-7R α expression was used to further identify memory cells (CD44^{high}IL-7R α ⁺) within these two subsets as previously described¹⁷.

For cell surface staining of *in vitro* cocultures, cells were stained with FITC-conjugated anti-CD4 mAb for 30 min on ice followed by washing and staining for 30 min with PE-conjugated anti-CD69 or CD40L mAbs.

For quantification of splenic CD4⁺ T cells during the infection, splenic cells collected at different times post-primary and post-boost infection were stained with PE-Cy5-conjugated anti-CD3 mAb for 30 min on ice followed by washing and staining for 30 min with FITC-conjugated anti-CD4 and PE-conjugated anti-CD8 mAbs.

Histopathology of spleen sections. Formalin-fixed spleen samples were cut into two, routinely processed and embedded in paraffin. Slides were prepared from 4 µm-thick sections and stained with hematoxylin-eosin-phloxin-saffron. The level of lymphoid depletion (lymphatic nodules), granulopoiesis (increased white pulp), and extramedullary hematopoiesis was evaluated on a 4-grade scale (grade 4 being the most severe).

ELISA for *S. suis*-specific antibodies. Titers of *S. suis*-specific total Ig and IgG subclasses in mouse sera were determined by ELISA. Polysorp immunoplates were coated with 100 µl/well of *S. suis* strain P1/7 (1×10^7 CFU/ml), allowed to dry for 48 h and fixed with 50 µl/well of methanol for 90 min. Before use, plates were washed three times with PBS containing 0.05% Tween-20, and incubated with 100 µl of serial dilutions of mouse sera for 1 h at room temperature. Bound antibodies were detected by incubation with peroxidase-conjugated goat anti-mouse total Ig [IgG+ IgM], IgG1, IgG2b, or IgG2c antibodies for 1 h at room temperature. The plates were developed with TMB substrate and absorbance was measured at 450 nm.

OVA immunization studies. Mice were infected with *S. suis* WT strain P1/7 (1×10^7 CFU) two days prior to immunization with 10 µg of OVA formulated with 20 µg of CpG ODN 1826 as adjuvant. A boost immunization with the same OVA-CpG ODN formulation was given at day 14 post-primary immunization. Serum levels of OVA-specific total Ig, IgG1, IgG2b, and IgG2c were measured by ELISA at 14 and 21 days post-primary immunization. Briefly, polysorp immuno plates were coated overnight at 4°C with 100 µl of 50 µg/ml of OVA in

PBS. After 2 h-blocking with 1% casein solution in PBS-0.05% Tween-20, serial dilutions of serum samples were added and incubated for 1 h at room temperature. After washing, secondary antibodies specific for total Ig and for each IgG subclass were added as described above.

Statistical analyses. Cytokine and FACS data are expressed as mean \pm SEM and analyzed for significance using Student's unpaired *t*-test. Serum antibody levels were expressed as endpoint titers, the reciprocal of the highest dilution that yielded the background optical density plus 3 times the standard deviation (OD + 3SD), and were analyzed for significance using ANOVA analysis. For correlation of OVA-specific antibody levels and clinical signs of *S. suis* disease, the antibody production index was obtained by dividing the antibody levels of infected mice (showing either mild or severe clinical signs) by those of control mice. All analyses were performed using the Sigma Plot System (v.9; Systat Software). A $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

Acknowledgements

This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada [NSERC #342150 to MS] and by Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and Canada Foundation for Innovation (CFI) through grants to JT [CIHR #93592]. MPL and PL are the recipients of PhD Awards granted by NSERC and by the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies, respectively. CL is the recipient of a Master’s Award granted by NSERC and of a Zoetis Investment in Innovation Award. The authors thank Sonia Lacouture for technical help.

Author Contributions

M.P.L. conducted most of the experiments in C57BL/6 mice and wrote the manuscript, with the help of D.C.; C.L. conducted the experiments for the memory CD4⁺ T cell response; P.L. conducted the experiments with CD4KO mice; T.G. performed the FACS analysis for memory CD4⁺ T cells; M.O.B.B. performed the histological analysis; J.T., M.G., and M.S. were involved in the study design and results interpretation. All authors reviewed the manuscript.

Competing Financial Interests

The authors declare no competing financial interests.

References

- 1 Gottschalk, M., Xu, J., Calzas, C. & Segura, M. *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? *Future Microbiol* **5**, 371-391 (2010).
- 2 Fittipaldi, N., Segura, M., Grenier, D. & Gottschalk, M. Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. *Future Microbiol* **7**, 259-279 (2012).
- 3 Steinman, R. M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* **9**, 271-296 (1991).
- 4 Joffre, O., Nolte, M. A., Sporri, R. & Reis e Sousa, C. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol Rev* **227**, 234-247 (2009).
- 5 McKinstry, K. K., Strutt, T. M. & Swain, S. L. Regulation of CD4+ T-cell contraction during pathogen challenge. *Immunol Rev* **236**, 110-124 (2010).
- 6 Knosp, C. A. & Johnston, J. A. Regulation of CD4+ T-cell polarization by suppressor of cytokine signalling proteins. *Immunology* **135**, 101-111 (2012).
- 7 Segura, M. *Streptococcus suis* vaccines: candidate antigens and progress. *Expert Rev Vaccines* **14**, 1587-1608 (2015).
- 8 Lecours, M. P. *et al.* Critical role for *Streptococcus suis* cell wall modifications and sulysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells. *J Infect Dis* **204**, 919-929 (2011).
- 9 Lecours, M. P., Segura, M., Fittipaldi, N., Rivest, S. & Gottschalk, M. Immune receptors involved in *Streptococcus suis* recognition by dendritic cells. *PLoS ONE* **7**, e44746 (2012).
- 10 Lecours, M. P. *et al.* Characterization of porcine dendritic cell response to *Streptococcus suis*. *Vet Res* **42**, 72 (2011).
- 11 Meijerink, M. *et al.* Immunomodulatory effects of *Streptococcus suis* capsule type on human dendritic cell responses, phagocytosis and intracellular survival. *PLoS ONE* **7**, e35849 (2012).
- 12 Segura, M., Matte, C., Thawani, N., Su, Z. & Stevenson, M. M. Modulation of malaria-induced immunopathology by concurrent gastrointestinal nematode infection in mice. *Int J Parasitol* **39**, 1525-1532 (2009).
- 13 Dominguez-Punaro, M. C. *et al.* *Streptococcus suis* serotype 2, an important swine and human pathogen, induces strong systemic and cerebral inflammatory responses in a mouse model of infection. *J Immunol* **179**, 1842-1854 (2007).

- 14 Dominguez-Punaro M. C., Segura, M., Radzioch, D., Rivest, S. & Gottschalk, M. Comparison of the susceptibilities of C57BL/6 and A/J mouse strains to *Streptococcus suis* serotype 2 infection. *Infect Immun* **76**, 3901-3910 (2008).
- 15 Lachance, C. *et al.* Exacerbated type II interferon response drives hypervirulence and toxic shock by an emergent epidemic strain of *Streptococcus suis*. *Infect Immun* **81**, 1928-1939 (2013).
- 16 Veckman, V. *et al.* Lactobacilli and streptococci induce inflammatory chemokine production in human macrophages that stimulates Th1 cell chemotaxis. *J Leukoc Biol* **74**, 395-402 (2003).
- 17 Clarke, D. *et al.* Group B *Streptococcus* induces a robust IFN- γ response by CD4⁺ T cells in an *in vitro* and *in vivo* model. *J Immunol Res* Article ID 5290604 (2016).
- 18 Oh, H. & Ghosh, S. NF-kappaB: roles and regulation in different CD4(+) T-cell subsets. *Immunol Rev* **252**, 41-51 (2013).
- 19 Ng, T. H. *et al.* Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Front Immunol* **4**, 129 (2013).
- 20 Charland, N., Harel, J., Kobisch, M., Lacasse, S. & Gottschalk, M. *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology* **144 (Pt 2)**, 325-332 (1998).
- 21 Lecours, M. P. *et al.* Sialylation of *Streptococcus suis* serotype 2 is essential for capsule expression but is not responsible for the main capsular epitope. *Microbes Infect* **14**, 941-950 (2012).
- 22 Lauzurica, P. *et al.* Phenotypic and functional characteristics of hematopoietic cell lineages in CD69-deficient mice. *Blood* **95**, 2312-2320 (2000).
- 23 LeMessurier, K., Hacker, H., Tuomanen, E. & Redecke, V. Inhibition of T cells provides protection against early invasive pneumococcal disease. *Infect Immun* **78**, 5287-5294 (2010).
- 24 Klinman, D. M., Currie, D., Gursel, I. & Verthelyi, D. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunol Rev* **199**, 201-216 (2004).
- 25 Vega-Ramos, J. *et al.* Inflammation conditions mature dendritic cells to retain the capacity to present new antigens but with altered cytokine secretion function. *J Immunol* **193**, 3851-3859 (2014).
- 26 Vega-Ramos, J., Roquilly, A., Asehnoune, K. & Villadangos, J. A. Modulation of dendritic cell antigen presentation by pathogens, tissue damage and secondary inflammatory signals. *Curr Opin Pharmacol* **17**, 64-70 (2014).

- 27 Saumyaa *et al.* An immunosuppressive property within the cell wall of *Streptococcus pneumoniae* that inhibits the generation of a T follicular helper, germinal center, and plasma cell response to a co-immunized heterologous protein. *Infect Immun* **81**, 3426-3433 (2013).
- 28 Wu, Y. *et al.* Lethal coinfection of influenza virus and *Streptococcus pneumoniae* lowers antibody response to influenza virus in lung and reduces numbers of germinal center B cells, T follicular helper cells, and plasma cells in mediastinal lymph Node. *J Virol* **89**, 2013-2023 (2015).
- 29 Vanier, G., Segura, M., Lecours, M. P., Grenier, D. & Gottschalk, M. Porcine brain microvascular endothelial cell-derived interleukin-8 is first induced and then degraded by *Streptococcus suis*. *Microb Pathog* **46**, 135-143 (2009).
- 30 Stockinger, B., Zal, T., Zal, A. & Gray, D. B cells solicit their own help from T cells. *J Exp Med* **183**, 891-899 (1996).

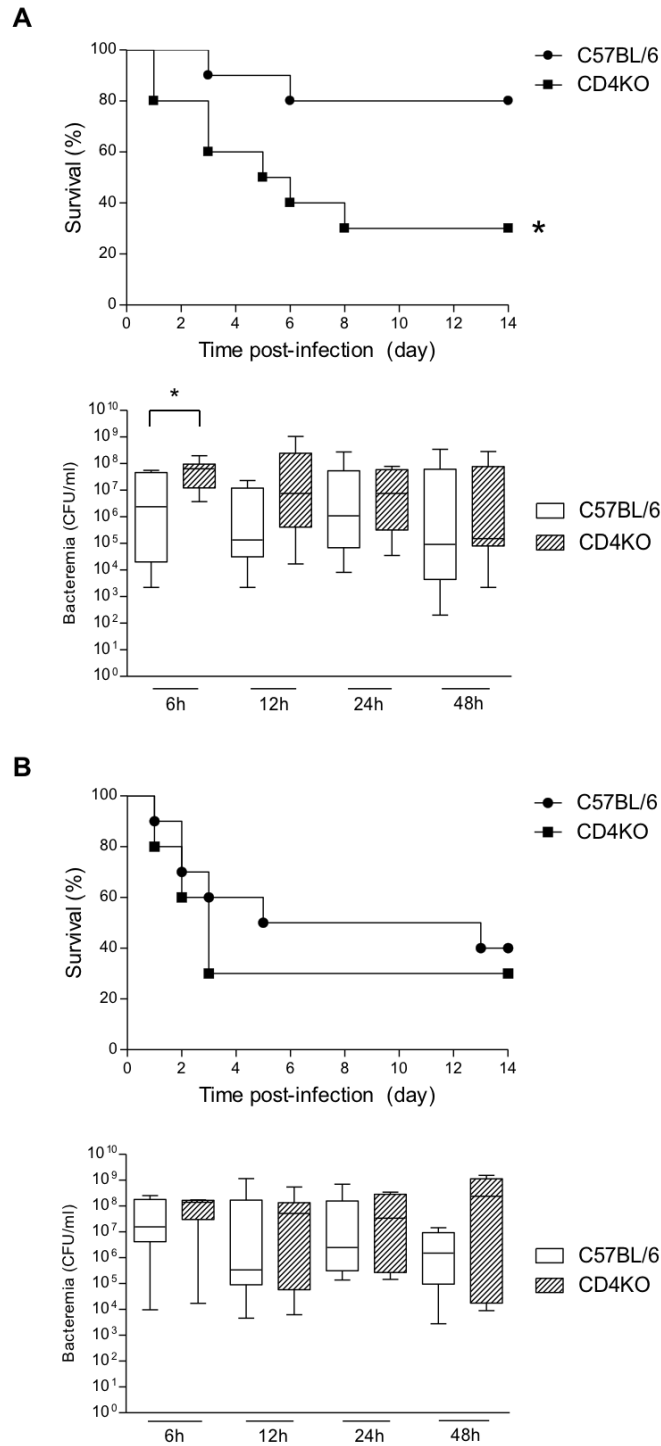


Figure 1. CD4KO are more susceptible to *S. suis* infection than control C57BL/6 mice at a low infectious dose. Mice (n = 10 per group x 2 individual experimental infections) were infected intraperitoneally with (A) 1×10^7 CFU or (B) 5×10^7 CFU of *S. suis* wild-type strain P1/7. Survival levels were recorded and systemic bacteremia levels of infected mice was monitored at 6, 12, 24, and 48 h after infection. Blood was drawn by tail puncture and serially diluted in PBS prior to plating on blood agar dishes. Individual colonies were counted and data expressed as CFU/mL of blood. * $P < 0.05$, indicates statistically significant difference compared to control mice.

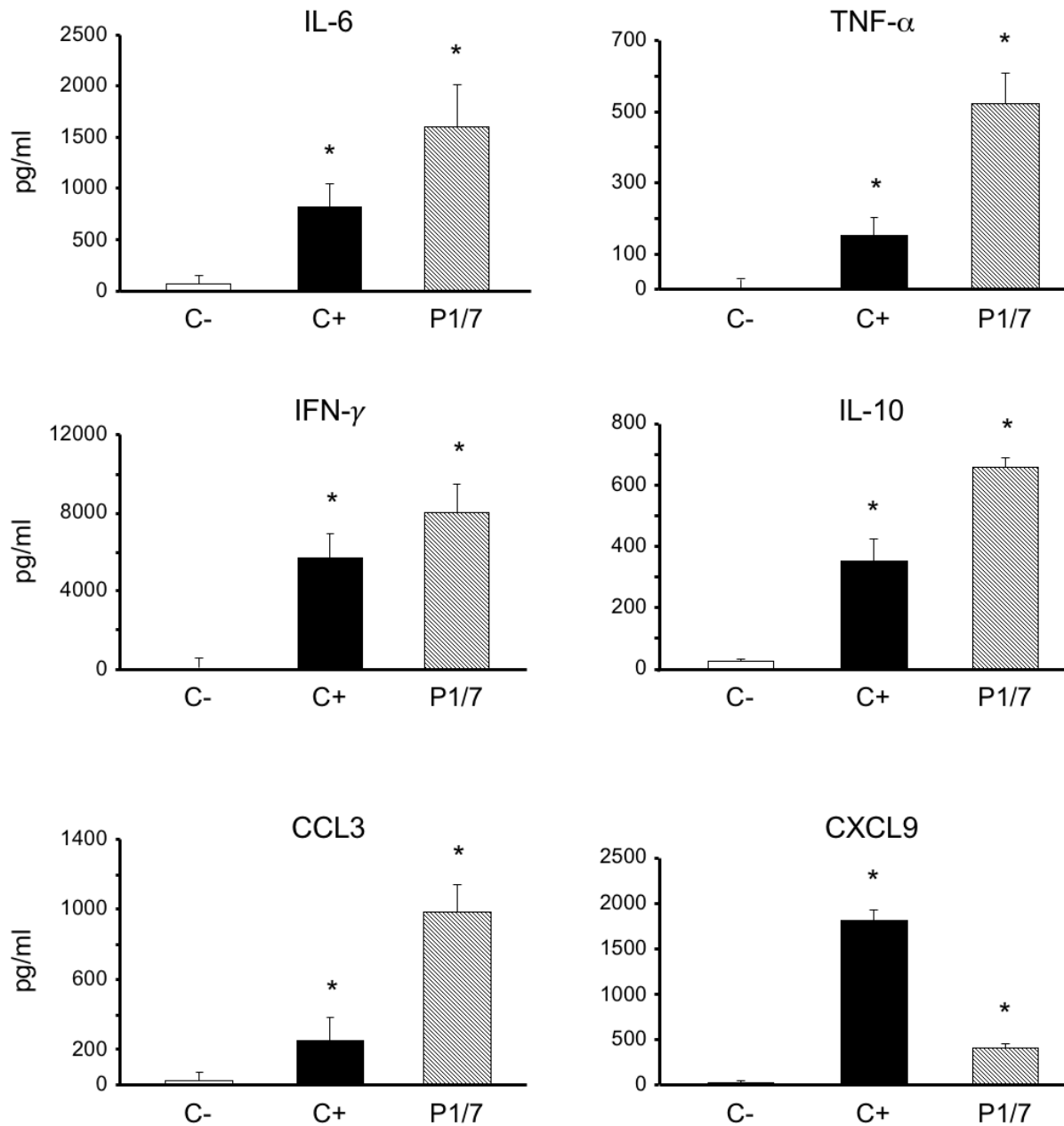


Figure 2. Total splenocytes produce *ex vivo* type-1 pro-inflammatory cytokines in response to *S. suis* systemic infection. Mice were infected intraperitoneally with a dose of 5×10^7 CFU of *S. suis* wild-type strain P1/7 (n = 3 per group x 3 individual experimental infections). Spleens were harvested 6 h post-infection and total splenocytes plated at 5×10^6 cells/well. After 6 h of incubation, gentamycin was added to the culture to prevent cell toxicity. Cells were then incubated for 48 h and supernatants were collected for cytokine analysis by ELISA. Non-stimulated cells from mock-infected animals served as negative control for basal expression (C-). Cells stimulated with Concanavalin A (0.1 μ g/ml) were used as positive control (C+). Data are expressed as mean \pm SEM (in pg/ml) from 3 different experimental infections. * $P < 0.05$ denotes values that are significantly higher than those obtained with splenocytes from non-infected mice (C-).

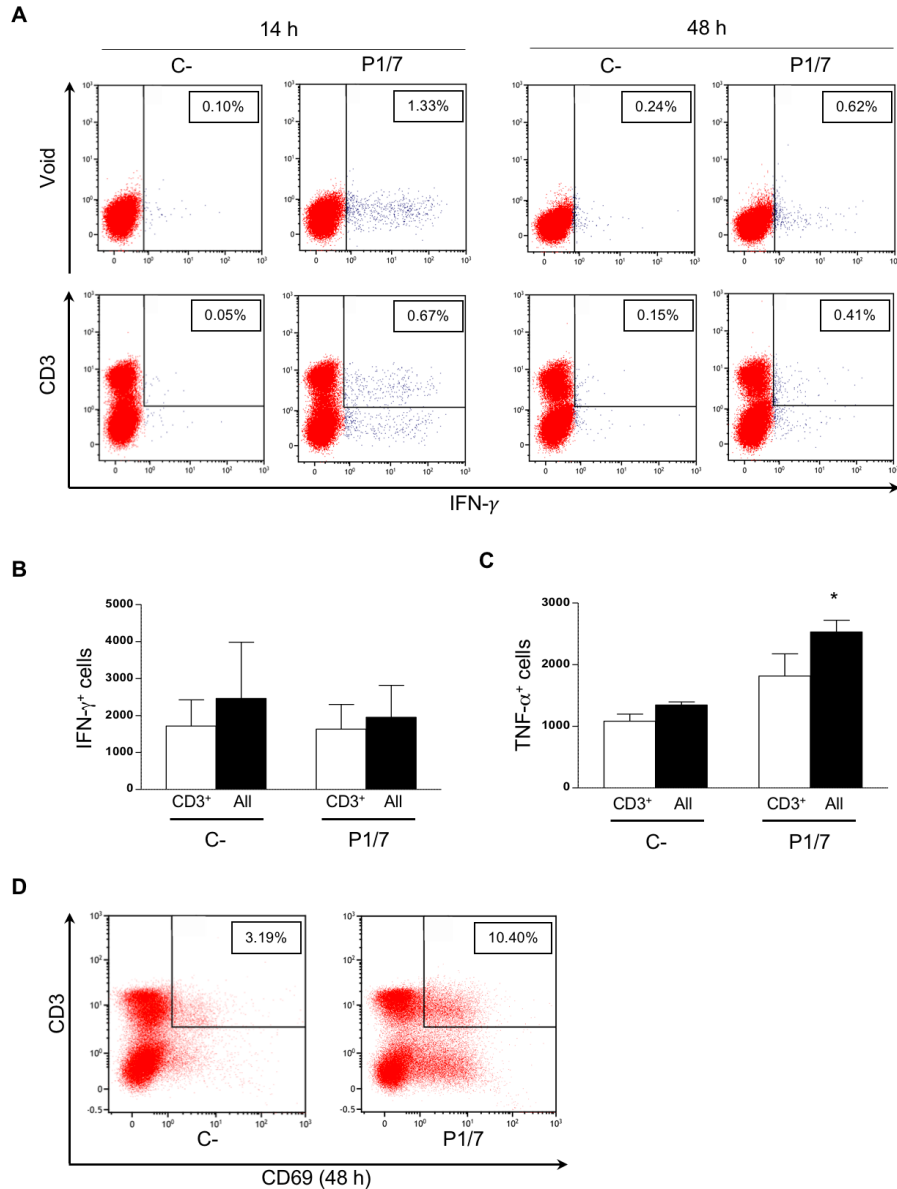


Figure 3. CD3⁺ T cells produce low *ex vivo* levels of IFN-γ and show poor activation in response to *S. suis* systemic infection. Mice were infected intraperitoneally with a dose of 5×10^7 CFU of *S. suis* wild-type strain P1/7 ($n = 3$ per group \times 3 individual experimental infections). Spleens were harvested 6 h post-infection and total splenocytes plated at 5×10^6 cells/well. After 6 h of incubation, gentamycin was added to the culture to prevent cell toxicity. Non-stimulated cells from mock-infected animals served as negative control for basal expression (C-). Total splenocytes were incubated for 14 h or 48 h with Brefeldin A (3 μ g/ml) added during the last 5 h of incubation. Cells were harvested and intracellularly stained for (A, B) IFN-γ, (C) TNF-α or surface stained for (D) CD69 in combination with several surface markers for multi-parametric FACS analysis. (A, D) Representative data from 3 different experimental infections based on CD3⁺ population or total splenic population (Void). (B, C) Number of either IFN-γ⁺ or TNF-α⁺ cells within the CD3⁺ population or within total splenic population (All) at 48 h. Data are expressed as mean \pm SEM from 3 different experimental infections. FACS was performed using a FACSCanto II instrument. Fifty thousand gated events were acquired per sample and data analysis was performed using FACSDiva™ software. Fluorescence Minus One (FMO) control staining was performed for proper analysis and gating of target cells. * $P < 0.05$, indicates statistically significant difference compared to negative control cells (C-).

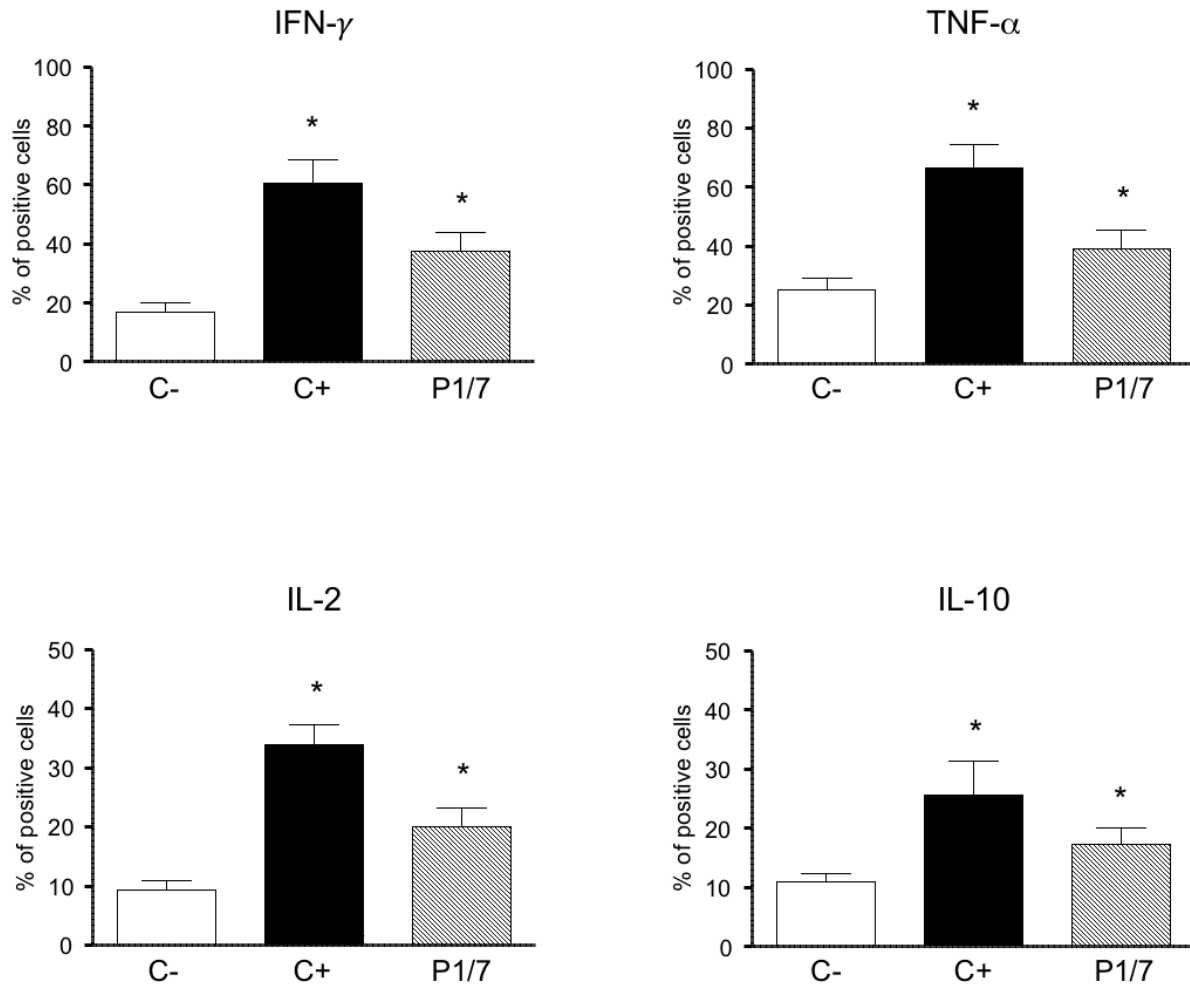


Figure 4. CD4⁺ T cells produce low *ex vivo* levels of IFN- γ , TNF- α , and IL-2 in response to *S. suis* systemic infection. Mice were infected intraperitoneally with a dose of 5×10^7 CFU of *S. suis* wild-type strain P1/7 (n = 3 per group x 3 individual experimental infections). Spleens were harvested 6 h post-infection and total splenocytes plated at 5×10^6 cells/well. After 6 h of incubation, gentamycin was added to the culture to prevent cell toxicity. Non-stimulated cells from mock-infected animals served as negative control for basal expression (C-). Cells stimulated with Concanavalin A (0.1 μ g/ml) were used as positive control (C+). Total splenocytes were incubated for 48 h. Brefeldin A (3 μ g/ml) was added during the last 5 h of incubation and CD4⁺ T cells were MACS-isolated from the culture, stained intracellularly for different cytokines and analyzed by FACS. Data are expressed as mean \pm SEM (in % of positive cells) from 3 individual experimental infections. FACS was performed using a FACSCalibur instrument. Twenty thousand gated events were acquired per sample and data analysis was performed using CellQuest software. * $P < 0.05$, indicates statistically significant difference compared to negative control cells (C-).

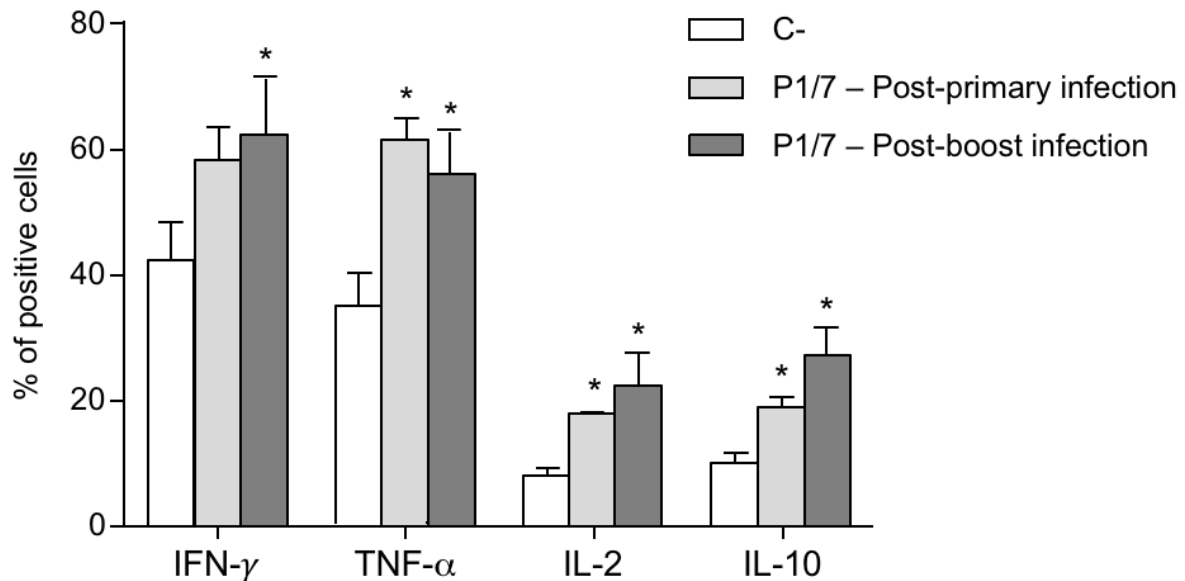


Figure 5. CD4⁺ T cells produce similar levels of IFN- γ , TNF- α , IL-2, and IL-10 during primary and secondary *S. suis* infections. Mice were infected intraperitoneally with a dose of 1×10^7 CFU of *S. suis* wild-type strain P1/7. Surviving animals who had previously displayed clinical symptoms were boosted with a second dose of 1×10^7 CFU of *S. suis* wild-type strain P1/7 two weeks after initial infection. Spleens of animals with clinical symptoms and positive bacteremia were harvested 96 h post-primary infection or 48 h post-boost infection ($n = 2$ per group \times 5 individual experimental infections). Five hours prior to spleen collection, mice were injected with Brefeldin A (200 μ g). Non-infected control animals were similarly treated. Splenic CD4⁺ T cells were MACS-purified, stained intracellularly for different cytokines and analyzed by FACS. Cytokine basal expression levels in non-infected animals were similar at 96 h post-primary mock-infection and 48 h post-secondary mock-infection. Data from the latter time point were selected for the figure (C-). Data are expressed as mean \pm SEM (in % of positive cells) from 5 individual experimental infections. FACS was performed using a FACSCalibur instrument. Twenty thousand gated events were acquired per sample and data analysis was performed using CellQuest software. * $P < 0.05$, indicates statistically significant difference compared to non-infected mice.

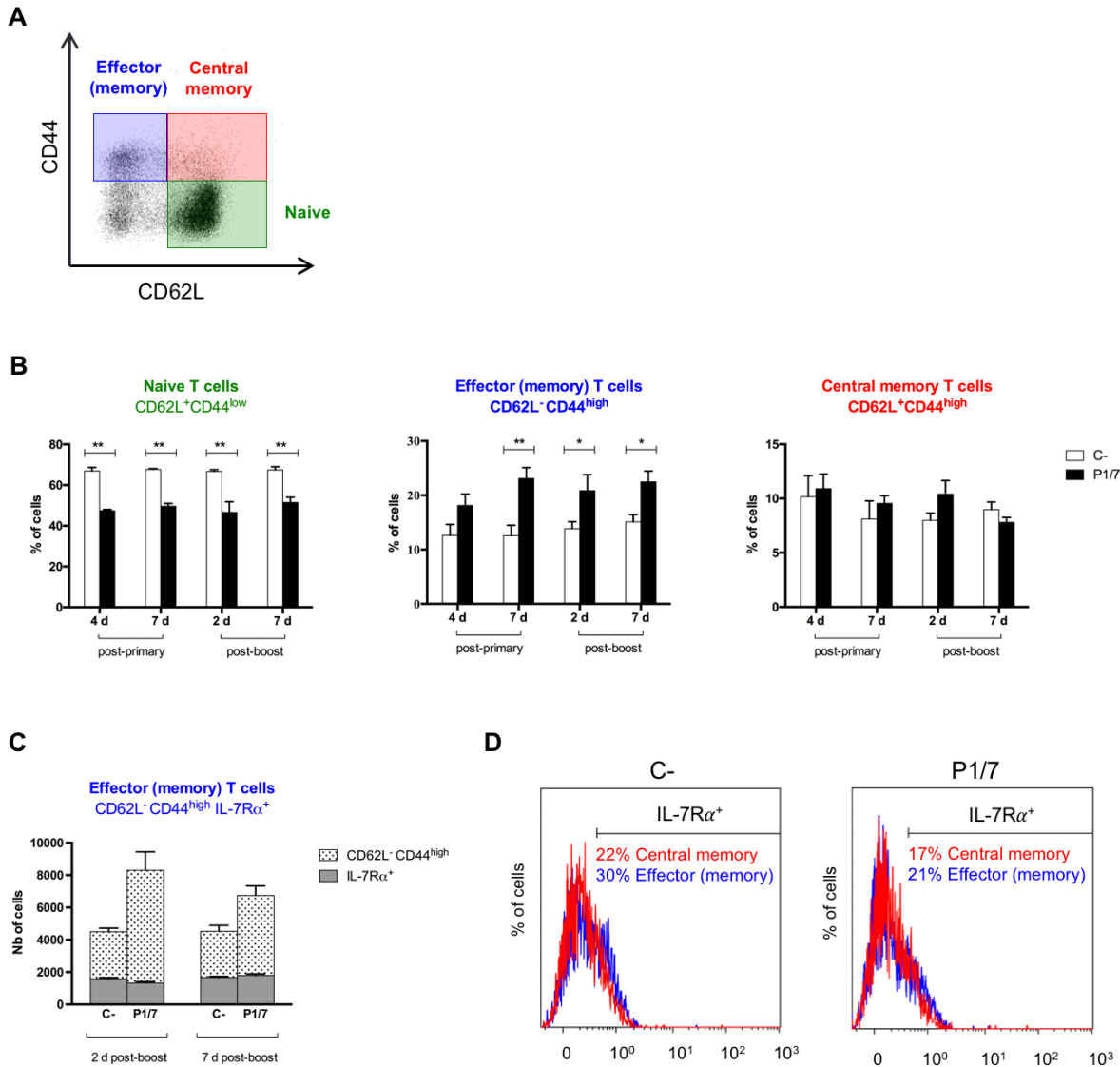


Figure 6. *S. suis* induces no expansion of the effector memory and central memory CD4⁺ T cell splenic subsets during primary and secondary infections. Mice were infected intraperitoneally with a dose of 1×10^7 CFU of *S. suis* wild-type strain P1/7. Surviving animals who had previously displayed clinical symptoms were boosted with a second dose of 1×10^7 CFU of *S. suis* wild-type strain P1/7 two weeks after initial infection. Spleens of animals with clinical symptoms and positive bacteremia were harvested 96 h post-primary infection or 48 h post-boost infection ($n = 3$ per group \times 2 individual experimental infections). Total splenocytes were stained and analyzed by multi-parametric FACS. (A, B) Cells were gated on CD3⁺CD4⁺ cells, followed by gating CD62L⁻CD44^{low} (naive T cells), CD62L⁻CD44^{high} (effector [memory] T cells) and CD62L⁺CD44^{high} (central memory T cells). (C) A fifth surface marker, IL-7Rα⁺, was used to further identify memory cells (CD44^{high}IL-7Rα⁺) within the effector (memory) subset. Data from the late time points were selected for the figure. (D) IL-7Rα⁺ cells reflect memory cells within the effector (memory) subset (blue histogram) and central memory subset (red histogram). Histograms from representative non-infected and infected mice 2 days post-boost infection were selected for the figure. (B, C) Data are expressed as mean \pm SEM. FACS was performed using a FACSCantoII instrument. Thirty thousand events gated on CD3⁺CD4⁺ cells were acquired per sample and data analysis was performed using Kaluza® Flow Analysis software. Quadrants were drawn based on PE-Cy7- and BV421-control stains and were plotted on logarithmic scales. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, indicate statistically significant difference compared to non-infected mice.

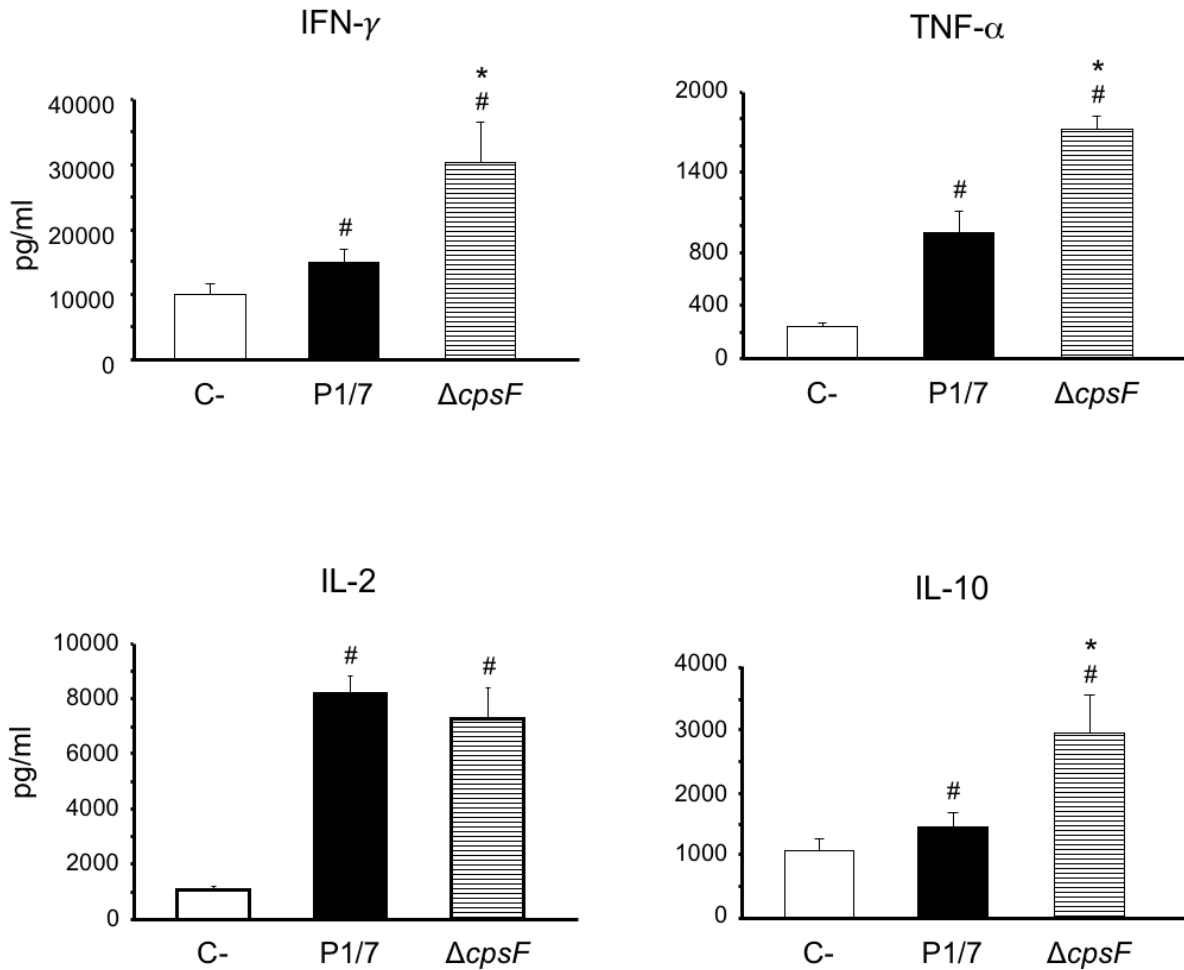


Figure 7. *S. suis* capsular polysaccharide interferes with cytokine production by CD4⁺ T cells *in vitro*. Bone marrow-derived dendritic cells (bmDCs) were infected with either *S. suis* wild-type strain P1/7 or its non-encapsulated isogenic mutant $\Delta cpsF$ (MOI: 1) for 1 h. Extracellular bacteria were killed by antibiotic treatment and cultures washed prior to addition of freshly isolated splenic CD4⁺ T cells from naive mice (T cell: DC ratio of 5: 1). Cocultures were incubated for 48 h, resuspended in fresh medium containing 10 ng/ml of IL-2 for 72 h (resting period) and then transferred to anti-CD3 coated plates for 48 h. Supernatants were then collected and cytokines quantified by ELISA. Non-stimulated cocultures served as negative controls (C-) for basal expression. Data are expressed as mean \pm SEM (in pg/ml) from 5 different experiments. #*P* < 0.05, indicates statistically significant differences compared to negative controls (C-). **P* < 0.05, indicates statistically significant differences between cocultures infected with wild-type strain P1/7 and those infected with the non-encapsulated mutant $\Delta cpsF$.

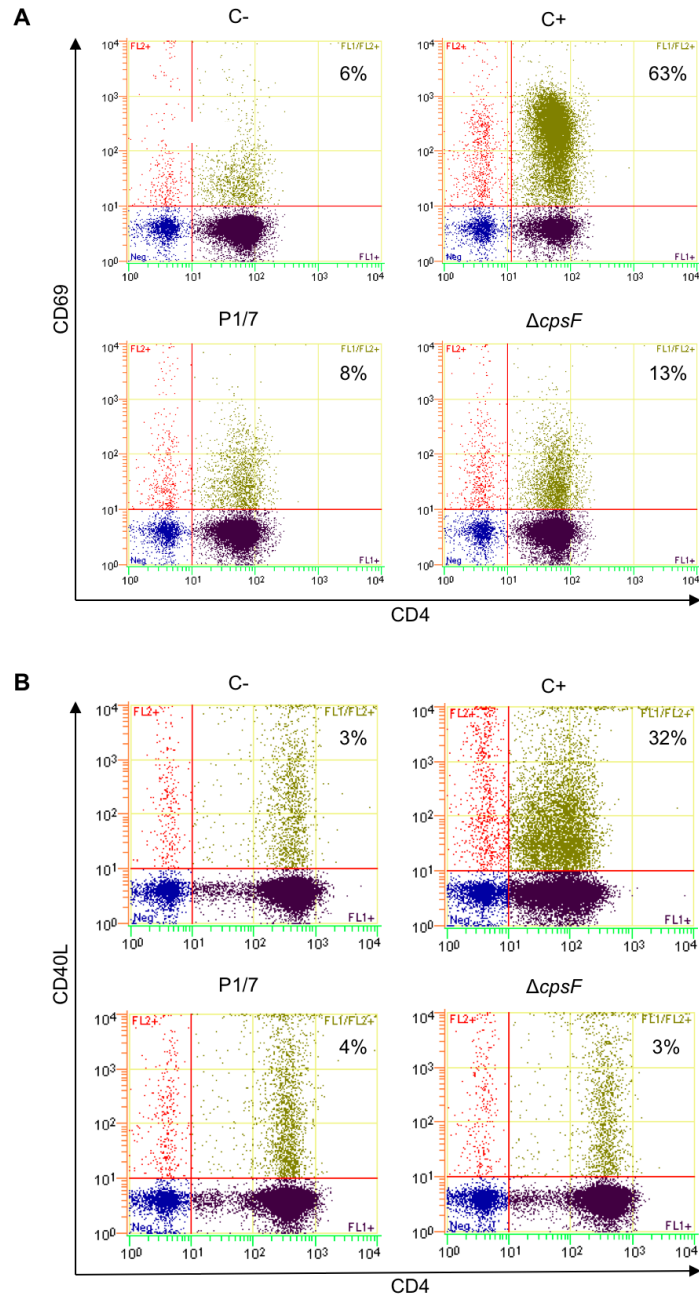


Figure 8. *S. suis* modulates CD4⁺ T cell surface expression of CD69 and CD40L *in vitro*. Bone marrow-derived dendritic cells (bmDCs) were infected with either *S. suis* wild-type strain P1/7 or its non-encapsulated isogenic mutant $\Delta cpsF$ (MOI: 1) for 1 h. Extracellular bacteria were killed by antibiotic treatment and cultures washed prior to addition of freshly isolated splenic CD4⁺ T cells from naive mice (T cell: DC ratio of 5: 1). Cocultures were incubated for 8 h, cells harvested and (A) CD69 or (B) CD40L expression analyzed by FACS. Cocultures incubated with medium alone served as negative controls (C-). Cocultures treated with either Concanavalin (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or phorbol myristate acetate (15 ng/ml) + ionomycin (150 ng/ml) served as positive controls (C+) for CD69 and CD40L expression, respectively. FACS was performed using a Cell Lab QuantaTM SC MPL MultiPlate Loader instrument. Twenty thousand gated events were acquired per sample and data analysis was performed using Cell Lab Quanta Collection/Analysis software. Quadrants were drawn based on FITC- and PE-control stains and were plotted on logarithmic scales. Representative data from 3 different experiments. Numbers in the upper quadrants indicate the % of CD4⁺CD69⁺ or CD4⁺CD40L⁺ cells.

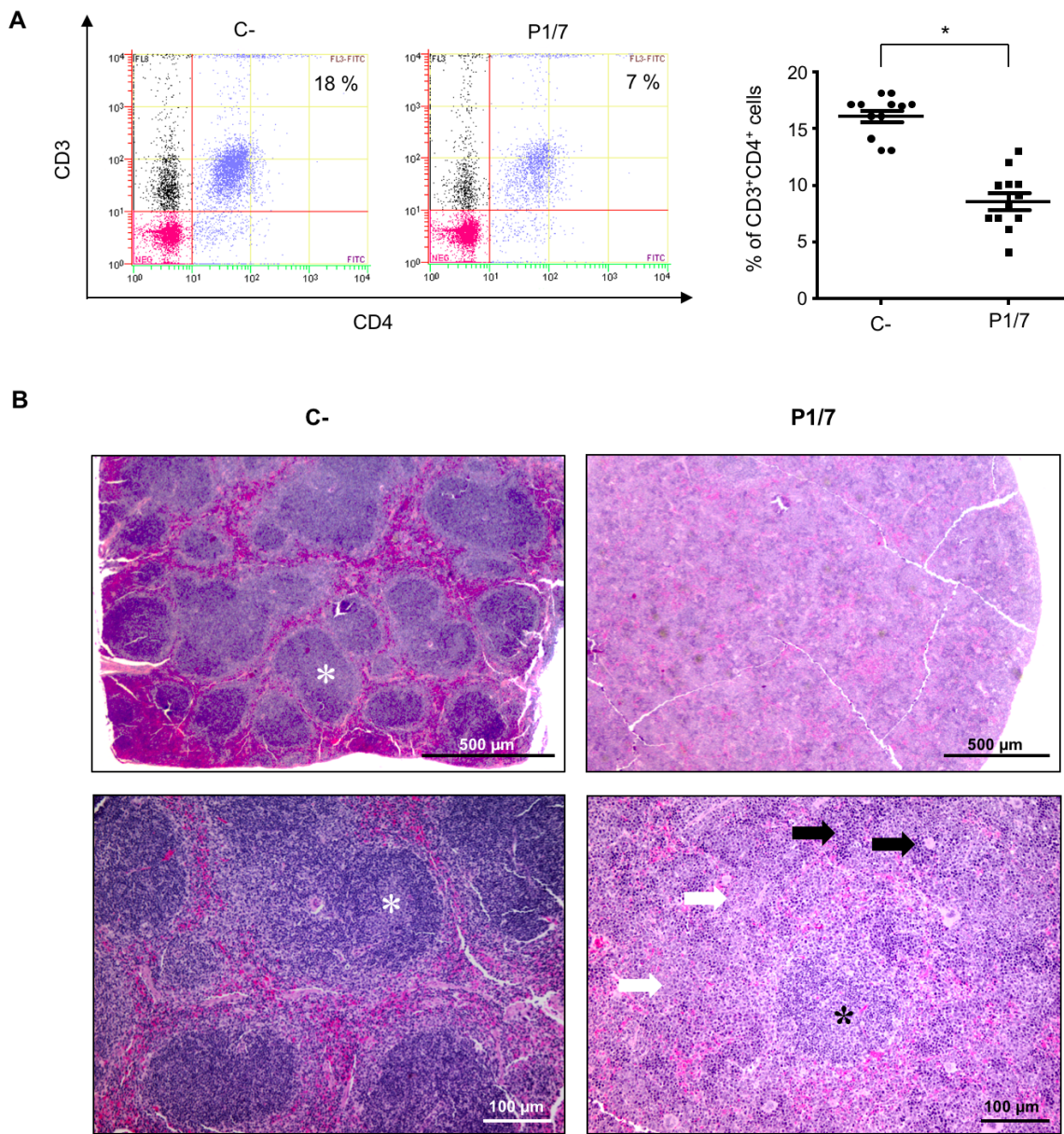


Figure 9. Splens from *S. suis*-infected mice show reduced numbers of CD4⁺ T cells concurrently with histopathological changes, as compared to control mice. Mice were infected intraperitoneally with a dose of 1×10^7 CFU of *S. suis* wild-type strain P1/7. Non-infected control animals were also included. (A) At 8 days post-primary infection, % of CD3⁺CD4⁺ T cells in the spleens of infected and control animals were evaluated by FACS. Representative data (left) and individual mouse data (right) are presented from 3 experimental infections (n = 12). FACS was performed using a Cell Lab QuantaTM SC MPL MultiPlate Loader instrument. Twenty thousand gated events were acquired per sample and data analysis was performed using Cell Lab Quanta Collection/Analysis software. Quadrants were drawn based on FITC- and PE-Cy5-control stains and were plotted on logarithmic scales. (B) In parallel to FACS analysis, half-spleens were preserved in formalin for histopathological analysis. Spleen sections from infected animals were compared to controls and the level of lymphoid depletion (lymphatic nodules – asterisks), granulopoiesis (white arrows), and extramedullary hematopoiesis (black arrows) was evaluated on a 4-grade scale (grade 4 being the most severe). 2.5X images (top panel) show a reduction in the number and cellularity of lymphatic nodules. 10X images (bottom panel) show an increase in extramedullary hematopoiesis as well as in granulopoiesis.

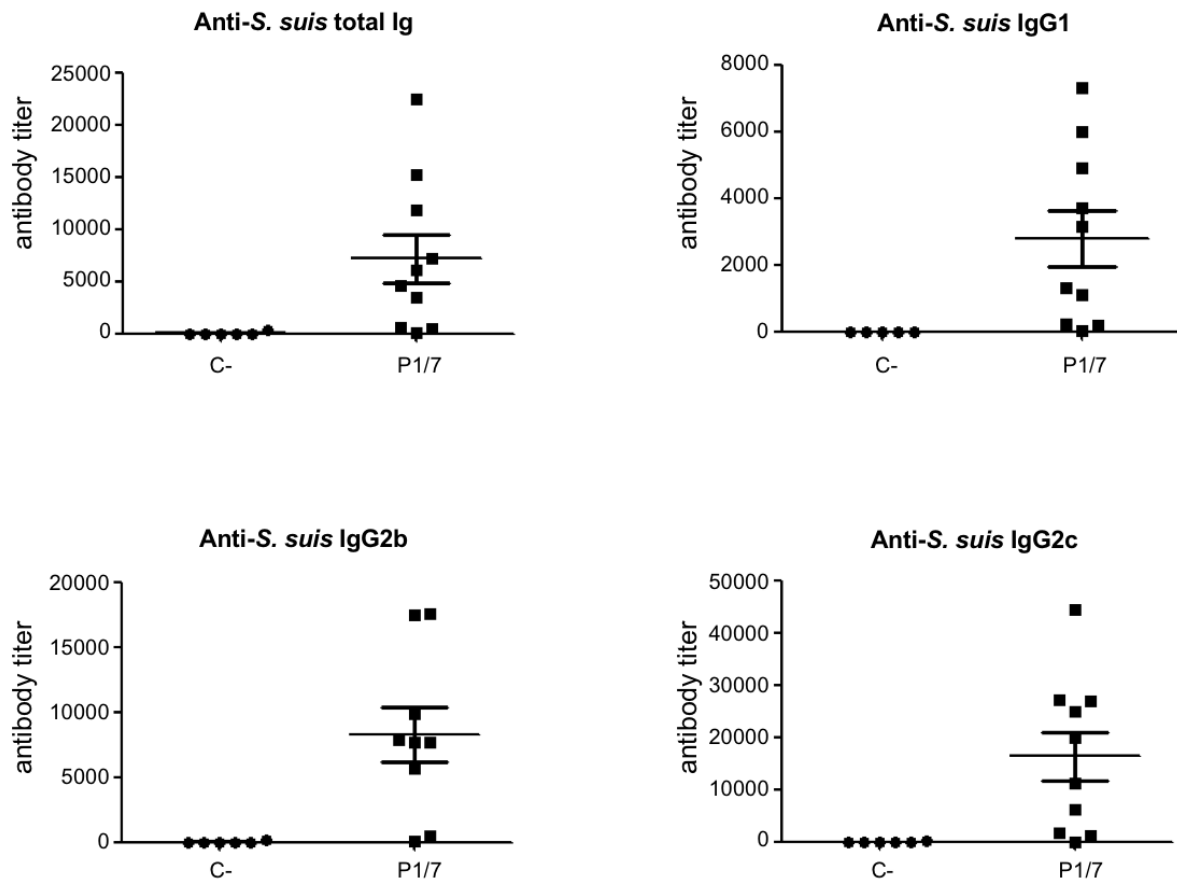


Figure 10. *S. suis* induces low serum levels of specific antibodies during a primary infection. Mice (n = 10) were infected with a dose of 1×10^7 CFU of *S. suis* wild-type strain P1/7 and sera collected two weeks post-infection. Total Ig [IgG+IgM], IgG1, IgG2b, and IgG2c anti-*S. suis* titers were determined by ELISA. C- represents a pool of control mice (n = 6) injected with vehicle solution.

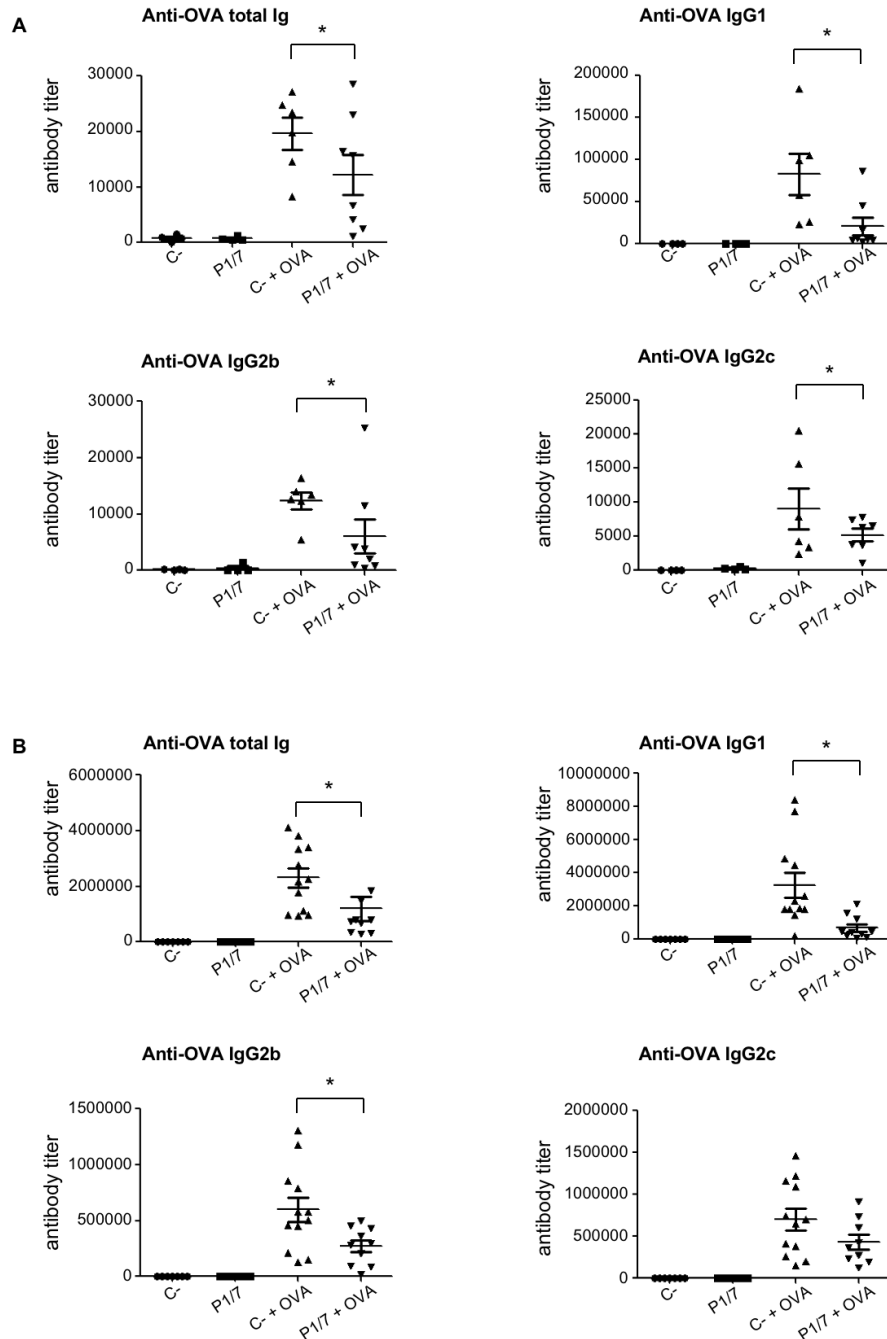
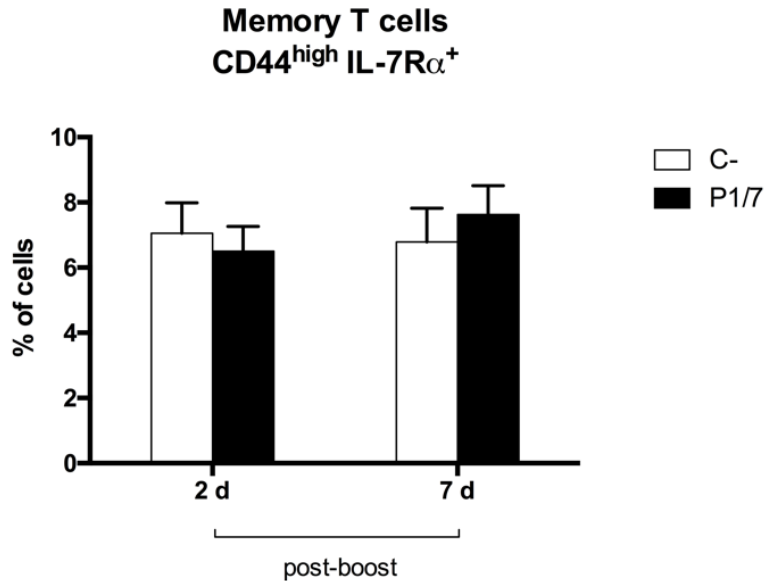


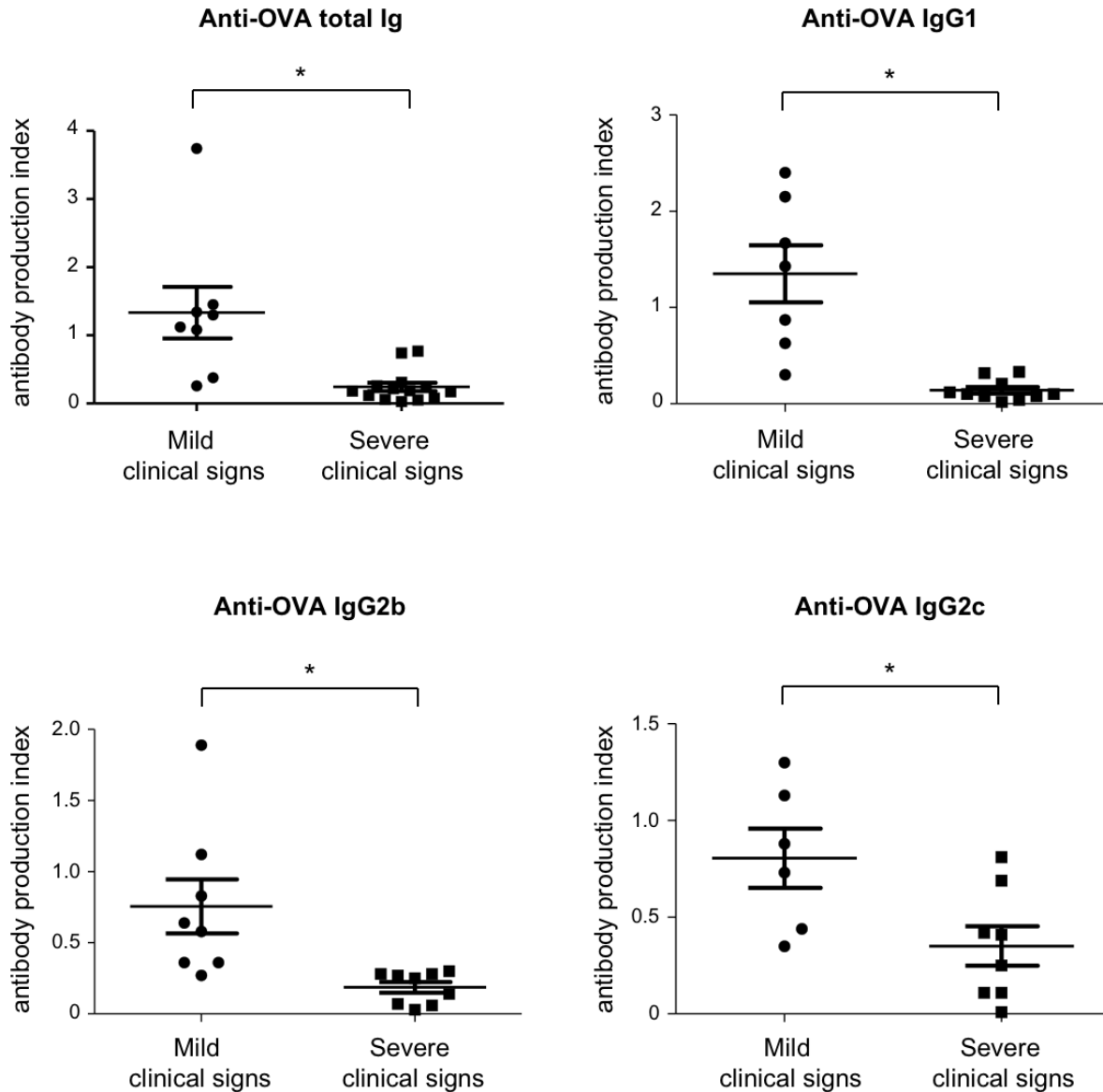
Figure 11. The production of ovalbumin (OVA)-specific antibodies is reduced in *S. suis* pre-infected mice as compared to control mice. Mice (n = 10) were infected with a dose of 1×10^7 CFU of *S. suis* wild-type strain P1/7 two days prior to immunization with 10 μ g of OVA formulated with 20 μ g of CpG ODN as adjuvant. A boost immunization with the same OVA-CpG ODN formulation was given at day 14 post-primary immunization. Serum levels of OVA-specific total Ig [IgG+IgM], IgG1, IgG2b, and IgG2c were measured by ELISA at (A) 14 days and (B) 21 days post-primary immunization. C- represents control mice injected with vehicle solution only (n = 6). C- + OVA represents control mice injected with vehicle solution followed by OVA immunization under the same protocol as described above (n = 10). A control group infected with *S. suis* wild-type strain P1/7 only was also included (n = 10). * $P < 0.05$ denotes values that are significantly lower in pre-infected animals (P1/7 + OVA) compared to the non-infected, immunized animals (C- + OVA).

	% CD3 ⁺ CD4 ⁺	Lymphoid depletion	Extramedullary hematopoiesis	Granulopoiesis
Control	17	-	-	-
	18	-	-	-
	17	-	-	-
	18	-	-	-
	17	-	-	-
<i>S. suis</i>	9	2	3	3
	6	2	4	2
	8	2	3	4
	10	2	-	3
	10	1	1	1

Supplementary Table S1. Splenic histopathological scores in naive and infected mice. At 8 days post-primary infection, % of CD3⁺CD4⁺ T cells were evaluated by FACS from the spleens of infected and control animals. In parallel to FACS analysis, half-spleens were preserved in formalin for histopathological analysis and levels of lymphoid depletion (lymphatic nodules), granulopoiesis (increased white pulp), and extramedullary hematopoiesis was evaluated on a 4-grade scale (grade 4 being the most severe).



Supplementary Figure S1. Total memory CD4⁺ T cell population remains unchanged in the spleens of *S. suis*-infected mice during a secondary infection. Mice were infected intraperitoneally with a dose of 1×10^7 CFU of *S. suis* wild-type strain P1/7. Surviving animals who had previously displayed clinical symptoms were boosted with a second dose of 1×10^7 CFU of *S. suis* wild-type strain P1/7 two weeks after initial infection. Spleens of animals with clinical symptoms and positive bacteremia were harvested 2 or 7 days post-boost infection. Total splenocytes were stained and analyzed by multi-parametric FACS. Cells were gated on CD3⁺CD4⁺ cells, followed by gating CD44^{high} cells. The surface marker IL-7R α was used to further identify memory cells (CD44^{high}IL-7R α ⁺) within this population. Data are expressed as mean \pm SEM (n = 3 per group \times 2 individual experimental infections). FACS was performed using a FACSCantoII instrument. Thirty thousand events gated on CD3⁺CD4⁺ cells were acquired per sample and data analysis was performed using Kaluza® Flow Analysis software.



Supplementary Figure S2. Serum levels of OVA-specific antibodies correlate with clinical signs developed by *S. suis*-infected mice. Mice (n = 10) were infected with a dose of 1×10^7 CFU of *S. suis* wild-type strain P1/7 two days prior to immunization with 10 μ g of OVA formulated with 20 μ g of CpG ODN as adjuvant. Serum levels of OVA-specific total Ig [IgG+IgM], IgG1, IgG2b, and IgG2c were measured by ELISA at 14 days post-primary immunization. The antibody production index was obtained by dividing the antibody levels of infected mice (showing either mild or severe clinical signs) by those of control mice. * $P < 0.05$ denotes values that are significantly lower in infected animals presenting severe clinical signs compared to infected animals presenting mild clinical signs.

ARTICLE II

***Streptococcus suis* serotype 2 infection modulates expression of major histocompatibility complex class II molecules on dendritic cells**

Corinne Letendre¹, Paul Lemire¹, Jean-Philippe Auger², Tristan Galbas³, Marcelo Gottchalk², Jacques Thibodeau^{3#}, Mariela Segura^{1#}.

¹*Laboratory of Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada J2S 2M2*

²*Laboratory of research on Streptococcus suis, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada J2S 2M2*

³*Laboratory of Molecular Immunology, Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, University of Montreal, Montreal, QC, Canada H3C 3J7*

Co-corresponding authors

En préparation pour soumission à *Infection and Immunity*

Rôle de la candidate dans la conception de l'article :

Je suis l'auteure principale de cet article. J'ai participé activement à la conception et au design des expériences ainsi qu'à la mise au point des techniques. J'ai aussi effectué les manipulations, analysé les résultats, conçu les graphiques et rédigé le manuscrit.

ABSTRACT

Streptococcus suis is an important swine pathogen and an emergent zoonotic agent of septicemia and meningitis. Encapsulated strains of *S. suis* have been shown to modulate dendritic cell (DC) functions, leading to poorly activated CD4⁺ T cells. However, the MHC-II-restricted antigen presentation ability of *S. suis*-stimulated DCs has not been investigated. In the present study, *S. suis*-stimulated bone marrow-derived (bm)DCs were shown to upregulate MHC-II cell surface expression but with a delayed kinetics compared to lipopolysaccharide (LPS)-stimulated cells. Moreover, a reduction of the MHC-II^{high} subpopulation was observed *in vivo* in splenic DCs derived from *S. suis*-infected mice. In order to get an insight into the mechanisms potentially involved behind these expression patterns, transcription levels of CIITA, MARCH1 and MARCH8, three molecules involved in MHC-II regulation, were investigated. Low expression levels of *Ciita* were observed both *in vitro* and *in vivo*, suggesting that *S. suis* modulates DC ability to increase synthesis of new MHC-II molecules shortly after encountering the pathogen. *S. suis* wild-type strain also induced sustained or upregulated levels of *March1/8* both *in vitro* and *in vivo*, which could lead to lysosomal degradation of MHC-II molecules. The capsular polysaccharide was found to play a partial role in these modulations. Overall, these results suggest that *S. suis* modulates MHC-II expression in DCs, possibly to subvert the host adaptive immune response.

1. INTRODUCTION

Streptococcus suis is one of the most important bacterial pathogens in pigs causing meningitis, septicemia and sudden death (1). It is responsible for major economic losses to the swine industry worldwide (2), and yet there is currently no real effective vaccine available to control infections caused by this bacteria (2). *S. suis* is also an emerging zoonotic agent that can cause meningitis and septicemia. High mortality rates have been observed in humans, particularly in cases of streptococcal toxic shock-like syndrome (STSLs) in Asia (3, 4). *S. suis* is an encapsulated bacterium, and a total of 35 serotypes have been defined based on the antigenicity of their capsular polysaccharides (CPS) (2). Serotype 2 is the most virulent for both pigs and humans, and various studies have been performed with this serotype (5). *S. suis* possesses several virulence factors (6), among which the CPS is clearly critical for the pathogenesis of *S. suis* infections (7).

Dendritic cells (DCs) are the most potent antigen-presenting cells; they connect innate and adaptive immunity (8, 9). During an infection, DC maturation can be initiated indirectly by inflammatory mediators released by innate immune cells or through direct contact with the pathogen (10). In both instances, DC maturation is characterized by the expression of cell surface molecules, particularly the major histocompatibility complex class II (MHC-II) and the costimulatory molecules CD80/CD86 (10, 11). Activated DCs having captured a pathogen then process it and load its derived antigenic peptides on their MHC-II molecules (12), forming peptide-MHC-II (pMHC-II) complexes that will be exported from the endosomal peptide loading compartments to the cell surface (12, 13), the whole process usually being completed within 1 to 3 hours (14). These pMHC-II will then be recognized by an antigen-specific T cell receptor (TCR) (15-17). Specific pMHC-II recognition is the first signal for CD4⁺ T cell activation and is essential for the induction of the adaptive response (18). The second signal determines the ability of the antigen-specific CD4⁺ T cell to expand, and involves binding of costimulatory molecules, such as CD80/CD86, on the CD4⁺ T cell (18, 19). Finally, the third signal for CD4⁺ T cell activation is conveyed by DC-derived cytokines that will induce T cell polarization towards different CD4⁺ T helper lineages with distinct effector functions (19, 20).

Different antigenic peptides can be loaded either on newly synthesized or on recycling MHC-II molecules (21). MHC-II transcription is tightly regulated by the class II transactivator (CIITA); this master regulator induces *de novo* transcription of MHC-II genes (22). Upon exposure to a toll-like receptor (TLR) ligand, a transient increase in MHC-II synthesis has been observed as early as 1 hour after challenge (21). However, within hours of the activation signal, CIITA transcription (and thus the ensuing MHC-II synthesis) is severely reduced (23, 24), as well as the uptake of new antigens for processing (8, 23). MHC-II expression also undergoes regulation at the protein level (13). The trafficking of MHC-II molecules, as well as their cell surface expression, is regulated, among other mechanisms, via ubiquitination by ubiquitin ligases of the membrane-associated RING-CH (MARCH) family, particularly MARCH1 and MARCH8 (11, 13, 16). In fact, ubiquitination by MARCH1 of the transmembrane glycoproteins MHC-II and CD86 is known to lead to lysosomal degradation of these molecules in immature DCs (11, 25). However, DC maturation with TLR ligands reduces the expression of MARCH1, thus reducing the degradation of pMHC-II (11, 26). It has been suggested that while MARCH1 activity allows the turnover of diverse pMHC-II complexes in immature DCs, termination of MARCH1 expression in mature DCs would considerably prolong the half-life of pMHC-II and CD86, and enhance the stability of pMHC-II derived from the activating pathogen (11). Such regulation processes would suggest that the recently activated DC generates large and stable amounts of pMHC-II with antigens derived from the pathogen at the site of infection, thereby increasing its ability to activate an antigen-specific CD4⁺ T cell in an efficient manner (23, 24, 27).

S. suis recognition by DCs has been reported to occur essentially through TLR-2 signalling (28). Encapsulated strains have been shown to modulate DC functions in a variety of ways. These strains exhibit anti-phagocytic properties in murine, porcine and human DCs (7, 9, 29, 30); impair cytokine production/release in DCs from all three species, most probably by CPS-mediated hindering of cell wall components (9, 29, 30); and modulate expression of the maturation markers CD80/CD86 and MHC-II in murine and porcine DCs (9, 29) and CD83/CD86 in human DCs (30). However, MHC-II expression in *S. suis*-stimulated DCs at short incubation times has never been properly investigated. Since a modulation of the kinetics of the MHC-II molecules could alter the repertoire of antigens being presented as pMHC-II on

the cell surface, such a modulation by *S. suis* could have profound consequences on the development of the ensuing adaptive response, as reported for other bacterial pathogens (31). Modulation of MHC-II-restricted antigen presentation ability of *S. suis*-stimulated DCs would account, at least in part, for the weak CD4⁺ T cell activation (32), low primary and memory humoral responses observed after infection in both mice and pigs (2, 33), as well as for some of the difficulties in developing an effective vaccine to control *S. suis* disease in swine (2). Finally, the low antibody titers obtained against a bystander antigen, ovalbumin (OVA), in *S. suis*-preinfected mice (32), suggest that the antigen presentation machinery is altered. It is hypothesized here that *S. suis* interferes with the ability of DCs to present antigens to CD4⁺ T cells via the MHC-II pathway, and thus compromises the development of an efficient adaptive immune response. The purpose of the present study was to investigate MHC-II cell surface expression and the transcription of three MHC-II-related genes in *S. suis*-stimulated DCs, *in vitro* and *in vivo*. A nonencapsulated *S. suis* serotype 2 mutant was also studied to dissect the role of the CPS in this pathway.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Bacterial strains. *S. suis* serotype 2 virulent strain P1/7 (28, 34) and its isogenic nonencapsulated mutant strain $\Delta cpsF$ (29) were used. *S. suis* strains were grown on sheep blood agar plates at 37°C for 18 h and isolated colonies were used as inocula for Todd–Hewitt Broth (THB; Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada). For *in vitro* experiments, 5 ml of inoculated THB were incubated 16 h at 37 °C with agitation; working cultures were then obtained by inoculating 300 μ l of these cultures in 10 ml of THB and incubating for 5 h at 37 °C with agitation. For the *in vivo* experiment, 5 ml of inoculated THB were incubated for 8 h at 37°C with agitation; working cultures were obtained by inoculating 10 μ l of a 10^{-3} dilution of these cultures in 30 ml of THB and incubating for 16 h at 37°C with agitation. Both bacterial growth protocols were standardized to obtain late-logarithmic bacteria timely synchronized for *in vitro* or *in vivo* infections. Bacteria were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.3, and appropriately diluted in complete cell culture medium for *in vitro* assays or in THB for the *in vivo* experiment. The number of CFU/ml in the final suspension was determined by plating samples onto THB agar using an Autoplate 4000 Automated Spiral Plater (Spiral Biotech, Norwood, MA).

2.2 Mice. C57BL/6 female mice were purchased from Charles River Laboratories (Wilmington, MA). Animals were used at 5 to 6 weeks of age. The guidelines and policies of the Canadian Council on Animal Care and the principles set forth in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals by the Animal Welfare Committee of the University of Montreal were followed.

2.3 Reagents. Anti-mouse antibodies used for FACS analysis were as follows: PE/Cy5-conjugated anti-CD11c clone N418 (BioLegend, San Diego, CA), PE-conjugated anti-I-A^b clone AF6-120.1 (BD Pharmingen, Mississauga, ON, Canada) and anti-CD86 clone GL1 (BD Pharmingen).

2.4 Generation of mouse bone marrow-derived dendritic cells (bmDCs). A protocol previously described was followed (28, 35). Briefly, bone marrow was removed from femurs and tibiae. After red blood cell lysis (eBioScience, San Diego, CA), total bone marrow cells (2.5×10^5 cells/ml) were cultured in RPMI 1640 supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum, 10 mM HEPES, 20 μ g/ml gentamycin, 100 U/ml penicillin-streptomycin, 2 mM L-glutamine and 50 μ M 2-mercaptoethanol (Gibco, Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Complete medium was complemented with 20% GM-CSF from a mouse GM-CSF-transfected cell line (Ag8653) as a source of GM-CSF. Cells were cultured for 7 days at 37°C in a 5% CO₂ incubator and fresh medium was added on days 3 and 5. On day 7, clusters were harvested and subcultured overnight to remove adherent cells. Non-adherent cells were harvested on day 8, washed, and used as immature DCs for the studies. Cell purity routinely comprised 86-90% CD11c^{high}, as determined by FACS analysis and as reported previously (35).

2.5 *In vitro* bmDCs stimulation assays. A suspension of bmDCs at 10^6 cells/ml in RPMI complete medium (without antibiotics) was stimulated with *S. suis* strains P1/7 and $\Delta cpsF$ (10^6 CFU/ml; initial MOI:1). Cytotoxicity was tested and culture conditions yielding optimal activation levels were selected. Cells were harvested after the desired incubation time for FACS and RT-qPCR analysis. Non-stimulated cells served as negative (–) control at each time point, while cells treated with the TLR4-ligand lipopolysaccharide (LPS) at 1 μ g/ml (from *E. coli* 0127:B8, [Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada]) were used as positive (+) control at each time point.

2.6 *In vivo* infection model and analysis of splenic DCs. On the day of the experiment, mice were injected intraperitoneally (i.p.) with 1 ml of the bacterial suspension (5×10^7 CFU of *S. suis* strain P1/7) or sterile vehicle solution (THB), as described previously (32, 36). Spleens from naive and infected mice showing clinical signs of ruffled coat, prostration and/or depression (n = 6 per group x 2 individual experimental infections) were harvested 3 or 6 h post-infection. At time of euthanasia, blood was collected by terminal cardiac puncture (approximately 500 μ l) and bacteremia (number of CFU/ml) was determined by plating samples onto THB agar using an Automated Spiral Plater. For purification of splenic DCs,

spleens (from either naive or infected mice) were harvested, perfused with RPMI complete medium (Gibco), and pressed gently through a sterile fine wire mesh. After red blood cells lysis (eBioscience), total splenocytes were resuspended in 2 mM EDTA-PBS solution and separated using Lympholyte-M density gradient (Cedarlane Labs, Burlington, ON, Canada). Low-density cells at the interphase were purified by magnetic-activated cell sorting (MACS) positive selection using CD11c MicroBeads and MS columns (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) as per the manufacturer's recommendations. The enriched CD11c⁺ cells had >85% purity by FACS analysis using CD11c antibody (data not shown).

2.7 FACS analysis. For evaluation of MHC-II and CD86 cell surface expression *in vitro*, bmDCs were harvested after each time point, washed, fixed (eBioScience) and conserved at 4°C until the end of the experiment (18 h). Once the last incubation time point was over, cells were treated with FcR-blocking reagent (FcγIII/II Rc Ab, BD Pharmingen) for 15 min on ice. Cells were stained for CD11c (45 min on ice), then washed and stained for either CD86 or MHC-II I-A^b (45 min on ice). After washing steps, cells were resuspended in sorting buffer for FACS analysis. Flow cytometry was performed using a BD AccuriTM C6 cytometer (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada). At least thirty thousand gated events were acquired per sample and data analysis was performed using BD AccuriTM C6 software. Quadrants were drawn based on PE/Cy5- and PE-control and were plotted on logarithmic scales. The results are from three independent experiments. Splenic DCs from the *in vivo* experiment were similarly treated.

2.8 Analysis of mRNA expression by Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR. For *in vitro* experiments, medium was removed and cells were washed and transferred in QIAzol (1 ml/10⁶ cells; Qiagen, Mississauga, ON, Canada) and kept at -80°C after each time point. Total cellular RNA was later extracted and quantified by spectrophotometry (Nanodrop ND-1000). Total RNA (500 ng) was reverse-transcribed with the QuantiTect® Reverse Transcription kit (Qiagen) as per the manufacturer's recommendations. The cDNA was amplified using the SsoFastTM EvaGreen® Supermix kit (Bio-Rad, Hercules, CA). The PCR amplification program for all cDNA consisted of an enzyme activation step at 98°C for 30 sec, followed by 49 cycles at 98°C for 5 sec and 60°C for 5 sec. The primers used for

amplification of the different target cDNA are listed in Table I (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA). A real-time thermal cycler CFX96 (Bio-Rad) was used for amplification of target cDNA and quantitation of differences between the different groups was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Peptidylprolyl isomerase A (PPIA) was used as the normalizing gene to compensate for potential differences in cDNA amounts. The non-stimulated DCs [(-) control] were used as the calibrator reference in the analysis. Each sample was run in triplicates and a no-template control without cDNA was run for every primer set. The results are from four independent experiments. Splenic DCs from the *in vivo* experiment were similarly treated

2.9 Statistical analysis. Quantitative data were confirmed to be normally distributed and then analyzed for significance by using Student's unpaired *t*-test. Data are expressed as mean \pm SEM. A two-tailed *P* value of < 0.05 was used as threshold for significance. All analyzes were performed using the Sigma Plot Software (v.11.0).

3. RESULTS

3.1 Encapsulated *S. suis* induces a delayed increase in MHC-II cell surface expression *in vitro*. We first investigated *in vitro* the kinetics of MHC-II cell surface expression in bmDCs at 1, 2, 4, 12 and 18 h after infection. As *S. suis* is an encapsulated bacterium, the impact of CPS on MHC-II expression was evaluated by comparing the wild-type (WT) strain P1/7 with its nonencapsulated mutant, $\Delta cpsF$. LPS-treated bmDCs served as positive controls for the expected kinetics of MHC-II cell surface expression in bmDCs responding to a TLR ligand (direct maturation). While LPS-treated bmDCs showed significantly higher percentage of MHC-II⁺ cells as early as 1 h after stimulation when compared to non-stimulated cells ($P = 0.002$), *S. suis*-stimulated bmDCs only showed such high levels of MHC-II⁺ cells at 12 and 18 h after infection ($P < 0.05$) (Fig. 1). In fact, levels of MHC-II expression for the WT strain remained comparable to non-stimulated cells until 4 h after infection, while bmDCs stimulated with the nonencapsulated mutant showed a gradual increase in MHC-II surface expression at 2 h after infection ($P = 0.042$). Moreover, there was a statistical difference between the two strains at 2 and 4 h after infection ($P = 0.025$ and $P = 0.039$ respectively), suggesting that the presence of the CPS on *S. suis* plays a partial role in the delayed maturation process underwent by *S. suis*-stimulated bmDCs.

3.2 *S. suis* induces a decrease in MHC-II cell surface expression *in vivo*. In order to confirm the previous *in vitro* findings, MHC-II cell surface expression was investigated in purified splenic DCs in an *in vivo* mouse model. Unfortunately, as nonencapsulated *S. suis* mutants are rapidly cleared from circulation (37), *in vivo* investigation of the role of this virulence factor was impossible and the experiment had to be conducted with the WT strain only. Since splenic DCs have never been studied in the context of *S. suis* before, we evaluated the maturation profile of these cells during an acute systemic infection with *S. suis*, along with their MHC-II cell surface expression. Splenic DCs derived from *S. suis*-infected mice showed an increased expression of the DC maturation marker CD86, when compared to naive mice ($P = 0.001$) (Fig. 2A); this suggests that initiation of the DC maturation process occurs quickly in splenic DCs during a systemic infection with *S. suis*. Moreover, percentage of splenic DCs expressing MHC-II molecules on their cell surface remained high after infection

and were thus in agreement with this DC maturation profile (Fig. 2B). However, *S. suis*-infected mice showed a lower mean fluorescence intensity characterized by a reduction in the MHC-II^{high} subpopulation when compared to naive mice ($P = 0.013$) (Fig. 2B, black and red histograms); this observation could imply that the total number of MHC-II molecules at the surface of each MHC-II⁺ cell was reduced, supporting the idea that MHC-II expression on splenic DCs is modulated *in vivo* by *S. suis*, despite initiation of the DC maturation process.

3.3 *S. suis* maintains low levels of CIITA transcriptional expression both *in vitro* and *in vivo*. In order to better understand the mechanisms behind the delayed MHC-II cell surface expression in *S. suis*-stimulated bmDCs as well as the reduction of the splenic MHC-II^{high} subpopulation in *S. suis*-infected mice, transcriptional expression of the master regulator CIITA responsible for *de novo* transcription of MHC-II genes, was evaluated by RT-qPCR. *Ciita* mRNA expression was investigated *in vitro* in bmDCs stimulated with both the WT strain and its nonencapsulated mutant for 1, 2 or 4 h. Interestingly, *S. suis*-stimulated bmDCs showed, for both strains, globally low levels of *Ciita*. No significant difference was observed between the WT strain and its nonencapsulated mutant. In contrast, LPS-treated bmDCs showed upregulation of *Ciita* expression at 2 and 4 h after stimulation, as is expected in DCs responding to a TLR ligand at early time points (Fig. 3A). mRNA expression of *Ciita* was also investigated *in vivo* at 3 and 6 h after infection, with splenic DCs derived from *S. suis*-infected mice also showing low levels of *Ciita* compared to naive mice (Fig. 4A). This suggests that the ability of *S. suis*-stimulated DCs to increase synthesis of new MHC-II molecules is limited, and thus possibly, the presentation of relevant pathogen-derived peptides.

3.4 *S. suis* upregulates MARCH1 and MARCH8 transcriptional expression both *in vitro* and *in vivo*, with the CPS playing a partial role in this regulation. To identify mechanisms potentially involved in the delayed MHC-II cell surface expression in *S. suis*-stimulated bmDCs as well as in the reduction of the splenic MHC-II^{high} subpopulation in *S. suis*-infected mice, transcriptional expression of the ubiquitin ligases MARCH1 and MARCH8 was evaluated by RT-qPCR. Since these molecules are involved in the fate (either lysosomal degradation or recycling) of pMHC-II complexes at the cell surface, these molecules were promising regulatory candidates to investigate. bmDCs were stimulated *in vitro* with *S. suis*

strains P1/7 and $\Delta cpsF$ for 1, 2 or 4 h. While LPS-treated bmDCs showed downregulation of *March1* and *March8* mRNA expression, as is expected in bmDCs responding to a TLR ligand, levels of transcription of these genes in *S. suis*-stimulated bmDCs were poorly down-regulated or even upregulated (Fig. 3B and C). The WT strain induced expression levels of *March1* significantly higher than those observed in LPS-treated bmDCs for all time points ($P < 0.05$). Since MARCH1 is known to ubiquitinate the costimulatory molecule CD86 as well as MHC-II molecules, the cell surface expression of CD86 was analyzed by FACS to corroborate these results. In agreement with the observed *S. suis*-modulation of *March1* expression, protein expression levels of CD86 in *S. suis*-stimulated bmDCs remained comparable to non-stimulated cells until 4 h of incubation (Fig. S1 in the supplemental material). Similarly, the WT strain induced expression levels of *March8* significantly higher than those observed in LPS-treated bmDCs at early time points ($P < 0.05$). When bmDCs were stimulated with the nonencapsulated mutant, a marked regulation of *March1* and *March8* expression levels was only observed at 1 h of incubation. Thereafter, nonencapsulated mutant-stimulated bmDCs showed *March1* and *March8* expression levels similar to those observed in LPS-treated cells and significantly different from those observed with the WT strain (Fig. 3B and C). This suggests that the presence of the CPS allows *S. suis* to hamper antigen presentation by promoting ubiquitination of MHC-II, and thus lysosomal degradation of these molecules at early time points after infection. mRNA expression of *March1* and *March8* was also investigated *in vivo* at 3 and 6 h after infection. Splenic DCs derived from *S. suis*-infected mice showed sustained expression levels until at least 3 h after infection for *March1*, and 6 h for *March8* (Fig. 4B and C), therefore supporting the previous *in vitro* findings.

4. DISCUSSION

Although *S. suis* induces the release of proinflammatory mediators in acute/peracute systemic infections (28, 38, 39), it also impairs different immune cell functions (6, 29), potentially preventing the development of an effective host immune response (32). *S. suis* modulation of DC functions have been documented in mice, swine and humans (9, 28-30). DCs connect innate and adaptive immunity through MHC-II-restricted antigen presentation to CD4⁺ T cells (8). Therefore, since CD4⁺ T cells were shown previously to be poorly activated during *S. suis* infection (32), this prompted us to evaluate MHC-II expression in *S. suis*-stimulated DCs.

Through comparison with non-stimulated cells and cells treated with a TLR ligand (e.g. LPS) extensively used in molecular studies (21, 40), *in vitro* kinetic studies evidenced a delayed increase in MHC-II cell surface expression in *S. suis*-stimulated DCs. This delay appeared to be more pronounced with the encapsulated strain, suggesting a role of the CPS in this modulation. It remains unclear whether this delay in MHC-II expression is biologically significant, although it has been suggested that the timing of DC activation after encounter with activating compounds (adjuvants) and antigens, and the subsequent changes induced by DC maturation, can dramatically affect the outcome of vaccination (10). Unfortunately, loading of *S. suis*-derived peptides on MHC-II molecules could not be directly evaluated in the present study due to the lack of immunological tools available for *S. suis*. Nevertheless, the reduction in the MHC-II^{high} subpopulation that was observed *in vivo* on a distinct DC subtype in *S. suis*-infected mice supports the relevance of the *in vitro* findings and is consistent with a modulation of MHC-II expression by *S. suis*.

In order to get an insight into the mechanisms potentially involved in the modulation of MHC-II expression in *S. suis*-infected DCs, transcriptional expression of CIITA, MARCH1 and MARCH8, three molecules involved in transcriptional and post-transcriptional regulation of MHC-II, were evaluated. Low *Ciita* mRNA levels were observed in *S. suis*-stimulated bmDCs and splenic DCs derived from *S. suis*-infected mice at early time points, while LPS-treated bmDCs showed globally increased expression at the same times *in vitro*. This suggests

that *S. suis* impairs DC's ability to increase synthesis of new MHC-II molecules shortly after encounter with the pathogen. The fact that newly synthesized MHC-II molecules constitutes the major source for antigen presentation (10) underscores the likelihood that *S. suis* is perturbing the optimal timing between pathogen-derived antigen processing and MHC-II loading/trafficking, through *Ciita* modulation. Similarly, murine macrophages infected with *M. tuberculosis* or *M. bovis* BCG prior to incubation with IFN- γ were shown to downregulate the expression of IFN- γ -stimulated *Ciita* (41, 42). As for the transcription levels of the ubiquitin ligases MARCH1 and MARCH8 in *S. suis*-stimulated DCs, our results revealed high levels when compared to LPS-treated cells. Moreover, while *S. suis* WT strain induced upregulation of both *March1* and *March8* after 2 h, DC stimulation with the nonencapsulated mutant rather led to downregulation of these genes. This suggests that the encapsulated strain of *S. suis* hijacks MARCH1-mediated MHC-II ubiquitination in DCs, thereby promoting lysosomal degradation of these molecules with obvious consequences on antigen presentation to CD4⁺ T cells. In agreement with our results, *March1* and *March8* transcription have been reported to be rapidly downregulated upon LPS-induced maturation in human monocyte-derived DCs (43). Modulation of MARCH1 expression and subsequent MHC-II downregulation has been observed in *Francisella tularensis*-infected-macrophages by a PGE₂-inducible host factor capable of inducing IL-10 (44). However, it appears unlikely that *S. suis* would use a similar mechanism to modulate MARCH1 expression in DCs as it was proven recently that IL-10 suppression of antigen presenting cell function in macrophages is MARCH1 dependent, whereas in DCs, IL-10 effect on antigen presentation is MARCH1-independent (11). Yet, it remains unclear whether this difference among cell types could depend on the type and dose of agonist. Nevertheless, our *in vivo* results support, at least in part, a modulation of MARCH1/8 by *S. suis*, as sustained mRNA expression levels of these molecules were observed in splenic DCs derived from *S. suis*-infected mice. In a murine model of multiple organ dysfunction syndrome (MODS), a syndrome characterized by the loss of control over systemic inflammatory responses such as what takes place during *S. suis* systemic infections, the protein expression level of MHC-II and immune functional activities of DCs were also inversely related to *March1* expression (45). Authors suggested that MARCH1 was involved in regulating DCs immune functions by mediating the ubiquitination

and aberrant degradation of MHC-II on DCs surfaces, which would in turn affect the pathological progression of MODS (45).

Modulation of MHC-II expression in *S. suis*-stimulated DCs cannot be analyzed without discussing the maturation profile of the cells. Although a clear and unanimous definition of mature and immunogenic DCs is yet to be determined, phenotypically mature DCs are usually defined by their expression of appropriate “maturation markers” such as high surface expression of MHC-II molecules, CD80, CD86, CD40, and CCR7 (26, 46). *S. suis* has been shown previously to interfere with the expression of some of these molecules in DCs. However, these studies have been performed at late incubation times and sometimes yielded conflicting results between different species (9). For example, in murine bmDCs, incubation with *S. suis* for 16 h resulted in an increase in the expression of the surface markers CD86 and MHC-II, with no difference between the WT strain and its nonencapsulated mutant nor with the TLR9-ligand CpG (29), thus in agreement with our *in vitro* FACS results at late time points. Meanwhile, porcine bmDCs stimulated with *S. suis* for 16 h showed that the presence of CPS interfered with the expression of CD80/CD86 and MHC-II, leading to expression levels lower than those obtained with LPS (9). Finally, in human DCs incubated with different *S. suis* serotypes for 48 h, serotype 2 was found to be the least effective serotype in maturing DCs when considering CD83/CD86 expression (30). Therefore, use of an inbred animal model was essential in the present study to reduce genetic variability and facilitate investigation of the mechanisms involved in regulation of MHC-II molecules, which are precisely encoded by highly polymorphic genes. The present study was unique for studying CD86 and MHC-II expression at short incubation times in two distinct murine DC subtypes. Through comparison with LPS in our *in vitro* system, our results suggest that *S. suis* fails to mature DCs early after stimulation, according to their phenotypic and transcriptional profiles. However, we cannot undermine here the limitations of comparing *S. suis*-stimulated DCs with LPS-treated DCs, as a live pathogen interacts with DCs in a much more complex way than a pure TLR-4 ligand. Nevertheless, LPS has already been proven to be useful in the context of *S. suis* for normalization of DC maturation markers expression (30). It is not surprising that the maturation profile of splenic DCs derived from *S. suis*-infected mice slightly differed from the profile that was obtained *in vitro*, since systemic infections are known to trigger the release of

enormous amounts of proinflammatory compounds, thus leading to DC activation in a variety of ways (47). For example, triggered neutrophils have been shown to induce strong upregulation of DC surface markers CD40, CD80, MHC-II, and CD86 (48). However, it has been suggested that while indirectly-matured DCs exposed to inflammatory mediators can increase their maturation marker surface expression, their antigen presentation ability remains essentially that of an immature DC with limited capacity for full T cell priming (26). Therefore, our *in vivo* results could reflect indirect DC maturation mediated by inflammatory mediators released during the early phase of *S. suis* infection, whereas in our *in vitro* system, DC exposure to inflammatory mediators through autocrine production, if any, would most probably be negligible at short incubation times.

We have shown in the present study that *S. suis* modulates MHC-II expression in DCs, both *in vitro* and *in vivo*. To the best of our knowledge, this is the first report of an encapsulated streptococcal species interfering with MHC-II expression in DCs, as well as the first time that splenic DCs are studied in the context of *S. suis*. The capsule was found to play only a partial role in the modulation of MHC-II expression. In fact, as *S. suis* expresses numerous virulence factors, it is very likely that this pathogen modulates MHC-II expression through a variety of factors defining the strain pathogenicity.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Sonia Lacouture, Marie-Pier Lecours and David Roy for technical help.

This work was mainly supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) through a grant to MS (no. 342150) and by Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and Canada Foundation for Innovation (CFI) through grants to Jacques Thibodeau (CIHR no. 93592). CL is the recipient of a M.S. award granted by NSERC and of a Zoetis Investment in Innovation Award.

TABLE I. Primer sequences used for real-time RT-qPCR.

Name	Forward	Reverse
CIITA	AACCTGCGCTGACCTCCCGTGTA	GCTCCCTTTCCTGGCTCTTGTTGC
MARCH1	CAGATGACCACGAGCGAAAG	CCAATAGCCACCACAACCAG
MARCH8	TGGCTTCATGTTGTTCCCTTTATTC	CAGCCGTGCCTTGCCAGTC
PPIA	TGCTGGACCAAACACAAACGGTTC	CAAAGACCACATGCTTGCCATCCA

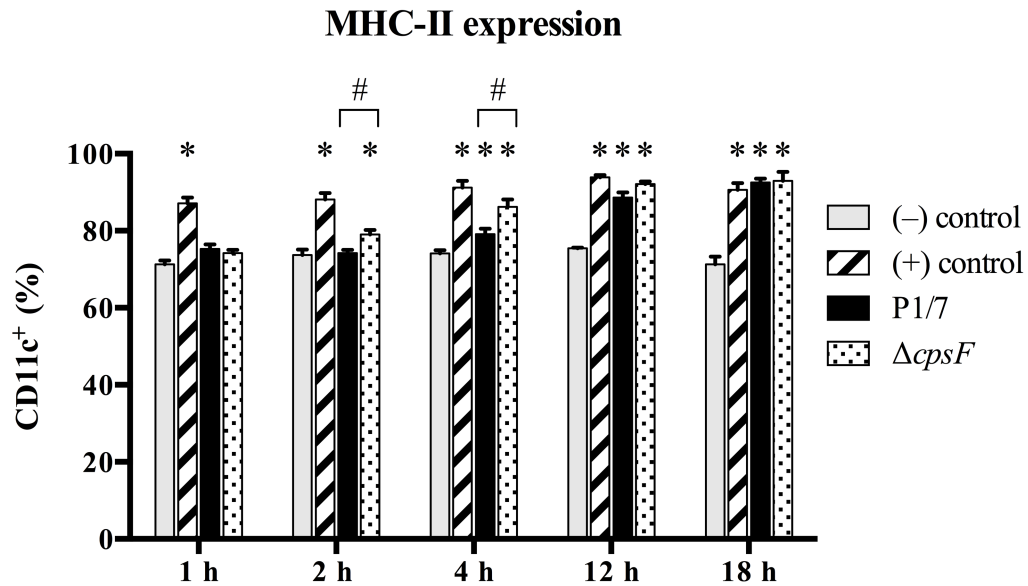


FIGURE 1. MHC-II cell surface expression on *S. suis*-stimulated bone marrow-derived dendritic cells (bmDCs). Cells were stimulated for 1, 2, 4, 12 or 18 h with *S. suis* wild-type strain P1/7 or the nonencapsulated mutant $\Delta cpsF$ (initial MOI:1). Cells were harvested and fixed after each incubation time. Once the last incubation time was over, cells were surface stained for CD11c and MHC-II, and analyzed by FACS. Non-stimulated cells served as negative (-) control for basal expression at each time point. Cells stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were used as positive (+) control. Data are expressed as mean \pm SEM (in % of positive cells) from 3 independent experiments. At least thirty thousand gated events were acquired by sample and data analysis was performed using BD AccuriTM C6 software. Quadrants were drawn based on PE/Cy5- and PE-control and were plotted on logarithmic scales. * $P < 0.05$ indicates statistically significant difference as compared to (-) control cells. # $P < 0.05$ indicates statistically significant difference between the wild-type strain and its nonencapsulated mutant.

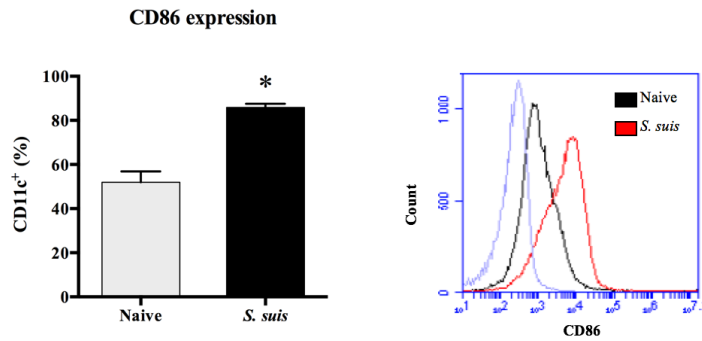
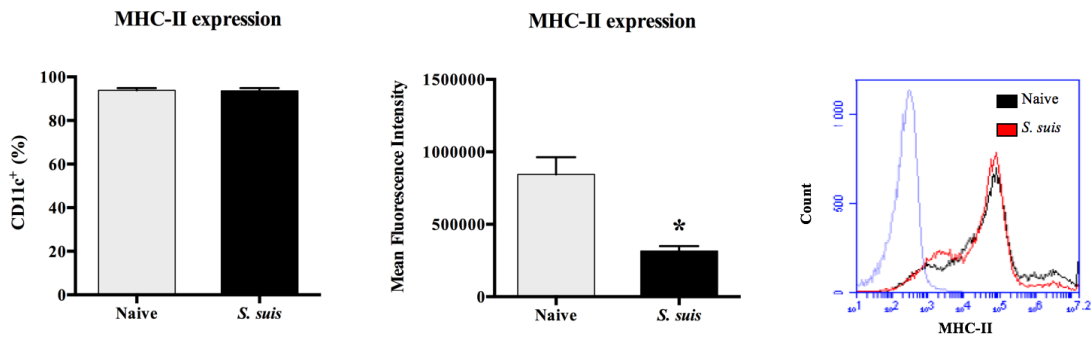
A**B**

FIGURE 2. CD86 and MHC-II cell surface expression on splenic dendritic cells (DCs) derived from *S. suis*-infected mice. C57BL/6 mice were injected intraperitoneally with 5×10^7 CFU of *S. suis* wild-type strain P1/7. Spleens from naive or infected mice showing clinical signs were harvested 6 h after infection. Mock-infected (naive) animals were similarly treated. Splenic DCs were purified by MACS positive selection, then surface stained for FACS analysis of (A) CD86 and (B) MHC-II expression. Events are gated on CD11c⁺ cells and data are expressed as mean \pm SEM (in % of positive cells). Thirty thousand gated events were acquired by sample and data analysis was performed using BD AccuriTM C6 software. Quadrants were drawn based on PE/Cy5- and PE-control and were plotted on logarithmic scales. * $P < 0.05$ indicates statistically significant difference as compared to naive cells. Histograms show expression of CD86 and MHC-II on DCs derived from naive mice (black line) and *S. suis*-infected mice (red line), along with the isotype control (gray line).

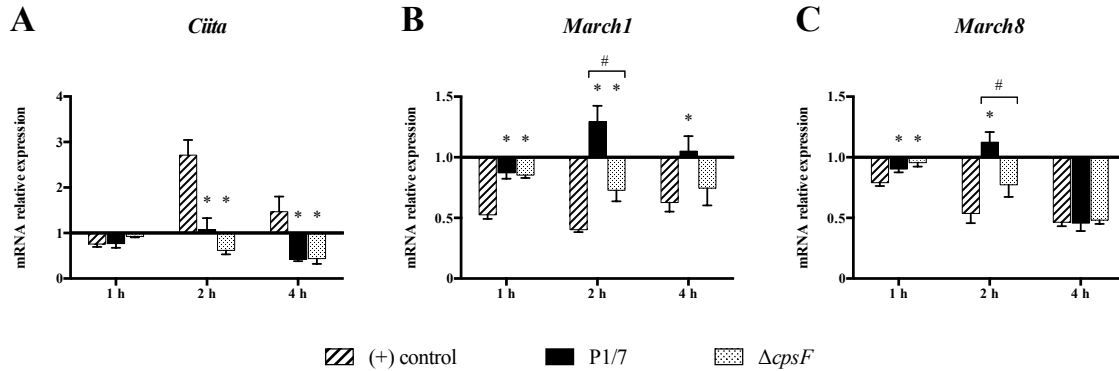


FIGURE 3. *Ciita*, *March1* and *March8* mRNA expression in *S. suis*-stimulated bone marrow-derived dendritic cells (bmDCs). (A) *Ciita*, (B) *March1* and (C) *March8* mRNA expression in bmDCs stimulated for 1, 2, or 4 h with *S. suis* wild-type strain P1/7 or the nonencapsulated mutant $\Delta cpsF$ (initial MOI:1). Total cellular RNA was extracted and analyzed by RT-qPCR. Expression is illustrated as fold level over non-stimulated cells [(-) control]. Cells stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) served as positive (+) control. Data are expressed as mean \pm SEM from 4 independent experiments. * $P < 0.05$ indicates statistically significant difference as compared to (+) control cells. # $P < 0.05$ indicates statistically significant difference between P1/7-stimulated bmDCs and $\Delta cpsF$ -stimulated bmDCs.

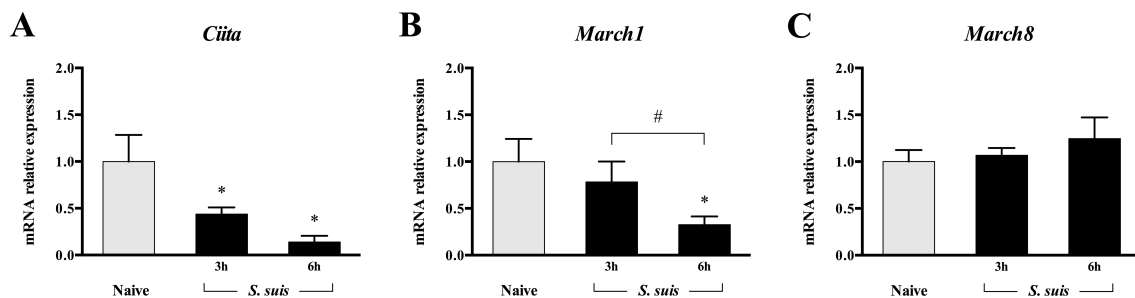


FIGURE 4. *Ciita*, *March1* and *March8* mRNA expression in splenic dendritic cells (DCs) derived from *S. suis*-infected mice. C57BL/6 mice were injected intraperitoneally with 5×10^7 CFU of *S. suis* wild-type strain P1/7. Spleens from naive or infected mice showing clinical signs were harvested 3 or 6 h after infection. Mock-infected (naive) animals were similarly treated. Splenic DCs were purified by MACS positive selection, then total cellular RNA was extracted and analyzed by RT-qPCR for (A) *Ciita*, (B) *March1* and (C) *March8* mRNA expression. Expression is illustrated as fold level as compared to expression in naive mice. Data are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$ indicates statistically significant difference as compared to naive cells. # $P < 0.05$ indicates statistically significant difference between expression at 3 and 6 h in *S. suis*-infected mice.

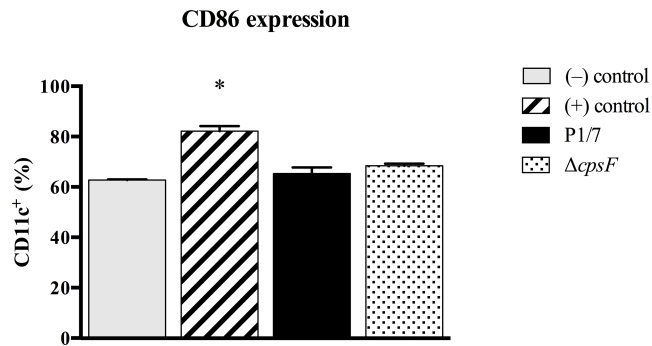


FIGURE S1. CD86 cell surface expression on *S. suis*-stimulated bone marrow-derived dendritic cells (bmDCs). Cells were stimulated for 4 h with *S. suis* strain P1/7 or the nonencapsulated mutant $\Delta cpsF$ (initial MOI:1). Cells were harvested and fixed after each incubation time. Once the last incubation time was over, cells were surface stained for CD11c and MHC-II, and analyzed by FACS. Non-stimulated cells served as negative (-) control for basal expression at each time point. Cells stimulated with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) were used as positive (+) control. Data are expressed as mean \pm SEM (in % of positive cells) from 2 independent experiments. At least thirty thousand gated events were acquired by sample and data analysis was performed using BD AccuriTM C6 software. Quadrants were drawn based on PE/Cy5- and PE-control and were plotted on logarithmic scales.

REFERENCES

1. Gottschalk M. 2012. Streptococcosis, p 841-855. In Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW (ed), Diseases of Swine, 10th ed. Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ.
2. Segura M. 2015. *Streptococcus suis* vaccines: candidate antigens and progress. *Expert Rev Vaccines* 14:1587-1608.
3. Goyette-Desjardins G, Auger JP, Xu J, Segura M, Gottschalk M. 2014. *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent—an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. *Emerg Microbes Infect* 3:e45.
4. Lachance C, Gottschalk M, Gerber PP, Lemire P, Xu J, Segura M. 2013. Exacerbated Type II Interferon Response Drives Hypervirulence and Toxic Shock by an Emergent Epidemic Strain of *Streptococcus suis*. *Infect Immun* 81:1928-1939.
5. Segura M, Zheng H, de Greeff A, Gao GF, Grenier D, Jiang Y, Lu C, Maskell D, Oishi K, Okura M, Osawa R, Schultsz C, Schwerk C, Sekizaki T, Smith H, Srimanote P, Takamatsu D, Tang J, Tenenbaum T, Tharavichitkul P, Hoa NT, Valentin-Weigand P, Wells JM, Wertheim H, Zhu B, Gottschalk M, Xu J. 2014. Latest developments on *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen: part 1. *Future Microbiol* 9:441-444.
6. Fittipaldi N, Segura M, Grenier D, Gottschalk M. 2012. Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. *Future Microbiol* 7:259-279.
7. Houde M, Gottschalk M, Gagnon F, Van Calsteren MR, Segura M. 2012. *Streptococcus suis* capsular polysaccharide inhibits phagocytosis through destabilization of lipid microdomains and prevents lactosylceramide-dependent recognition. *Infect Immun* 80:506-517.
8. Liu Z, Roche PA. 2015. Macropinocytosis in phagocytes: regulation of MHC class-II-restricted antigen presentation in dendritic cells. *Front Physiol* 6:1.
9. Lecours MP, Segura M, Lachance C, Mussa T, Surprenant C, Montoya M, Gottschalk M. 2011. Characterization of porcine dendritic cell response to *Streptococcus suis*. *Vet Res* 42:72.
10. Vega-Ramos J, Villadangos JA. 2013. Consequences of direct and indirect activation of dendritic cells on antigen presentation: functional implications and clinical considerations. *Mol Immunol* 55:175-178.

11. Mittal SK, Cho KJ, Ishido S, Roche PA. 2015. IL-10 mediated immunosuppression: March-I induction regulates antigen presentation by macrophages but not dendritic cells. *J Biol Chem* 290:27158-27167.
12. Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P. 2013. Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol* 31:443-473.
13. Thibodeau J, Bourgeois-Daigneault MC, Lapointe R. 2012. Targeting the MHC Class II antigen presentation pathway in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 1:908-916.
14. Owen J, Punt J, Stranford S. 2013. *Kuby Immunology*, 692 p, 7th ed. WH Freeman, New York, NY.
15. Fooksman DR. 2014. Organizing MHC Class II Presentation. *Front Immunol* 5:158.
16. Mintern JD, Macri C, Villadangos JA. 2015. Modulation of antigen presentation by intracellular trafficking. *Curr Opin Immunol* 34:16-21.
17. Hivroz C, Chemin K, Tourret M, Bohineust A. 2012. Crosstalk between T lymphocytes and dendritic cells. *Crit Rev Immunol* 32:139-155.
18. Bakdash G, Sittig SP, van Dijk T, Figdor CG, de Vries IJ. 2013. The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal II. *Front Immunol* 4:53.
19. de Jong EC, Smits HH, Kapsenberg ML. 2005. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin Immunopathol* 26:289-307.
20. Magombedze G, Reddy PB, Eda S, Ganusov VV. 2013. Cellular and population plasticity of helper CD4(+) T cell responses. *Front Physiol* 4:206.
21. Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. 1997. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388:782-787.
22. Devaiah BN, Singer DS. 2013. CIITA and Its Dual Roles in MHC Gene Transcription. *Front Immunol* 4:476.
23. Cho KJ, Roche PA. 2013. Regulation of MHC Class II-Peptide Complex Expression by Ubiquitination. *Front Immunol* 4:369.
24. Pan H, O'Brien TF, Wright G, Yang J, Shin J, Wright KL, Zhong XP. 2013. Critical role of the tumor suppressor tuberous sclerosis complex 1 in dendritic cell activation of CD4 T cells by promoting MHC class II expression via IRF4 and CIITA. *J Immunol* 191:699-707.

25. Galbas T, Steimle V, Lapointe R, Ishido S, Thibodeau J. 2012. MARCH1 down-regulation in IL-10-activated B cells increases MHC class II expression. *Cytokine* 59:27-30.
26. Vega-Ramos J, Roquilly A, Zhan Y, Young LJ, Mintern JD, Villadangos JA. 2014. Inflammation conditions mature dendritic cells to retain the capacity to present new antigens but with altered cytokine secretion function. *J Immunol* 193:3851-3859.
27. Carreno LJ, Gonzalez PA, Kalergis AM. 2006. Modulation of T cell function by TCR/pMHC binding kinetics. *Immunobiology* 211:47-64.
28. Lecours MP, Segura M, Fittipaldi N, Rivest S, Gottschalk M. 2012. Immune receptors involved in *Streptococcus suis* recognition by dendritic cells. *PLoS One* 7:e44746.
29. Lecours MP, Gottschalk M, Houde M, Lemire P, Fittipaldi N, Segura M. 2011. Critical role for *Streptococcus suis* cell wall modifications and sullysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells. *J Infect Dis* 204:919-929.
30. Meijerink M, Ferrando ML, Lammers G, Taverne N, Smith HE, Wells JM. 2012. Immunomodulatory effects of *Streptococcus suis* capsule type on human dendritic cell responses, phagocytosis and intracellular survival. *PLoS ONE* 7:e35849.
31. Rescigno M. 2015. Dendritic cell functions: Learning from microbial evasion strategies. *Semin Immunol* 27:119-124.
32. Lecours MP, Letendre C, Clarke D, Lemire P, Galbas T, Benoit-Biancamano MO, Thibodeau J, Gottschalk M, Segura M. 2016. Immune-responsiveness of CD4⁺ T cells during *Streptococcus suis* serotype 2 infection. *Submitted to Scientific Reports, #SREP-16-18210*.
33. Calzas C, Lemire P, Auray G, Gerds V, Gottschalk M, Segura M. 2015. Antibody response specific to the capsular polysaccharide is impaired in *Streptococcus suis* serotype 2-infected animals. *Infect Immun* 83:441-453.
34. Lecours MP, Fittipaldi N, Takamatsu D, Okura M, Segura M, Goyette-Desjardins G, Van Calsteren MR, Gottschalk M. 2012. Sialylation of *Streptococcus suis* serotype 2 is essential for capsule expression but is not responsible for the main capsular epitope. *Microbes Infect* 14:941-950.
35. Lemire P, Roy D, Fittipaldi N, Okura M, Takamatsu D, Bergman E, Segura M. 2014. Implication of TLR- but not of NOD2-signaling pathways in dendritic cell activation by group B *Streptococcus* serotypes III and V. *PLoS ONE* 9:e113940.
36. Dominguez-Punaro MC, Segura M, Radzioch D, Rivest S, Gottschalk M. 2008. Comparison of the susceptibilities of C57BL/6 and A/J mouse strains to *Streptococcus suis* serotype 2 infection. *Infect Immun* 76:3901-3910.

37. Gottschalk M, Segura M. 2000. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet Microbiol* 76:259-272.
38. Dominguez-Punaro MC, Segura M, Plante MM, Lacouture S, Rivest S, Gottschalk M. 2007. *Streptococcus suis* serotype 2, an important swine and human pathogen, induces strong systemic and cerebral inflammatory responses in a mouse model of infection. *J Immunol* 179:1842-1854.
39. Gottschalk M, Xu J, Calzas C, Segura M. 2010. *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? *Future Microbiol* 5:371-391.
40. Madan-Lala R, Sia JK, King R, Adekambi T, Monin L, Khader SA, Pulendran B, Rengarajan J. 2014. *Mycobacterium tuberculosis* impairs dendritic cell functions through the serine hydrolase Hip1. *J Immunol* 192:4263-4272.
41. Richardson ET, Shukla S, Sweet DR, Wearsch PA, Tschlis PN, Boom WH, Harding CV. 2015. Toll-Like Receptor 2-Dependent Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling in *Mycobacterium tuberculosis*-Infected Macrophages Drives Anti-Inflammatory Responses and Inhibits Th1 Polarization of Responding T Cells. *Infect Immun* 83:2242-2254.
42. Ghorpade DS, Holla S, Sinha AY, Alagesan SK, Balaji KN. 2013. Nitric oxide and KLF4 protein epigenetically modify class II transactivator to repress major histocompatibility complex II expression during *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin infection. *J Biol Chem* 288:20592-20606.
43. De Gassart A, Camosseto V, Thibodeau J, Ceppi M, Catalan N, Pierre P, Gatti E. 2008. MHC class II stabilization at the surface of human dendritic cells is the result of maturation-dependent MARCH I down-regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:3491-3496.
44. Hunt D, Wilson JE, Weih KA, Ishido S, Harton JA, Roche PA, Drake JR. 2012. *Francisella tularensis* elicits IL-10 via a PGE(2)-inducible factor, to drive macrophage MARCH1 expression and class II down-regulation. *PLoS One* 7:e37330.
45. Li F, Lu JY, Liu Q, Wang HW, Guo H. 2013. Altered MARCH1 ubiquitination-regulated dendritic cell immune functions during the early stage of zymosan-induced multiple organ dysfunction syndrome (MODS) in mice. *Immunol Lett* 150:105-115.
46. Joffre O, Nolte MA, Sporri R, Reis e Sousa C. 2009. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol Rev* 227:234-247.
47. Vega-Ramos J, Roquilly A, Asehnoune K, Villadangos JA. 2014. Modulation of dendritic cell antigen presentation by pathogens, tissue damage and secondary inflammatory signals. *Curr Opin Pharmacol* 17:64-70.

48. Xiaoxiao W, Sibiao Y, Xiaopeng X, Ping Z, Gang C. 2007. Neutrophils induce the maturation of immature dendritic cells: a regulatory role of neutrophils in adaptive immune responses. *Immunol Invest* 36:337-350.

IV. DISCUSSION

1. Faible réponse T CD4⁺ mémoire centrale contre *S. suis*

Jusqu'à tout récemment, la réponse des lymphocytes T CD4⁺ dans l'infection par *S. suis* était essentiellement inconnue. Cependant, des résultats obtenus dans notre laboratoire ont permis de démontrer que ces cellules étaient impliquées dans la réponse contre *S. suis* en induisant une réponse de type Th1. Néanmoins, les niveaux de cytokines associées à ce profil Th1, telles que le TNF- α et l'IFN- γ , étaient très faibles malgré des conditions non-cytotoxiques. Cela suggérait que l'activation des T CD4⁺ était sous-optimale, d'autant plus que ces cellules produisaient de l'IL-10, une cytokine généralement associée à de l'immunorégulation, et qu'elles ne pouvaient réguler à la hausse leur expression du marqueur d'activation CD69 ou de la molécule de costimulation CD40L. Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggérait que le développement d'une réponse Th1 efficace était compromis lors de l'infection par *S. suis* (ARTICLE I). Les implications d'une telle conclusion sont évidentes, étant donné le rôle clé des lymphocytes T CD4⁺ dans l'initiation et l'orchestration de la réponse adaptative, et plus particulièrement celui des anticorps de type 1 (induits lors de réponse Th1) qui participent à l'élimination de *S. suis* par opsonophagocytose.

Les niveaux de cytokines produites par les lymphocytes T CD4⁺ étant demeurés faibles même après une infection secondaire, nous avons émis l'hypothèse que la réponse T CD4⁺ mémoire était également limitée durant l'infection par *S. suis*. En effet, bien que les voies de génération de ces cellules demeurent encore quelque peu débattues, il est clair que des lymphocytes T CD4⁺ mémoires peuvent être générés à partir de cellules effectrices ayant été différenciées au cours de la réponse primaire et émerger aussi tôt que trois jours après une infection (96, 130, 138). Or, en étudiant les populations T CD4⁺ mémoires dans la rate de souris infectées par *S. suis* [un modèle d'infection bien établi dans notre laboratoire (69)], nous avons pu mettre en évidence une faible réponse T CD4⁺ mémoire centrale qui persistait même après une infection secondaire. Cette importante population est connue pour résider dans les tissus lymphoïdes secondaires (d'où la pertinence d'étudier la rate) et se différencier rapidement en sous-types effecteurs lors de réexposition à l'antigène (96). Ces résultats contrastent avec ceux obtenus dans des expériences menées en parallèle avec le streptocoque du groupe B (GBS), un pathogène encapsulé causant également des infections invasives

pouvant mener au choc septique et à la méningite (ANNEXE I) (188). Ainsi, il apparaît que l'hôte ne parvient pas à générer de véritable réponse T CD4⁺ mémoire centrale en réponse à *S. suis*. De plus, bien qu'une expansion des sous-populations T CD4⁺ effectrices soit observée dans la rate des souris infectées dès 7 jours après une infection primaire, il semble que cette augmentation ne puisse être attribuée à la génération de cellules T CD4⁺ mémoires effectrices. Cette sous-population mémoire se localisant toutefois préférentiellement dans les tissus périphériques, ces résultats doivent être interprétés prudemment et des analyses supplémentaires à partir de cellules dérivées de nœuds lymphatiques périphériques ou du foie seraient requises pour confirmer qu'il ne s'agit pas uniquement d'une migration de la population T CD4⁺ mémoire effectrice à l'extérieur de la rate (139). Néanmoins, l'ensemble de ces résultats suggère que la réponse T CD4⁺ mémoire contre *S. suis* est globalement limitée et supporte l'hypothèse selon laquelle *S. suis* interfère avec le développement d'une réponse immunitaire adaptative efficace (ARTICLE I).

2. Modulation de l'expression du MHC-II par *S. suis*

En raison de son rôle clé à l'interface entre l'immunité innée et adaptative, la présentation antigénique via le MHC-II peut être la cible de pathogènes cherchant à déjouer la réponse immunitaire de l'hôte. En effet, une telle stratégie a été décrite chez plusieurs bactéries : *Mycobacterium tuberculosis* (189), *Yersinia enterocolitica* (190), *Salmonella enterica* serovars Typhi and Typhimurium (191, 192), *Brucella suis* (193), *Staphylococcus aureus* (194) et *Streptococcus mutans* (195). Étant donné les évidences suggérant que la réponse adaptative en réponse à *S. suis* est limitée, nous avons investigué la capacité de cet important pathogène porcin à moduler, lui aussi, la voie du MHC-II.

2.1 Résultats obtenus *in vitro*

Les molécules du MHC-II étant encodées par des gènes hautement polymorphiques, l'utilisation d'un modèle *in vitro* limitant la variabilité génétique est apparue essentielle. Des DCs dérivées de la moelle osseuse (bmDCs) chez la souris ont donc été utilisées pour nos premières études. La génération de bmDCs murines est une technique couramment utilisée dans le milieu scientifique, notamment parce qu'elle permet d'obtenir un grand nombre de DCs. Bien qu'une certaine hétérogénéité cellulaire soit attendue avec ce type de différenciation *in vitro* (109), ce modèle s'est avéré extrêmement utile dans le cadre de ce projet pour améliorer notre compréhension des interactions de *S. suis* avec les DCs.

2.1.1 Cinétique d'expression du MHC-II retardée

Jusqu'à ce jour, l'expression du MHC-II chez les DCs stimulées avec *S. suis* n'avait été étudiée qu'à des temps longs (16 h), à la manière d'un simple marqueur de maturation cellulaire. Or, les événements survenant dans les premières heures suivant la stimulation antigénique semblent déterminants dans la sélection du répertoire de peptides présentés aux lymphocytes T CD4⁺. Par exemple, un manque de coordination dans la voie exogène de la présentation antigénique pourrait permettre à un pathogène de tirer profit de la maturation de la DC si l'exportation des molécules du MHC-II vers la surface cellulaire survient avant l'accessibilité des antigènes et le chargement peptidique des molécules (8). C'est donc dans cet optique que nous nous sommes intéressés à la cinétique de l'expression du MHC-II à la surface de DCs stimulées avec *S. suis*. Sachant qu'il ne faut habituellement qu'entre une et trois heures aux antigènes internalisés pour se retrouver à la surface cellulaire sous la forme de complexes pMHC-II (96), des temps courts d'incubation de 1, 2 et 4 h ont été choisis, parallèlement à des temps plus longs de 12 et 18 h pour fins de comparaison avec la littérature.

Nous avons observé par cytométrie de flux que les niveaux d'expression du MHC-II avec la souche sauvage encapsulée de *S. suis* demeuraient, à des temps courts, essentiellement comparables à ceux de cellules à l'état basal. Ces niveaux augmentaient ensuite progressivement dans le temps, jusqu'à atteindre vers 12 h des niveaux similaires à ceux obtenus dès une heure avec le LPS. Toutefois, puisqu'une bactérie vivante entière et un ligand

pur d'un TLR interagissent vraisemblablement avec les cellules de manières distinctes, ces résultats pourraient simplement refléter des différences dans les processus d'initiation de la maturation des DCs. Néanmoins, l'utilisation d'un mutant non-encapsulé de *S. suis* a permis de mettre en évidence un effet lié à la présence de la CPS sur la modulation de la cinétique d'expression du MHC-II. Ceci nous permet donc de conclure que les souches encapsulées de *S. suis* induisent un retard dans l'expression du MHC-II à la surface des DCs (ARTICLE II). Les conséquences de ce délai d'expression demeurent incertaines dans la mesure où celui-ci est corrigé plus tard, mais il pourrait n'être que le reflet en surface de modulations intracellulaires beaucoup plus graves. L'utilisation d'un système de coculture DC-T CD4⁺ en combinaison avec un antigène rapporteur permettrait d'évaluer *in vitro* les conséquences fonctionnelles de cette modulation de la cinétique d'expression du MHC-II à la surface des DCs. Pour ce faire, des DCs prétraitées avec *S. suis* et incubées avec l'ovalbumine (OVA) pourraient être mises en culture avec des lymphocytes T CD4⁺ dont le TCR est spécifique pour un peptide dérivé de l'OVA. La production d'IL-2 ou de cytokines effectrices (IFN- γ , TNF- α ou IL-4, par exemple) pourrait ensuite être évaluée dans le surnageant comme indice de la prolifération et de l'activation spécifique des T CD4⁺ : une diminution de cette réponse proliférative ou effectrice reflèterait spécifiquement une perturbation de la capacité d'apprêtement et de présentation de l'antigène des DCs prétraitées avec *S. suis*. Dans la littérature, de telles cellules T CD4⁺ spécifiques pour l'OVA sont habituellement obtenues à partir de souris transgéniques OT-II (182) ou d'un hybridome comme la lignée BO.97 (196).

Les molécules du MHC-II détectées par cytométrie de flux à la surface cellulaire pouvant tout aussi bien représenter des molécules du MHC-II fonctionnelles chargées d'un peptide antigénique (Figure 1, à droite) que des complexes de molécules du MHC-II nouvellement synthétisées couplées à la chaîne invariable (Figure 1, à gauche), il demeure à ce stade impossible de déterminer dans quelle mesure *S. suis* interfère avec le chargement peptidique. En effet, pour répondre à cette question, des anticorps reconnaissant spécifiquement des peptides dérivés de *S. suis* sur le sillon des molécules du MHC-II seraient requis. À défaut de disposer de tels outils, nous avons procédé à la perméabilisation des cellules afin d'évaluer l'expression totale du MHC-II et ainsi déduire la proportion de molécules comprises dans le réservoir intracellulaire aux différents temps d'incubation. En

effet, une meilleure compréhension du transit intracellulaire du MHC-II fournirait un indice sur l'efficacité du chargement peptidique des molécules en réponse à la stimulation avec *S. suis*. Cependant, aucune modulation à ce niveau ne fut observée (résultats non-présentés), ce qui n'est pas surprenant étant donné le peu de fluctuation rapporté dans les niveaux d'expression totale du MHC-II chez les DCs immatures et matures (160). Des analyses par microscopie confocale fluorescente seraient en fait beaucoup plus appropriées dans l'évaluation du transit intracellulaire des molécules du MHC-II par colocalisation à l'aide de différents marqueurs endosomaux (175, 181).

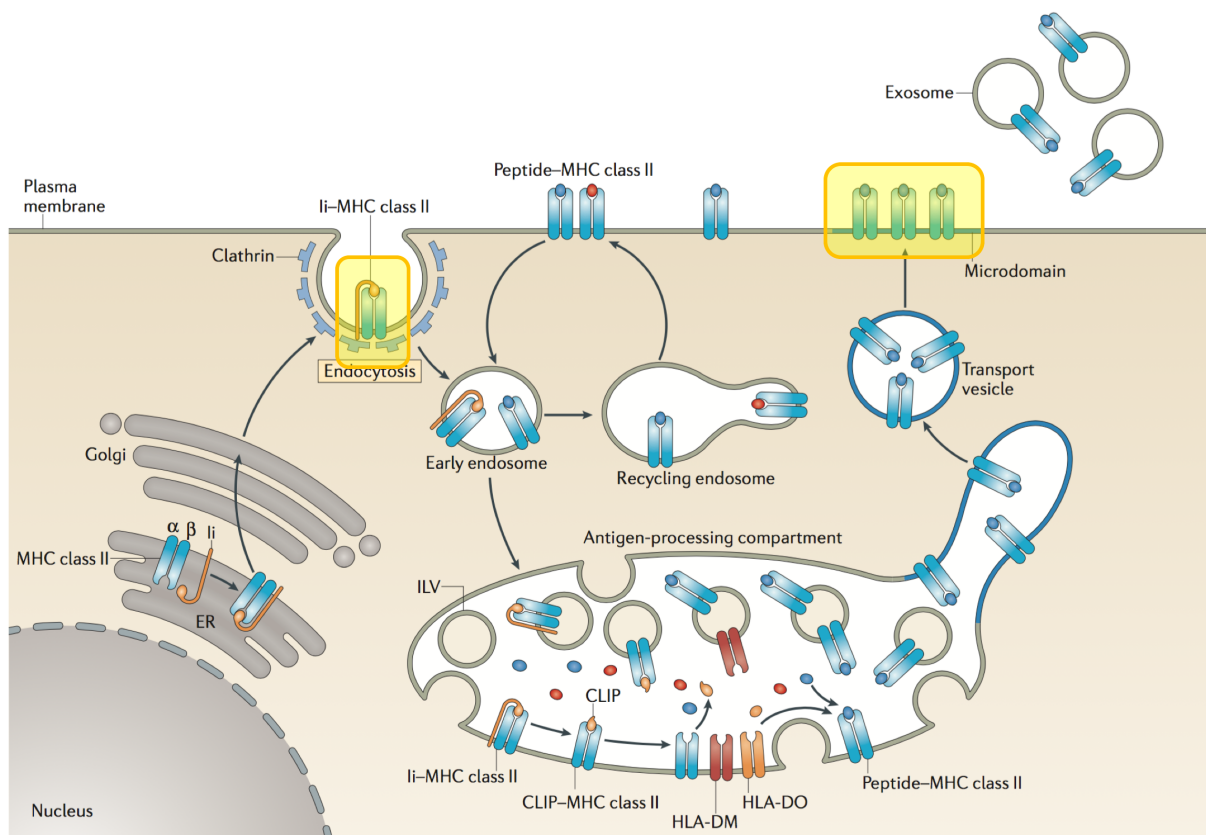


Figure 1. Chargement des molécules du MHC-II retrouvées à la surface cellulaire. À gauche, une molécule du MHC-II nouvellement synthétisée couplée à la chaîne invariable (en orange) et à droite, des molécules du MHC-II fonctionnelles chargées d'un peptide antigénique : ces molécules peuvent être retrouvées simultanément à la surface cellulaire. MHC-II : complexe majeur d'histocompatibilité de classe II; ER : réticulum endoplasmique; Ii : chaîne invariable; MIIC : compartiment du MHC-II; CLIP : fragment associé à la chaîne invariable; HLA-DM, -DO : molécules non-classiques du MHC-II; ILV : vésicules intra-luminales; pMHC-II : complexes peptide-MHC-II. Adapté avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : [Nature Reviews Immunology], de Roche et Furuta (165), copyright (2015). Les encadrés jaunes ont été ajoutés sur la figure.

2.1.2 Pistes mécanistiques envisagées

Nous nous sommes ensuite intéressés dans un deuxième temps aux mécanismes potentiellement utilisés par *S. suis* pour moduler l'expression du MHC-II à la surface des DCs. À ce jour, peu d'études mécanistiques ont été réalisées chez des pathogènes modulant la voie du MHC-II. Les effets du LPS sur la régulation de cette voie ayant été relativement bien caractérisés (contrairement à ceux des antigènes dérivés de bactéries à Gram positif), ce ligand du TLR a donc été utilisé, ici aussi, pour fins de comparaison avec la littérature lorsque cela était pertinent.

La première piste mécanistique investiguée fut la régulation de la synthèse de nouvelles molécules du MHC-II. En effet, bien que des peptides antigéniques puissent être présentés tant sur des molécules nouvellement synthétisées que recyclées (116), les molécules nouvellement synthétisées constitueraient la source principale pour la présentation antigénique (117). Or, nous avons pu observer de faibles niveaux transcriptionnels du maître régulateur du MHC-II (*Ciita*) chez les DCs stimulées avec *S. suis*, tant chez la souche sauvage que non-encapsulée, alors que des niveaux transitoirement élevés auraient plutôt dû être obtenus à l'instar de la réponse observée avec le LPS. En effet, suivant l'exposition à un ligand du TLR, une augmentation transitoire de la synthèse de nouvelles molécules du MHC-II est attendue dès une heure et persisterait pour 10-16 heures, avant d'être complètement bloquée de façon à privilégier la présentation de la cohorte de peptides dérivés du pathogène ayant induit la maturation cellulaire (116, 117). Il serait intéressant de confirmer si la modulation de l'expression de *Ciita* que nous avons observée persiste après une stimulation avec l'IFN- γ chez des DCs prétraitées avec *S. suis*, tel que démontré chez des macrophages murins infectés avec *M. tuberculosis* ou le BCG *M. bovis* (162, 197). Néanmoins, nos résultats suggèrent que la présentation des peptides dérivés de *S. suis* est fortement dépendante du recyclage des molécules du MHC-II à la surface cellulaire, en raison de la capacité limitée de synthèse de nouvelles molécules à temps courts.

Étant donné l'importance apparente du recyclage dans la présentation des peptides dérivés de *S. suis* tel que suggéré par la modulation de *Ciita*, nous nous sommes intéressés à la transcription des ligases MARCH1 et MARCH8 qui sont connues, chez les DCs immatures,

pour induire l'ubiquitination des molécules du MHC-II et ainsi bloquer le recyclage de ces dernières. Alors qu'une régulation à la baisse de *March1/8* a été observée chez les DCs stimulées avec le LPS tel qu'attendu chez des DCs matures par stimulation directe (197), des niveaux d'expression soutenus, voire augmentés, ont été obtenus chez les DCs stimulées avec la souche sauvage de *S. suis*. Ces résultats sont d'autant plus intéressants que la souche non-encapsulée a induit quant à elle des niveaux régulés à la baisse de façon similaire au LPS. Ces résultats sont importants, puisqu'ils confirment que les bactéries sont en mesure d'interagir rapidement avec les DCs dans notre système *in vitro*, tout comme le LPS solubilisé; le retard dans la cinétique d'expression du MHC-II ainsi que la faible expression de *Ciita* ne sont donc pas simplement causés par un défaut de contact entre les bactéries et les DCs. Ainsi, en plus de limiter la synthèse de nouvelles molécules du MHC-II, il semble que la souche encapsulée de *S. suis* parvienne à bloquer le recyclage des molécules et à favoriser leur dégradation en détournant la voie d'ubiquitination cellulaire à son avantage, tel que rapporté pour *Francisella tularensis* (185). La faible expression de CD86 à la surface des DCs stimulées par *S. suis* corrobore ces résultats, puisque cette molécule est également ubiquitinée par MARCH1. Néanmoins, le transit intracellulaire des molécules du MHC-II et de CD86 devrait être évalué par microscopie confocale afin de confirmer davantage ces résultats.

Toujours dans l'objectif d'évaluer les processus potentiellement impliqués dans le transit des molécules du MHC-II en réponse à la stimulation avec *S. suis*, nous nous sommes intéressés à l'expression du MHC-II dans les radeaux lipidiques. En effet, ces microdomaines membranaires sont connus pour recruter une variété de protéines transmembranaires et faciliter différents événements cellulaires, notamment le trafic membranaire des molécules du MHC-II et des molécules de co-signalisation ainsi que l'activation des lymphocytes T CD4⁺ (178, 199). Or, des études réalisées dans notre laboratoire avec des macrophages ont démontré que la CPS de *S. suis* déstabilise les radeaux lipidiques à la surface cellulaire après seulement 30-60 min d'incubation avec une souche encapsulée, ce qui a pour conséquence d'en inhiber la phagocytose (Figure 2B) (80). Nous avons donc voulu explorer cette piste mécanistique qui pourrait contribuer à expliquer la faible expression du MHC-II à temps courts chez les DCs. Pour ce faire, des bmDCs ont été stimulées pendant une heure avec la souche sauvage de *S. suis* ou le mutant non-encapsulé, tandis que des cellules non-stimulées ont été utilisées

comme contrôles. Puis, les cellules ont été récoltées et incubées dans un tampon de lyse contenant un détergent selon différents protocoles d'extraction des radeaux lipidiques (80, 200, 201). Les membranes ont ensuite été fractionnées par ultracentrifugation sur gradient (tel qu'illustré à la Figure 2A). Nous avons toutefois rapidement dû faire face à de nombreux problèmes liés à la faible concentration des échantillons, au manque de reproductibilité technique au moment du dépôt du gradient dans les tubes et de la collecte des fractions, ainsi qu'à l'impossibilité de concentrer et doser le contenu en protéines des échantillons en raison d'interférences avec la préparation commerciale utilisée pour le gradient. Pour remédier à ces difficultés, nous avons tenté de normaliser le signal spécifique anti-MHC-II (clone M5/114 et révélation par chemiluminescence) sur la densité protéique totale par échantillon (différentes colorations testées : Coomassie, SYPRO Ruby, technologie StainFree, etc.) via des analyses densitométriques (202, 203). Des résultats préliminaires semblaient indiquer une perte de signal anti-MHC-II associée à l'augmentation de la MOI de la souche encapsulée dans les fractions correspondant aux radeaux lipidiques (Figure 2C). Cependant, les problèmes de reproductibilité technique entre les échantillons ont persisté, et cela en dépit des continuelles améliorations apportées au protocole. Nous avons également comparé le signal anti-MHC-II dans toutes les fractions du gradient, sans y voir de modulation reproductible entre les souches et les MOI (Figure 2D). Il ne nous est donc pas possible de conclure à une modulation de l'expression du MHC-II dans les radeaux lipidiques par *S. suis* en raison du manque de sensibilité de notre technique. À notre connaissance, une telle modulation par un pathogène n'a encore jamais été décrite. Cette piste mécanistique ne devrait toutefois pas être écartée complètement dans les recherches futures avec *S. suis*.

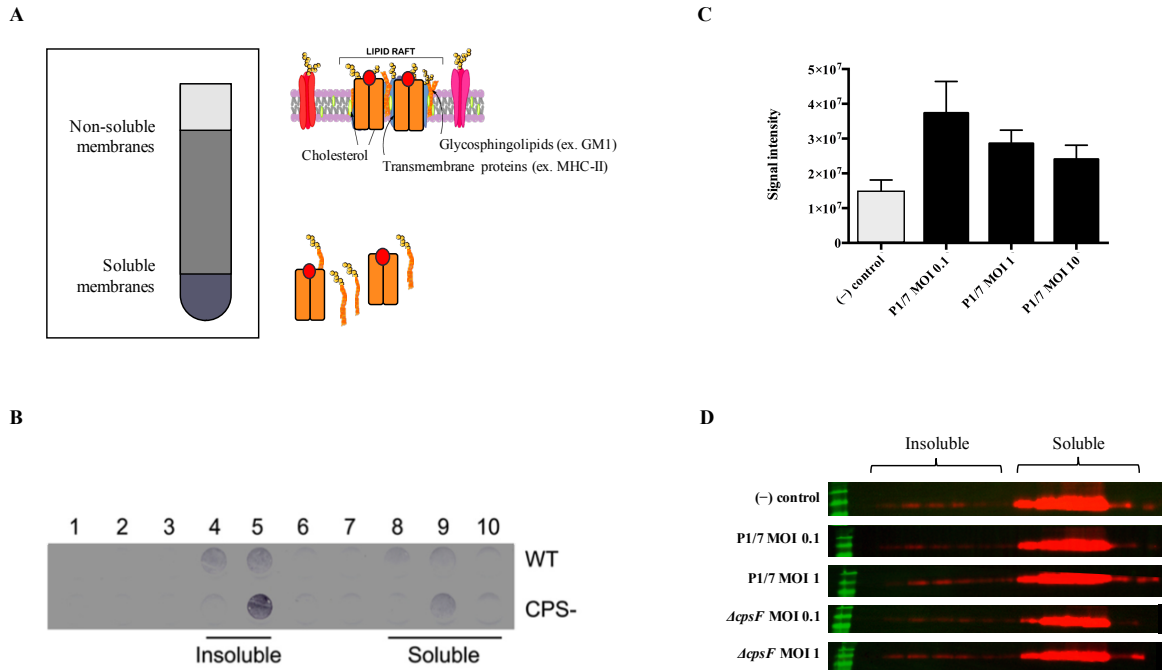


Figure 2. Étude de l'expression du MHC-II dans les radeaux lipidiques de cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (bmDCs) stimulées avec *S. suis*. A) Les cellules infectées ont été incubées dans un tampon de lyse en présence d'un détergent, puis fractionnées par ultracentrifugation sur gradient. Une dizaine de fractions ont ensuite été collectées. B) Les fractions situées à l'interface supérieure du gradient correspondent aux radeaux lipidiques insolubles dans le détergent, tel que vu par Dot Blot utilisant un marqueur contre le ganglioside GM1. Ce Dot Blot représente l'effet déstabilisateur de la CPS de *S. suis* sur les radeaux lipidiques des macrophages, tel que publié par Houde *et al.* (80). C) Une perte de signal spécifique pour le MHC-II (clone M5/114) dans les fractions insolubles correspondant aux radeaux lipidiques a été observée dans des expériences préliminaires et semblait être associée à l'augmentation de la MOI de la souche encapsulée de *S. suis*. Résultats obtenus par Western Blot révélé par chemiluminescence où le signal spécifique anti-MHC-II a été normalisé en fonction du signal protéique total obtenu dans chaque fraction (analyses densitométriques). D) Signal spécifique pour le MHC-II obtenu par Western Blot (révélation par chemiluminescence) dans les fractions insolubles et solubles lors d'une expérience. Aucune différence reproductible n'a été obtenue entre les expériences pour les différentes souches ou les MOI. WT : souche sauvage; CPS- : mutant non-encapsulé.

Panneaux A, C et D : Figures originales, Corinne Letendre (2016).

Panneau B : Adapté avec la permission de American Society for Microbiology – Journals : [Infection and Immunity], de Houde *et al.* (80), copyright (2012). Seul le temps d'incubation de 60 min a été conservé ici.

Finalement, nous nous sommes intéressés à la stabilité des peptides liés aux molécules du MHC-II. Bien que ce type d'analyses ne fasse pas l'unanimité dans la littérature, il semble que la stabilité des complexes pMHC-II dans le SDS varie à différentes températures (204-206). Il a été proposé par exemple que l'absence de dimères stables dans le SDS chez des DCs infectées par le cytomégalovirus humain reflète une incapacité à produire des complexes pMHC-II matures aptes à présenter efficacement les peptides viraux en début d'infection (207). Des bmDCs ont donc été stimulées pendant deux heures avec la souche sauvage de

S. suis ou le mutant non-encapsulé. Des cellules non-stimulées ou traitées avec le LPS ont également été utilisées comme contrôles. Le lysat cellulaire total (Figure 3B) ou l'extrait membranaire (Figure 3C) ont été analysés après avoir été incubés à température pièce (RT) ou chauffés à 65°C ou 98°C pendant cinq minutes. Sur les Figures 3B et C, la bande supérieure (~57 kDa) correspond au complexe assemblé (reconnu par le clone M5/114, principalement à RT), alors que la bande inférieure (~30 kDa) correspond plutôt aux chaînes seules (reconnues par le clone KL295, principalement après dénaturation à 98°C) (Figure 3A) (208). La stabilité des peptides dans le SDS correspond au ratio du signal obtenu dans la bande supérieure (conformation assemblée) à 65°C : RT. Malheureusement, nos échantillons étant particulièrement sensibles aux variations de température, la conservation à 4°C ou à -20°C a grandement compliqué l'analyse des résultats et nous empêche de tirer des conclusions définitives. De plus, l'absence d'apport de peptides exogènes dans notre système est discutable et pourrait également contribuer aux variations observées entre les expériences. Ainsi, l'effet d'un traitement avec *S. suis* ou le LPS serait possiblement plus appréciable chez des cellules incubées en présence d'OVA dans le milieu. Néanmoins, malgré les difficultés de reproductibilité technique, les cellules ayant été stimulées avec *S. suis* semblaient généralement afficher une plus faible stabilité peptidique que les cellules non-stimulées ou traitées avec le LPS. Ces résultats sont encourageants et cette possibilité de modulation par *S. suis* devrait être investiguée davantage.

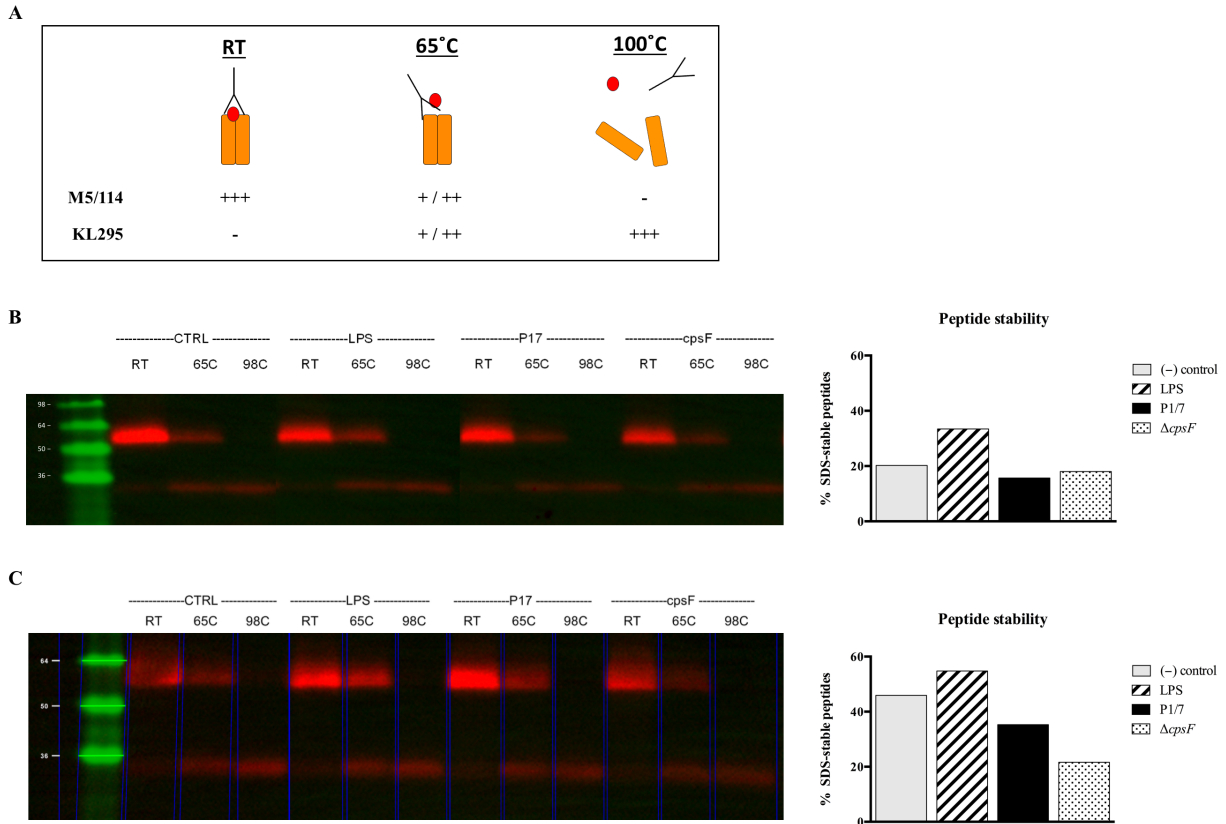


Figure 3. Étude de la stabilité des peptides sur les molécules du MHC-II chez des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (bmDCs) stimulées avec *S. suis*. A) Intensité du signal attendu à différentes températures avec les clones M5/114 (bande supérieure, ~57 kDa) et KL295 (bande inférieure, ~30 kDa). B, C) Les cellules infectées ou traitées avec le LPS ont été lysées mécaniquement, puis les lysats cellulaires totaux (B) ou les extraits membranaires obtenus par ultracentrifugation (C) ont été dosés par la méthode de Lowry. 10 μ g d'échantillon ont été soumis à différentes conditions de température (RT, 65 ou 98°C) pendant 5 min. Les échantillons resuspendus dans du 6X-Laemmli buffer contenant 6% de 2-mercaptoéthanol ont ensuite été migrés sur gel SDS-PAGE, puis analysés par Western Blot révélé par chemiluminescence. La stabilité des peptides correspond au ratio du signal obtenu dans la bande supérieure (conformation assemblée) à 65°C : RT. RT : température pièce; LPS : lipopolysaccharide; SDS : dodécylsulfate de sodium. Figure originale, Corinne Letendre (2016).

En somme, nous avons démontré dans cette partie du projet que *S. suis* module la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des molécules du MHC-II, du moins dans ce modèle *in vitro*. Il semble que la CPS ne joue qu'un rôle partiel dans cette modulation, un résultat peu surprenant en raison de l'important arsenal de facteurs de virulence dont *S. suis* dispose (ARTICLE II). L'implication d'autres facteurs de virulence doit donc être envisagée. La suilysine, une hémolysine produite par la souche sauvage P1/7 utilisée dans le cadre de nos expériences, pourrait notamment être impliquée, puisqu'elle est connue pour moduler d'autres

fonctions des DCs (4). Il serait également intéressant d'évaluer la régulation de l'expression du MHC-II chez des DCs stimulées avec des souches du sérotype 2 issues d'origines géographiques différentes afin de déterminer si la modulation du MHC-II est associée à la virulence de la souche. À notre connaissance, le rôle de la CPS chez les autres espèces bactériennes encapsulées modulant la voie du MHC-II n'a pas encore été spécifiquement investigué.

2.2 Résultats obtenus *in vivo*

Tel que discuté dans la recension de la littérature, les DCs peuvent entamer leur processus de maturation suivant la reconnaissance directe du pathogène (dir-mDCs) ou sa reconnaissance indirecte via des molécules pro-inflammatoires (indir-mDCs) (97). Or, les DCs de notre système *in vitro* n'ont pu être activées que de manière directe, puisque seule une relâche autocrine de cytokines pro-inflammatoires aurait pu survenir dans ce milieu fermé et celle-ci était vraisemblablement mineure aux temps étudiés. Ainsi, nous avons voulu employer une approche *in vivo* nous permettant de tenir compte de ce deuxième processus de maturation cellulaire. Nous avons donc procédé à des infections chez la souris pour évaluer l'expression du MHC-II à la surface cellulaire ainsi que l'expression de *Ciita* et *March1/8* chez des DCs spléniques purifiées par MACS, quelques heures après l'infection. Bien que ce type de purification ne nous permettait pas, de prime abord, de discriminer entre les deux types de DCs (dir-mDCs et indir-mDCs), cette première investigation des interactions de *S. suis* avec les DCs spléniques s'est avérée fort pertinente.

Le premier résultat important obtenu dans le cadre des infections *in vivo* réalisées pour ce volet du projet est la réduction de la sous-population de DCs spléniques MHC-II^{high} chez les souris infectées avec *S. suis*. Cette modulation dans l'intensité de l'expression du MHC-II suggère que ces DCs expriment un nombre réduit de molécules du MHC-II à leur surface et supporte par conséquent les résultats obtenus *in vitro* chez les bmDCs stimulées avec *S. suis*. Il n'est pas surprenant cependant que le profil de maturation des DCs spléniques (caractérisé par des niveaux d'expression du MHC-II maintenus en termes de pourcentage ainsi qu'une hausse de l'expression de CD86 par rapport aux souris naïves) diffère légèrement de celui observé *in*

vitro à temps courts puisque, *in vivo*, les interactions des DCs avec les autres types cellulaires et les médiateurs pro-inflammatoires retrouvés en circulation sont susceptibles de masquer les effets de *S. suis* sur l'expression du MHC-II et des marqueurs de maturation. Néanmoins, il est intéressant de noter que les DCs spléniques dérivées de souris infectées ont présenté des niveaux d'expression de *Ciita* et *March1/8* comparables aux résultats *in vitro*. En effet, les niveaux de *Ciita* étaient réduits par rapport aux souris naïves, alors que les niveaux d'expression de *March1/8* sont demeurés globalement maintenus (ARTICLE II). Ces résultats peuvent être interprétés, de manière plus ou moins satisfaisante, de trois façons (voir Figure 13 [p.39] de la revue de la littérature pour faciliter la compréhension) :

1. **Les DCs spléniques subissent une activation directe lors de l'infection par *S. suis*** : la régulation à la baisse de l'expression de *Ciita* peut être induite par un ligand du TLR, en assumant que la hausse transitoire de la synthèse de CIITA était terminée à ce temps. Une cinétique plus approfondie pourrait aider à valider cette hypothèse.
2. **Les DCs spléniques conservent un phénotype immature ou subissent un processus de maturation indirecte lors de l'infection par *S. suis*** : les niveaux d'expression de *March1/8* sont globalement maintenus chez les DCs entrant en contact avec des médiateurs inflammatoires, à la manière des DCs immatures. Cependant, bien que ces DCs conservent leur capacité à capturer et à présenter de nouveaux antigènes et régulent à la hausse leur expression des marqueurs de maturation (MHC-II et CD86), elles ne peuvent présenter de peptides antigéniques dérivés du pathogène et sont incapables de produire le signal 3 requis pour la pleine activation des T CD4⁺, tant qu'elles ne rencontrent pas le pathogène de façon directe.
3. **Les DCs spléniques subissent des modulations dans leurs voies de régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle du MHC-II lors de l'infection par *S. suis*** : les régulations à la baisse de l'expression de *Ciita* et à la hausse de *March1/8* pourraient être les conséquences de mécanismes d'évasion immunitaire utilisés par *S. suis*, tel que le suggèrent nos résultats *in vitro*.

Ainsi, une combinaison des explications #1 et 2 et/ou de l'explication #3 seule permettraient de rendre compte des changements observés simultanément dans la transcription de CIITA et de MARCH1/8. L'évaluation de la production de cytokines par les DCs spléniques dérivées de souris infectées aurait potentiellement permis de déterminer si ces DCs avaient globalement subi un processus de maturation directe (production d'IL-12) ou indirecte (pas de production d'IL-12). Il faut cependant souligner ici l'hétérogénéité des populations de DCs spléniques étudiées, ce qui complexifie encore davantage nos observations. De plus, l'inclusion d'une autre espèce bactérienne comme contrôle positif (ex. GBS) dans les études *in vivo* pourrait faciliter l'interprétation des résultats. Quant au rôle joué par la CPS à la surface de *S. suis*, celui-ci ne peut malheureusement pas être étudié *in vivo* puisque les mutants non-encapsulés de *S. suis* sont rapidement éliminés de la circulation.

Enfin, au-delà de la possibilité que *S. suis* ait recours à des stratégies de modulation de la voie du MHC-II afin d'éviter sa présentation antigénique et ainsi retarder l'initiation de la réponse adaptative, il est intéressant de s'interroger ici sur les conséquences de la maturation des DCs par les voies directe et indirecte dans la réponse contre des agents de surinfections. En effet, d'excellentes publications parues dans les dernières années suggèrent qu'une altération de la capacité de présentation antigénique des DCs soit directement en cause dans les cas d'immunosuppression associés à un sepsis bactérien (i.e. un syndrome de réponse inflammatoire systémique associé à une prolifération bactérienne dans le sang) (97, 117, 118). Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer cette immunosuppression secondaire :

1. Lors de sepsis bactérien, une charge élevée de ligands des TLR est retrouvée en circulation, ce qui conduit rapidement à l'activation d'une vaste majorité de DCs de façon directe et, conséquemment, à l'épuisement du réservoir de DCs immatures. Or, les dir-mDCs sont essentiellement incapables de capturer et de présenter de nouveaux antigènes et pourraient donc compromettre la capacité des DCs à répondre en cas de surinfection.
2. La relâche massive de médiateurs pro-inflammatoires lors de sepsis bactérien induit un programme de différenciation altéré chez les précurseurs des DCs qui ne peuvent plus compléter leurs fonctions de présentation antigénique de façon adéquate. Ainsi, malgré

un taux de renouvellement normal des DCs, la production de DCs « paralysées » pourrait persister pour plusieurs semaines jusqu'à ce que les niveaux de cytokines dans l'environnement local reviennent graduellement à la normale.

Ces hypothèses sont extrêmement intéressantes dans le contexte de l'infection par *S. suis* puisque des études réalisées dans notre laboratoire ont démontré que ce pathogène interférait avec la production d'anticorps contre un antigène hétérologue, l'OVA, administré deux jours suivant l'infection avec *S. suis*. Cette interférence a même persisté après une immunisation secondaire (« boost ») deux semaines après l'immunisation primaire. De plus, elle était corrélée à la présence de signes cliniques chez les souris (ARTICLE I). Ainsi, une altération de la capacité de présentation antigénique des DCs durant la phase aiguë de la maladie causée par *S. suis* pourrait possiblement interférer avec le développement d'une réponse adaptative protectrice à long terme.

À ce jour, beaucoup d'interrogations subsistent encore concernant la réponse adaptative développée lors de l'infection par *S. suis*. Des études réalisées dans notre laboratoire avec des souris T CD4 KO ont démontré un certain rôle des cellules T CD4 dans la survie lors d'infections primaires avec *S. suis* (ARTICLE I). Ces cellules pourraient potentiellement contribuer à l'activation des cellules de l'immunité innée (plus particulièrement les macrophages) et de la réponse à médiation cellulaire (cellules T CD8). Cependant, l'effet protecteur des cellules T CD4 semble dépendre de la charge bactérienne, puisque lors d'infections à des doses plus élevées, la mortalité était similaire entre les souris T CD4 KO et WT. De plus, les deux groupes présentaient des bactériémies comparables. Le rôle des cellules T CD4 demeure donc pour le moins complexe, mais il semble néanmoins limité, tel que le suggèrent les résultats présentés dans ce mémoire. Quant à la réponse humorale dirigée contre *S. suis* (dont le type et l'amplitude pourrait également être modulés par les cellules T CD4), les faibles niveaux de titres d'anticorps anti-*S. suis* observés chez la souris comparativement aux titres obtenus dans une même étude contre un antigène indépendant, l'OVA, semblent suggérer que cette réponse soit également restreinte (ARTICLE I). Les titres anti-*S. suis* ayant été obtenus dans cette étude étaient toutefois globalement un peu plus faibles que les titres anti-protéines spécifiques contre *S. suis*

rapportés précédemment chez la souris (76). Ces différences pourraient potentiellement s'expliquer par des différences de standardisation des ELISA, notamment puisque le « coating » des plaques fait avec le mutant non-encapsulé (76) est susceptible d'induire une meilleure reconnaissance des antigènes de surface par les anticorps, comparativement à un « coating » fait à l'aide de la souche sauvage encapsulée (ARTICLE I). Cette différence suggère également que la présence de la CPS à la surface de *S. suis* pourrait contribuer à l'évasion de l'immunité adaptative par ce pathogène. Par ailleurs, les titres observés chez la souris sont supérieurs à ceux obtenus chez le porc, tant lors d'une réponse primaire que secondaire (76, 209). Les raisons de ces variations inter-espèces demeurent inconnues, mais cela suggère que les observations réalisées chez le modèle murin concernant la possible interférence de *S. suis* avec le développement d'une réponse adaptative efficace sont également valables chez l'hôte naturel. Il demeure néanmoins très difficile de qualifier de « sous-optimale » la réponse humorale face à *S. suis* puisque, malgré les faibles titres d'anticorps obtenus, les animaux présentant de tels titres sont étonnamment protégés contre une réinfection, tant chez la souris que chez le porc (1, 76). L'immunité à médiation cellulaire, encore à ce jour inexplorée dans le contexte de *S. suis*, pourrait-elle par exemple contribuer au contrôle de l'infection ?

V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Ce projet de maîtrise a permis de démontrer :

- Une faible réponse T CD4⁺ mémoire centrale, supportant les autres évidences de la faible activation des lymphocytes T CD4⁺ en réponse à *S. suis*
- Une modulation de l'expression du MHC-II à la surface des DCs qui pourrait correspondre à une stratégie utilisée par *S. suis* pour échapper à la réponse immunitaire adaptative T dépendante via :
 - La régulation à la baisse de la synthèse de nouvelles molécules du MHC-II (via CIITA), compromettant ainsi la présentation d'une cohorte de peptides dérivés de *S. suis*
 - La régulation à la hausse de l'expression des molécules responsables de la dégradation lysosomale (MARCH1/8) des molécules du MHC-II, limitant ainsi le nombre de complexes peptides-MHC-II aptes à activer des lymphocytes T CD4⁺ à la surface cellulaire
- Un rôle partiel de la capsule de *S. suis* dans la modulation de la voie du MHC-II

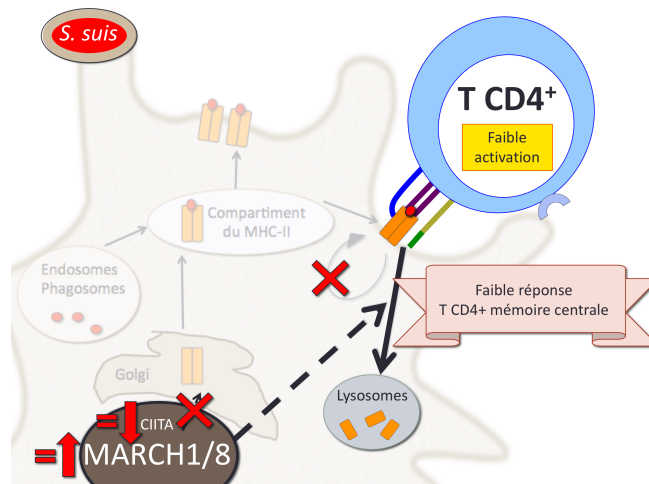


Figure 1. Modèle proposé des mécanismes utilisés par *S. suis* pour déjouer la voie T dépendante. *S. suis* module l'expression en surface du MHC-II et la présentation antigénique de ses peptides dérivés en régulant à la baisse la synthèse de nouvelles molécules du MHC-II et en favorisant leur dégradation lysosomale. Ceci entraîne conséquemment une faible activation des lymphocytes T CD4⁺, notamment celle des populations T CD4⁺ mémoires. La CPS ne jouerait qu'un rôle partiel dans la modulation de la voie du MHC-II. *CIITA* : transactivateur de classe II; *MARCH1/8* : ubiquitine ligases RING-CH-1/8 associées à la membrane; *MHC-II* : complexe majeur d'histocompatibilité de classe II; *CPS* : capsule polysaccharidique. Figure originale, Corinne Letendre (2016).

PERSPECTIVES

Les prochaines étapes pour cette recherche incluent :

Dans des études *in vitro*

- Poursuivre les études sur la modulation par *S. suis* de l'expression du MHC-II dans les radeaux lipidiques et de la stabilité des peptides liés aux molécules du MHC-II à l'aide de nouveaux protocoles expérimentaux
- Évaluer l'effet de souches de sérotype 2 d'origines géographiques différentes sur la modulation de la voie du MHC-II afin d'évaluer si cette modulation est associée à la virulence de la souche
- Évaluer la capacité de présentation antigénique de DCs traitées avec *S. suis* dans un système rapporteur de coculture DCs – T CD4⁺ afin de pouvoir lier clairement l'activation suboptimale des lymphocytes T CD4⁺ à un défaut de présentation antigénique sur le MHC-II

Dans des études *in vivo*

- Évaluer la production de cytokines par les DCs spléniques afin de déterminer le processus prédominant de maturation des DCs (directe ou indirecte) retrouvé lors de la phase aiguë de l'infection par *S. suis*
- Investiguer les programmes de différenciation activés chez les précurseurs de DCs durant l'infection par *S. suis*
- Développer des approches thérapeutiques ou vaccinales ciblant les signaux impliqués dans la paralysie prolongée des DCs afin de limiter les effets immunosuppresseurs à long terme associés à l'inflammation

VI. RÉFÉRENCES

1. Gottschalk M. 2012. Streptococcosis, p 841-855. In Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW (ed), Diseases of Swine, 10th ed. Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ.
2. Segura M. 2015. *Streptococcus suis* vaccines: candidate antigens and progress. Expert Rev Vaccines 14:1587-1608.
3. Goyette-Desjardins G, Auger JP, Xu J, Segura M, Gottschalk M. 2014. *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent—an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. Emerg Microbes Infect 3:e45.
4. Lecours MP, Gottschalk M, Houde M, Lemire P, Fittipaldi N, Segura M. 2011. Critical role for *Streptococcus suis* cell wall modifications and suilysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells. J Infect Dis 204:919-929.
5. Lecours MP, Segura M, Lachance C, Mussa T, Surprenant C, Montoya M, Gottschalk M. 2011. Characterization of porcine dendritic cell response to *Streptococcus suis*. Vet Res 42:72.
6. Meijerink M, Ferrando ML, Lammers G, Taverne N, Smith HE, Wells JM. 2012. Immunomodulatory effects of *Streptococcus suis* capsule type on human dendritic cell responses, phagocytosis and intracellular survival. PLoS ONE 7:e35849.
7. Rescigno M. 2015. Dendritic cell functions: Learning from microbial evasion strategies. Semin Immunol 27:119-124.
8. Hava DL, van der Wel N, Cohen N, Dascher CC, Houben D, Leon L, Agarwal S, Sugita M, van Zon M, Kent SC, Shams H, Peters PJ, Brenner MB. 2008. Evasion of peptide, but not lipid antigen presentation, through pathogen-induced dendritic cell maturation. Proc Natl Acad Sci U S A 105:11281-11286.
9. Kilpper-Balz R, Schleifer KH. 1987. *Streptococcus suis* sp. nov., nom. rev. Int J Syst Bacteriol 37:160-162.
10. Perch B, Pederson KB, Henrichsen J. 1983. Serology of Capsulated Streptococci Pathogenic for Pigs: Six New Serotypes of *Streptococcus suis*. J Clin Microbiol 17:993-996.
11. Rosendal S, Breton J, Henrichsen J, Hilt L, Mitchell WR. 1986. Isolation of *Streptococcus suis* using a selective medium. Can J Vet Res 50:537-539.
12. De Moor CE. 1963. Septicaemic Infections in Pigs, Caused by Haemolytic Streptococci of New Lancefield Groups Designated R, S, and T. Antonie Van Leeuwenhoek 29:272-280.

13. Staats JJ, Feder I, Okwumabua O, Chengappa MM. 1997. *Streptococcus suis* : past and present. Vet Res Commun 21:381-407.
14. Okura M, Takamatsu D, Maruyama F, Nozawa T, Nakagawa I, Osaki M, Sekizaki T, Gottschalk M, Kumagai Y, Hamada S. 2013. Genetic Analysis of Capsular Polysaccharide Synthesis Gene Clusters from All Serotypes of *Streptococcus suis*: Potential Mechanisms for Generation of Capsular Variation. Am Soc Microbiol 79:2796-2806.
15. Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Mittal KR, Henrichsen J. 1989. Description of 14 New Capsular Types of *Streptococcus suis*. J Clin Microbiol 27:2633-2636.
16. Gottschalk M, Segura M. 2000. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. Vet Microbiol 76:259-272.
17. Van Calsteren MR, Goyette-Desjardins G, Gagnon F, Okura M, Takamatsu D, Roy R, Gottschalk M, Segura M. 2016. Explaining the serological characteristics of *Streptococcus suis* serotypes 1 and 1/2 from their capsular polysaccharide structure and biosynthesis. J Biol Chem doi:10.1074/jbc.M115.700716.
18. Brousseau R, Hill JE, Préfontaine G, Goh SH, Harel J, Hemmingsen SM. 2001. *Streptococcus suis* Serotypes Characterized by Analysis of Chaperonin 60 Gene Sequences. Appl Environ Microbiol 67:4828-4833.
19. Fittipaldi N, Segura M, Grenier D, Gottschalk M. 2012. Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. Future Microbiol 7:259-279.
20. Van Calsteren MR, Gagnon F, Lacouture S, Fittipaldi N, Gottschalk M. 2010. Structure determination of *Streptococcus suis* serotype 2 capsular polysaccharide. Biochem Cell Biol 88:513-525.
21. Jacques M, Gottschalk M, Foiry B, Higgins R. 1990. Ultrastructural study of surface components of *Streptococcus suis*. J Bacteriol 172:2833-2838.
22. Van Calsteren MR, Gagnon F, Calzas C, Goyette-Desjardins G, Okura M, Takamatsu D, Gottschalk M, Segura M. 2013. Structure determination of *Streptococcus suis* serotype 14 capsular polysaccharide. Biochem Cell Biol 91:49-58.
23. Baums CG, Valentin-Weigand P. 2009. Surface-associated and secreted factors of *Streptococcus suis* in epidemiology, pathogenesis and vaccine development. Anim Health Res Rev 10:65-83.
24. Wertheim HF, Nghia HD, Taylor W, Schultz C. 2009. *Streptococcus suis*: an emerging human pathogen. Clin Infect Dis 48:617-625.

25. Hsueh KJ, Lee JW, Hou SM, Chen HS, Chang TC, Chu CY. 2013. Evaluation on a *Streptococcus suis* Vaccine Using Recombinant Sao-L Protein Manufactured by Bioreactors as the Antigen in Pigs. *Transbound Emerg Dis* doi:10.1111/tbed.12067.
26. Wei Z, Li R, Zhang A, He H, Hua Y, Xia J, Cai X, Chen H, Jin M. 2009. Characterization of *Streptococcus suis* isolates from the diseased pigs in China between 2003 and 2007. *Vet Microbiol* 137:196-201.
27. Wisselink HJ, Smith HE, Stockhofe-Zurwieden N, Peperkamp K, Vecht U. 2000. Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries. *Vet Microbiol* 74:237-248.
28. Mai NT, Hoa NT, Nga TV, Linh le D, Chau TT, Sinh DX, Phu NH, Chuong LV, Diep TS, Campbell J, Nghia HD, Minh TN, Chau NV, de Jong MD, Chinh NT, Hien TT, Farrar J, Schultsz C. 2008. *Streptococcus suis* meningitis in adults in Vietnam. *Clin Infect Dis* 46:659-667.
29. Baele M, Chiers K, Devriese LA, Smith HE, Wisselink HJ, Vaneechoutte M, Haesebrouck F. 2001. The Gram-positive tonsillar and nasal flora of piglets before and after weaning. *J Appl Microbiol* 91:997-1003.
30. Wisselink HJ, Joosten JJ, Smith HE. 2002. Multiplex PCR assays for simultaneous detection of six major serotypes and two virulence-associated phenotypes of *Streptococcus suis* in tonsillar specimens from pigs. *J Clin Microbiol* 40:2922-2929.
31. Vela AI, Goyache J, Tarradas C, Luque I, Mateos A, Moreno MA, Borge C, Perea JA, Dominguez L, Fernandez-Garayzabal JF. 2003. Analysis of genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs in Spain by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 41:2498-2502.
32. Cloutier G, D'Allaire S, Martinez G, Surprenant C, Lacouture S, Gottschalk M. 2003. Epidemiology of *Streptococcus suis* serotype 5 infection in a pig herd with and without clinical disease. *Vet Microbiol* 97:135-151.
33. Marois C, Le Devendec L, Gottschalk M, Kobisch M. 2007. Detection and molecular typing of *Streptococcus suis* in tonsils from live pigs in France. *Can J Vet Res* 71:14-22.
34. Wilson SM, Norton P, Haverson K, Leigh J, Bailey M. 2007. Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and cells of the myeloid lineage in the palatine tonsil of the pig. *Vet Immunol Immunopathol* 117:116-123.
35. Yang J, Jin M, Chen J, Yang Y, Zheng P, Zhang A, Song Y, Zhou H, Chen H. 2007. Development and evaluation of an immunochromatographic strip for detection of *Streptococcus suis* type 2 antibody. *J Vet Diagn Invest* 19:355-361.

36. Berthelot-Herault F, Gottschalk M, Labbe A, Cariolet R, Kobisch M. 2001. Experimental airborne transmission of *Streptococcus suis* capsular type 2 in pigs. *Vet Microbiol* 82:69-80.
37. Swildens B, Nielen M, Wisselink HJ, Verheijden JH, Stegeman JA. 2007. Elimination of strains of *Streptococcus suis* serotype 2 from the tonsils of carrier sows by combined medication and vaccination. *Vet Rec* 160:619-621.
38. Amass SF, SanMiguel P, Clark LK. 1997. Demonstration of Vertical Transmission of *Streptococcus suis* in Swine by Genomic Fingerprinting. *J Clin Microbiol* 35:1595-1596.
39. Amass SF, Clark LK, Knox K, Ching Wu C, Hill MA. 1996. *Streptococcus suis* colonization of piglets during parturition. *J Swine Health Prod* 4:269-272.
40. Reams RY, Glickman LT, Harrington DD, Bowersock TL, Thacker HL. 1993. *Streptococcus suis* infection in swine: a retrospective study of 256 cases. Part I. Epidemiologic factors and antibiotic susceptibility patterns. *J Vet Diagn Invest* 5:363-367.
41. MacInnes JI, Desrosiers R. 1999. Agents of the "Suis-ide Diseases" of Swine: *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, and *Streptococcus suis*. *Can J Vet Res* 63:83-89.
42. Su Y, Yao W, Perez-Gutierrez ON, Smidt H, Zhu WY. 2008. Changes in abundance of *Lactobacillus* spp. and *Streptococcus suis* in the stomach, jejunum and ileum of piglets after weaning. *FEMS Microbiol Ecol* 66:545-555.
43. Dee SA, Carlson AR, Winkelman NL, Corey MM. 1993. Effect of management practices on the *Streptococcus suis* carrier rate in nursery swine. *J Am Vet Md Assoc* 203:295-299.
44. Baums CG, Verkuhlen GJ, Rehm T, Silva LM, Beyerbach M, Pohlmeier K, Valentin-Weigand P. 2007. Prevalence of *Streptococcus suis* genotypes in wild boars of Northwestern Germany. *Appl Environ Microbiol* 73:711-717.
45. Thanawongnuwech R, Brown GB, Halbur PG, Roth JA, Royer RL, Thacker BJ. 2000. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced increase in susceptibility to *Streptococcus suis* infection. *Vet Pathol* 37:143-152.
46. Gottschalk M, Segura M, Xu J. 2007. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. *Anim Health Res Rev* 8:29-45.
47. Reams RY, Glickman LT, Harrington DD, Thacker HL, Bowersock TL. 1994. *Streptococcus suis* infection in swine: a retrospective study of 256 cases. Part II. Clinical signs, gross and microscopic lesions, and coexisting microorganisms. *J Vet Diagn Invest* 6:326-334.

48. Varela NP, Gadbois P, Thibault C, Gottschalk M, Dick P, Wilson J. 2013. Antimicrobial resistance and prudent drug use for *Streptococcus suis*. Anim Health Res Rev 14:68-77.
49. Li LL, Liao XP, Sun J, Yang YR, Liu BT, Yang SS, Zhao DH, Liu YH. 2012. Antimicrobial resistance, serotypes, and virulence factors of *Streptococcus suis* isolates from diseased pigs. Foodborne Pathog Dis 9:583-588.
50. Torremorell M, Calsamiglia M, Pijoan C. 1998. Colonization of suckling pigs by *Streptococcus suis* with particular reference to pathogenic serotype 2 strains. Can J Vet Res 62:21-26.
51. Amass SF, Struve R, Clark LK, Ching Wu C. 1996. Cesarean section: A surgical method to derive pigs free of *Streptococcus suis*. J Swine Health Prod 4:196-198.
52. Dekker N, Bouma A, Daemen I, Klinkenberg D, van Leengoed L, Wagenaar JA, Stegeman A. 2013. Effect of Spatial Separation of Pigs on Spread of *Streptococcus suis* Serotype 9. PLoS ONE 8:e61339.
53. Pallares FJ, Schmitt CS, Roth JA, Evans RB, Kinyon JM, Halbur PG. 2004. Evaluation of a ceftiofur-washed whole cell *Streptococcus suis* bacterin in pigs. Can J Vet Res 68:236-240.
54. Haesebrouck F, Pasmans F, Chiers K, Maes D, Ducatelle R, Decostere A. 2004. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? Vet Microbiol 100:255-268.
55. Charland N, Jacques M, Lacouture S, Gottschalk M. 1997. Characterization and protective activity of a monoclonal antibody against a capsular epitope shared by *Streptococcus suis* serotypes 1, 2 and 1/2. Microbiology 143:3607-3614.
56. Elliott SD, Clifton-Hadley F, Tai J. 1980. Streptococcal infection in young pigs. V. An immunogenic polysaccharide from *Streptococcus suis* type 2 with particular reference to vaccination against streptococcal meningitis in pigs. J Hyg (Lond) 85:275-285.
57. Gottschalk M, Xu J, Calzas C, Segura M. 2010. *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? Future Microbiol 5:371-391.
58. Holden MT, Hauser H, Sanders M, Ngo TH, Cherevach I, Cronin A, Goodhead I, Mungall K, Quail MA, Price C, Rabbinowitsch E, Sharp S, Croucher NJ, Chieu TB, Mai NT, Diep TS, Chinh NT, Kehoe M, Leigh JA, Ward PN, Dowson CG, Whatmore AM, Chanter N, Iversen P, Gottschalk M, Slater JD, Smith HE, Spratt BG, Xu J, Ye C, Bentley S, Barrell BG, Schultsz C, Maskell DJ, Parkhill J. 2009. Rapid evolution of virulence and drug resistance in the emerging zoonotic pathogen *Streptococcus suis*. PLoS ONE 4:e6072.

59. Bahloul H, Mofredj A, Mrabet A, Gineyt G. 2008. Méningite à *Streptococcus suis* secondaire à une contamination orale ? Med Mal Infect 38:281-282.
60. Lun Z-R, Wang Q-P, Chen X-G, Li A-X, Zhu X-Q. 2007. *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. Lancet Infect Dis 7:201-209.
61. Francois B, Gissot V, Ploy MC, Vignon P. 1998. Recurrent septic shock due to *Streptococcus suis*. J Clin Microbiol 36:2395.
62. Huh HJ, Park KJ, Jang JH, Lee M, Lee JH, Ahn YH, Kang CI, Ki CS, Lee NY. 2011. *Streptococcus suis* meningitis with bilateral sensorineural hearing loss. Korean J Lab Med 31:205-211.
63. Wilson RP, Griffith JW. 2000. Endocarditis and Meningitis Caused by *Streptococcus suis* After Cardiac Surgery in a Sheep. Contemp Topics Lab Anim Sci 39:43-46.
64. Devriese LA, Desmidt M, Roels S, Hoorens J, Haesebrouck F. 1993. *Streptococcus suis* infection in fallow deer. Vet Rec 132:283.
65. Muckle A, Giles J, Lund L, Stewart T, Gottschalk M. 2010. Isolation of *Streptococcus suis* from the urine of a clinically ill dog. Can Vet J 51:773-774.
66. Higgins R, Lagacé A, Messier S, Julien L. 1997. Isolation of *Streptococcus suis* from a young wild boar. Can Vet J 38:114.
67. Devriese LA, Haesebrouck F, de Herdt P, Dom P, Ducatelle R, Desmidt M, Messier S, Higgins R. 1994. *Streptococcus suis* infections in birds. Avian Pathol 23:721-724.
68. Ishigaki K, Nakamura A, Iwabuchi S, Kodera S, Ooe K, Kataoka Y, Aida Y. 2009. A case of *Streptococcus suis* endocarditis, probably bovine-transmitted, complicated by pulmonary embolism and spondylitis. Kansenshogaku Zasshi 83:544-548.
69. Dominguez-Punaro MC, Segura M, Plante MM, Lacouture S, Rivest S, Gottschalk M. 2007. *Streptococcus suis* serotype 2, an important swine and human pathogen, induces strong systemic and cerebral inflammatory responses in a mouse model of infection. J Immunol 179:1842-1854.
70. Dominguez-Punaro MC, Segura M, Radzioch D, Rivest S, Gottschalk M. 2008. Comparison of the susceptibilities of C57BL/6 and A/J mouse strains to *Streptococcus suis* serotype 2 infection. Infect Immun 76:3901-3910.
71. Zheng H, Ye C, Segura M, Gottschalk M, Xu J. 2008. Mitogenic effect contributes to increased virulence of *Streptococcus suis* sequence type 7 to cause streptococcal toxic shock-like syndrome. Clin Exp Immunol 153:385-391.
72. Esgleas M, Dominguez-Punaro Mde L, Li Y, Harel J, Dubreuil JD, Gottschalk M. 2009. Immunization with SsEno fails to protect mice against challenge with *Streptococcus suis* serotype 2. FEMS Microbiol Lett 294:82-88.

73. Lachance C, Gottschalk M, Gerber PP, Lemire P, Xu J, Segura M. 2013. Exacerbated Type II Interferon Response Drives Hypervirulence and Toxic Shock by an Emergent Epidemic Strain of *Streptococcus suis*. *Infect Immun* 81:1928-1939.
74. Lachance C, Segura M, Gerber PP, Xu J, Gottschalk M. 2013. Toll-Like Receptor 2-Independent Host Innate Immune Response against an Epidemic Strain of *Streptococcus suis* That Causes a Toxic Shock-Like Syndrome in Humans. *PLoS ONE* 8:e65031.
75. Lecours MP, Fittipaldi N, Takamatsu D, Okura M, Segura M, Goyette-Desjardins G, Van Calsteren MR, Gottschalk M. 2012. Sialylation of *Streptococcus suis* serotype 2 is essential for capsule expression but is not responsible for the main capsular epitope. *Microbes Infect* 14:941-950.
76. Calzas C, Lemire P, Auray G, Gerdts V, Gottschalk M, Segura M. 2015. Antibody response specific to the capsular polysaccharide is impaired in *Streptococcus suis* serotype 2-infected animals. *Infect Immun* 83:441-453.
77. Lecours MP, Segura M, Fittipaldi N, Rivest S, Gottschalk M. 2012. Immune receptors involved in *Streptococcus suis* recognition by dendritic cells. *PLoS ONE* 7:e44746.
78. Calzas C, Goyette-Desjardins G, Lemire P, Gagnon F, Lachance C, Van Calsteren MR, Segura M. 2013. Group B *Streptococcus* and *Streptococcus suis* capsular polysaccharides induce chemokine production by dendritic cells via Toll-like receptor 2- and MyD88-dependent and -independent pathways. *Infect Immun* 81:3106-3118.
79. Chabot-Roy G, Willson P, Segura M, Lacouture S, Gottschalk M. 2006. Phagocytosis and killing of *Streptococcus suis* by porcine neutrophils. *Microb Pathog* 41:21-32.
80. Houde M, Gottschalk M, Gagnon F, Van Calsteren MR, Segura M. 2012. *Streptococcus suis* capsular polysaccharide inhibits phagocytosis through destabilization of lipid microdomains and prevents lactosylceramide-dependent recognition. *Infect Immun* 80:506-517.
81. Tsiotou AG, Sakorafas GH, Anagnostopoulos G, Bramis J. 2005. Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Med Sci Monit* 11:RA76-85.
82. Feng Y, Zhang H, Ma Y, Gao GF. 2010. Uncovering newly emerging variants of *Streptococcus suis*, an important zoonotic agent. *Trends Microbiol* 18:124-131.
83. Chen C, Tang J, Dong W, Wang C, Feng Y, Wang J, Zheng F, Pan X, Liu D, Li M, Song Y, Zhu X, Sun H, Feng T, Guo Z, Ju A, Ge J, Dong Y, Sun W, Jiang Y, Wang J, Yan J, Yang H, Wang X, Gao GF, Yang R, Wang J, Yu J. 2007. A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *S. suis* 2 Chinese isolates. *PLoS ONE* 2:e315.

84. Ye C, Zheng H, Zhang J, Jing H, Wang L, Xiong Y, Wang W, Zhou Z, Sun Q, Luo X, Du H, Gottschalk M, Xu J. 2009. Clinical, Experimental, and Genomic Differences between Intermediately Pathogenic, Highly Pathogenic, and Epidemic *Streptococcus suis*. *J Infect Dis* 199:97-107.
85. Haselbach M, Wegener J, Decker S, Engelbertz C, Galla HJ. 2001. Porcine Choroid plexus epithelial cells in culture: regulation of barrier properties and transport processes. *Microsc Res Tech* 52:137-152.
86. Gray LD, Fedorko DP. 1992. Laboratory diagnosis of bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev* 5:130-145.
87. Auger JP, Christodoulides M, Segura M, Xu J, Gottschalk M. 2015. Interactions of *Streptococcus suis* serotype 2 with human meningeal cells and astrocytes. *BMC Res Notes* 8:607.
88. Scheld WM, Koedel U, Nathan B, Pfister HW. 2002. Pathophysiology of bacterial meningitis: mechanism(s) of neuronal injury. *J Infect Dis* 186 Suppl 2:S225-233.
89. Rodriguez RM, Lopez-Vazquez A, Lopez-Larrea C. 2012. Immune systems evolution. *Adv Exp Med Biol* 739:237-251.
90. Dempsey PW, Vaidya SA, Cheng G. 2003. The art of war: Innate and adaptive immune responses. *Cell Mol Life Sci* 60:2604-2621.
91. Day M, Schultz RD. 2011. *Veterinary immunology: principles and practice*, 256 p, 1st ed. Manson Publishing, London, UK.
92. Kawai T, Akira S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11:373-384.
93. Bonilla FA, Oettgen HC. 2010. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol* 125:S33-40.
94. Carreno LJ, Gonzalez PA, Kalergis AM. 2006. Modulation of T cell function by TCR/pMHC binding kinetics. *Immunobiology* 211:47-64.
95. Ramiscal RR, Vinuesa CG. 2013. T-cell subsets in the germinal center. *Immunol Rev* 252:146-155.
96. Owen J, Punt J, Stranford S. 2013. *Kuby Immunology*, 692 p, 7th ed. WH Freeman Co, New York, NY.
97. Vega-Ramos J, Roquilly A, Asehnoune K, Villadangos JA. 2014. Modulation of dendritic cell antigen presentation by pathogens, tissue damage and secondary inflammatory signals. *Curr Opin Pharmacol* 17:64-70.

98. Buning J, Schmitz M, Repenning B, Ludwig D, Schmidt MA, Strobel S, Zimmer KP. 2005. Interferon-gamma mediates antigen trafficking to MHC class II-positive late endosomes of enterocytes. *Eur J Immunol* 35:831-842.
99. Segura M. 2012. Fisher scientific award lecture - the capsular polysaccharides of Group B *Streptococcus* and *Streptococcus suis* differently modulate bacterial interactions with dendritic cells. *Can J Microbiol* 58:249-260.
100. Savina A, Amigorena S. 2007. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev* 219:143-156.
101. Satpathy AT, Wu X, Albring JC, Murphy KM. 2012. Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat Immunol* 13:1145-1154.
102. Lim TS, Goh JK, Mortellaro A, Lim CT, Hammerling GJ, Ricciardi-Castagnoli P. 2012. CD80 and CD86 differentially regulate mechanical interactions of T-cells with antigen-presenting dendritic cells and B-cells. *PLoS ONE* 7:e45185.
103. Yuseff MI, Pierobon P, Reversat A, Lennon-Dumenil AM. 2013. How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity. *Nat Rev Immunol* 13:475-486.
104. Lipscomb MF, Masten BJ. 2002. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev* 82:97-130.
105. Naik SH. 2010. Dendritic Cell Protocols, 446 p, 2nd ed. *In* Walker JM, *Methods of Molecular biology*, vol 595. Humana Press, New York, NY.
106. Belz GT, Nutt SL. 2012. Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nat Rev Immunol* 12:101-113.
107. Schmid MA, Kingston D, Boddupalli S, Manz MG. 2010. Instructive cytokine signals in dendritic cell lineage commitment. *Immunol Rev* 234:32-44.
108. Masurier C, Pioche-Durieu C, Colombo BM, Lacave R, Lemoine FM, Klatzmann D, Guigon M. 1999. Immunophenotypical and functional heterogeneity of dendritic cells generated from murine bone marrow cultured with different cytokine combinations: implications for anti-tumoral cell therapy. *Immunology* 96:569-577.
109. Helft J, Bottcher J, Chakravarty P, Zelenay S, Huotari J, Schraml BU, Goubau D, Reis e Sousa C. 2015. GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity* 42:1197-1211.
110. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327:656-661.

111. de Jong EC, Smits HH, Kapsenberg ML. 2005. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin Immunopathol* 26:289-307.
112. Kamphorst AO, Guermonprez P, Dudziak D, Nussenzweig MC. 2010. Route of antigen uptake differentially impacts presentation by dendritic cells and activated monocytes. *J Immunol* 185:3426-3435.
113. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 176:1693-1702.
114. Reid SD, Penna G, Adorini L. 2000. The control of T cell responses by dendritic cell subsets. *Curr Opin Immunol* 12:114-121.
115. Joffre O, Nolte MA, Sporri R, Reis e Sousa C. 2009. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol Rev* 227:234-247.
116. Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. 1997. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388:782-787.
117. Vega-Ramos J, Villadangos JA. 2013. Consequences of direct and indirect activation of dendritic cells on antigen presentation: functional implications and clinical considerations. *Mol Immunol* 55:175-178.
118. Vega-Ramos J, Roquilly A, Zhan Y, Young LJ, Mintern JD, Villadangos JA. 2014. Inflammation conditions mature dendritic cells to retain the capacity to present new antigens but with altered cytokine secretion function. *J Immunol* 193:3851-3859.
119. Hivroz C, Chemin K, Turret M, Bohineust A. 2012. Crosstalk between T lymphocytes and dendritic cells. *Crit Rev Immunol* 32:139-155.
120. Rocha-Perugini V, Sanchez-Madrid F, Martinez Del Hoyo G. 2015. Function and Dynamics of Tetraspanins during Antigen Recognition and Immunological Synapse Formation. *Front Immunol* 6:653.
121. Bakdash G, Sittig SP, van Dijk T, Figdor CG, de Vries IJ. 2013. The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal II. *Front Immunol* 4:53.
122. Li Y, Yin Y, Mariuzza RA. 2013. Structural and biophysical insights into the role of CD4 and CD8 in T cell activation. *Front Immunol* 4:206.
123. Huang WR, Wang LS, Da WM. 2004. [Recent advance on LFA-1/ICAM-1 costimulatory signal of T cell-review]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 12:533-537.

124. Noy E, Pauker MH, Barda-Saad M. 2013. Real-time live imaging of T-cell signaling complex formation. *J Vis Exp* doi:10.3791/50076.
125. Burkhardt JK, Carrizosa E, Shaffer MH. 2008. The actin cytoskeleton in T cell activation. *Annu Rev Immunol* 26:233-259.
126. Chen L, Flies DB. 2013. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 13:227-242.
127. Magombedze G, Reddy PB, Eda S, Ganusov VV. 2013. Cellular and population plasticity of helper CD4(+) T cell responses. *Front Physiol* 4:206.
128. Mazzoni A, Segal DM. 2004. Controlling the Toll road to dendritic cell polarization. *J Leukoc Biol* 75:721-730.
129. Kaiko GE, Horvat JC, Beagley KW, Hansbro PM. 2008. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* 123:326-338.
130. MacLeod MK, Kappler JW, Marrack P. 2010. Memory CD4 T cells: generation, reactivation and re-assignment. *Immunology* 130:10-15.
131. Reiner SL. 2008. Inducing the T cell fates required for immunity. *Immunol Res* 42:160-165.
132. Silaeva YY, Kalinina AA, Vagida MS, Khromykh LM, Deikin AV, Ermolkevich TG, Sadchikova ER, Goldman IL, Kazansky DB. 2013. Decrease in pool of T lymphocytes with surface phenotypes of effector and central memory cells under influence of TCR transgenic beta-chain expression. *Biochemistry (Mosc)* 78:549-559.
133. Zhu J, Paul WE. 2010. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res* 20:4-12.
134. Zhou L, Chong MM, Littman DR. 2009. Plasticity of CD4⁺ T cell lineage differentiation. *Immunity* 30:646-655.
135. Oh H, Ghosh S. 2013. NF-kappaB: roles and regulation in different CD4(+) T-cell subsets. *Immunol Rev* 252:41-51.
136. Swain SL, McKinstry KK, Strutt TM. 2012. Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol* 12:136-148.
137. Kim C, Wilson T, Fischer KF, Williams MA. 2013. Sustained Interactions between T Cell Receptors and Antigens Promote the Differentiation of CD4(+) Memory T Cells. *Immunity* 39:508-520.
138. Pepper M, Jenkins MK. 2011. Origins of CD4(+) effector and central memory T cells. *Nat Immunol* 12:467-471.

139. Stephens R, Langhorne J. 2010. Effector memory Th1 CD4 T cells are maintained in a mouse model of chronic malaria. *PLoS Pathog* 6:e1001208.
140. Liu ZZ, Xia JH, Xin LL, Wang ZG, Qian L, Wu SG, Yang SL, Li K. 2015. Swine leukocyte antigen class II genes (SLA-DRA, SLA-DRB1, SLA-DQA, SLA-DQB1) polymorphism and genotyping in Guizhou minipigs. *Genet Mol Res* 14:15256-15266.
141. Liu LX, Zhao SG, Lu HN, Yang QL, Huang XY, Gun SB. 2015. Association between polymorphisms of the swine MHC-DQA gene and diarrhoea in three Chinese native piglets. *Int J Immunogenet* 42:208-216.
142. Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P. 2013. Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol* 31:443-473.
143. Painter CA, Stern LJ. 2012. Conformational variation in structures of classical and non-classical MHCII proteins and functional implications. *Immunol Rev* 250:144-157.
144. Poluektov YO, Kim A, Sadegh-Nasseri S. 2013. HLA-DO and Its Role in MHC Class II Antigen Presentation. *Front Immunol* 4:260.
145. Deshaies F, Thibodeau J. 2005. [HLA-DO: regulator of the immune response]. *Med Sci (Paris)* 21:911-912.
146. Ting JP, Trowsdale J. 2002. Genetic control of MHC class II expression. *Cell* 109 Suppl:S21-33.
147. Busch R, Rinderknecht CH, Roh S, Lee AW, Harding JJ, Burster T, Hornell TM, Mellins ED. 2005. Achieving stability through editing and chaperoning: regulation of MHC class II peptide binding and expression. *Immunol Rev* 207:242-260.
148. Ten Broeke T, Wubbolts R, Stoorvogel W. 2013. MHC Class II Antigen Presentation by Dendritic Cells Regulated through Endosomal Sorting. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5.
149. Holland CJ, Cole DK, Godkin A. 2013. Re-Directing CD4(+) T Cell Responses with the Flanking Residues of MHC Class II-Bound Peptides: The Core is Not Enough. *Front Immunol* 4:172.
150. Neefjes J, Jongsma ML, Paul P, Bakke O. 2011. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 11:823-836.
151. Liu Z, Roche PA. 2015. Macropinocytosis in phagocytes: regulation of MHC class-II-restricted antigen presentation in dendritic cells. *Front Physiol* 6:1.
152. Seguin-Estevez Q, Dunand-Sauthier I, Lemeille S, Iseli C, Ibberson M, Ioannidis V, Schmid CD, Rousseau P, Barras E, Geinoz A, Xenarios I, Acha-Orbea H, Reith W. 2014. Extensive remodeling of DC function by rapid maturation-induced transcriptional silencing. *Nucleic Acids Res* 42:9641-9655.

153. Ramachandra L, Simmons D, Harding CV. 2009. MHC molecules and microbial antigen processing in phagosomes. *Curr Opin Immunol* 21:98-104.
154. Popova NV, Deyev IE, Petrenko AG. 2013. Clathrin-mediated endocytosis and adaptor proteins. *Acta Naturae* 5:62-73.
155. Hastings KT, Cresswell P. 2011. Disulfide reduction in the endocytic pathway: immunological functions of gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase. *Antioxid Redox Signal* 15:657-668.
156. Thibodeau J, Bourgeois-Daigneault MC, Lapointe R. 2012. Targeting the MHC Class II antigen presentation pathway in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 1:908-916.
157. Devaiah BN, Singer DS. 2013. CIITA and Its Dual Roles in MHC Gene Transcription. *Front Immunol* 4:476.
158. Drozina G, Kohoutek J, Jabrane-Ferrat N, Peterlin BM. 2005. Expression of MHC II genes. *Curr Top Microbiol Immunol* 290:147-170.
159. LeibundGut-Landmann S, Waldburger JM, Krawczyk M, Otten LA, Suter T, Fontana A, Acha-Orbea H, Reith W. 2004. Mini-review: Specificity and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes. *Eur J Immunol* 34:1513-1525.
160. Simmons DP, Wearsch PA, Canaday DH, Meyerson HJ, Liu YC, Wang Y, Boom WH, Harding CV. 2012. Type I IFN drives a distinctive dendritic cell maturation phenotype that allows continued class II MHC synthesis and antigen processing. *J Immunol* 188:3116-3126.
161. Harding CV, Boom WH. 2010. Regulation of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*: a role for Toll-like receptors. *Nat Rev Microbiol* 8:296-307.
162. Ghorpade DS, Holla S, Sinha AY, Alagesan SK, Balaji KN. 2013. Nitric oxide and KLF4 protein epigenetically modify class II transactivator to repress major histocompatibility complex II expression during *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin infection. *J Biol Chem* 288:20592-20606.
163. Cloutier M, Gauthier C, Fortin JS, Thibodeau J. 2014. The invariant chain p35 isoform promotes formation of nonameric complexes with MHC II molecules. *Immunol Cell Biol* 92:553-556.
164. Cloutier M, Gauthier C, Fortin JS, Geneve L, Kim K, Gruenheid S, Kim J, Thibodeau J. 2015. ER egress of invariant chain isoform p35 requires direct binding to MHCII molecules and is inhibited by the NleA virulence factor of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Hum Immunol* 76:292-296.

165. Roche PA, Furuta K. 2015. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol* 15:203-216.
166. Garstka MA, Neefjes J. 2013. How to target MHC class II into the MIIC compartment. *Mol Immunol* 55:162-165.
167. Fortin JS, Cloutier M, Thibodeau J. 2013. Exposing the Specific Roles of the Invariant Chain Isoforms in Shaping the MHC Class II Peptidome. *Front Immunol* 4:443.
168. Bosch B, Berger AC, Khandelwal S, Heipertz EL, Scharf B, Santambrogio L, Roche PA. 2013. Disruption of multivesicular body vesicles does not affect major histocompatibility complex (MHC) class II-peptide complex formation and antigen presentation by dendritic cells. *J Biol Chem* 288:24286-24292.
169. Mintern JD, Macri C, Villadangos JA. 2015. Modulation of antigen presentation by intracellular trafficking. *Curr Opin Immunol* 34:16-21.
170. Sadegh-Nasseri S, Natarajan S, Chou CL, Hartman IZ, Narayan K, Kim A. 2010. Conformational heterogeneity of MHC class II induced upon binding to different peptides is a key regulator in antigen presentation and epitope selection. *Immunol Res* 47:56-64.
171. Schulze MS, Wucherpennig KW. 2012. The mechanism of HLA-DM induced peptide exchange in the MHC class II antigen presentation pathway. *Curr Opin Immunol* 24:105-111.
172. Furuta K, Walseng E, Roche PA. 2013. Internalizing MHC class II-peptide complexes are ubiquitinated in early endosomes and targeted for lysosomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:20188-20193.
173. Oh J, Shin JS. 2015. Molecular mechanism and cellular function of MHCII ubiquitination. *Immunol Rev* 266:134-144.
174. van Niel G, Wubbolts R, Stoorvogel W. 2008. Endosomal sorting of MHC class II determines antigen presentation by dendritic cells. *Curr Opin Cell Biol* 20:437-444.
175. Bourgeois-Daigneault MC, Thibodeau J. 2013. Identification of a novel motif that affects the conformation and activity of the MARCH1 E3 ubiquitin ligase. *J Cell Sci* 126:989-998.
176. Cho KJ, Roche PA. 2013. Regulation of MHC Class II-Peptide Complex Expression by Ubiquitination. *Front Immunol* 4:369.
177. Berger AC, Roche PA. 2009. MHC class II transport at a glance. *J Cell Sci* 122:1-4.
178. Zuidschewoude M, de Winde CM, Cambi A, van Spruiel AB. 2013. Microdomains in the membrane landscape shape antigen-presenting cell function. *J Leukoc Biol* 95:251-263.

179. Miller MA, Ganesan AP, Eisenlohr LC. 2013. Toward a Network Model of MHC Class II-Restricted Antigen Processing. *Front Immunol* 4:464.
180. Cho KJ, Walseng E, Ishido S, Roche PA. 2015. Ubiquitination by March-I prevents MHC class II recycling and promotes MHC class II turnover in antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:10449-10454.
181. Gauvreau ME, Cote MH, Bourgeois-Daigneault MC, Rivard LD, Xiu F, Brunet A, Shaw A, Steimle V, Thibodeau J. 2009. Sorting of MHC class II molecules into exosomes through a ubiquitin-independent pathway. *Traffic* 10:1518-1527.
182. Mittal SK, Cho KJ, Ishido S, Roche PA. 2015. IL-10 mediated immunosuppression: March-I induction regulates antigen presentation by macrophages but not dendritic cells. *J Biol Chem* 290:27158-27167.
183. Thibodeau J, Bourgeois-Daigneault MC, Huppe G, Tremblay J, Aumont A, Houde M, Bartee E, Brunet A, Gauvreau ME, de Gassart A, Gatti E, Baril M, Cloutier M, Bontron S, Fruh K, Lamarre D, Steimle V. 2008. Interleukin-10-induced MARCH1 mediates intracellular sequestration of MHC class II in monocytes. *Eur J Immunol* 38:1225-1230.
184. Galbas T, Steimle V, Lapointe R, Ishido S, Thibodeau J. 2012. MARCH1 down-regulation in IL-10-activated B cells increases MHC class II expression. *Cytokine* 59:27-30.
185. Hunt D, Wilson JE, Weih KA, Ishido S, Harton JA, Roche PA, Drake JR. 2012. *Francisella tularensis* elicits IL-10 via a PGE(2)-inducible factor, to drive macrophage MARCH1 expression and class II down-regulation. *PLoS ONE* 7:e37330.
186. Zheng H, Punaro MC, Segura M, Lachance C, Rivest S, Xu J, Houde M, Gottschalk M. 2011. Toll-like receptor 2 is partially involved in the activation of murine astrocytes by *Streptococcus suis*, an important zoonotic agent of meningitis. *J Neuroimmunol* 234:71-83.
187. Liu M, Fang L, Tan C, Long T, Chen H, Xiao S. 2011. Understanding *Streptococcus suis* serotype 2 infection in pigs through a transcriptional approach. *BMC Genomics* 12:253.
188. Fittipaldi N, Sekizaki T, Takamatsu D, Harel J, Dominguez-Punaro Mde L, Von Aulock S, Draing C, Marois C, Kobisch M, Gottschalk M. 2008. D-alanylation of lipoteichoic acid contributes to the virulence of *Streptococcus suis*. *Infect Immun* 76:3587-3594.
189. Madan-Lala R, Sia JK, King R, Adekambi T, Monin L, Khader SA, Pulendran B, Rengarajan J. 2014. *Mycobacterium tuberculosis* impairs dendritic cell functions through the serine hydrolase Hip1. *J Immunol* 192:4263-4272.

190. Autenrieth SE, Linzer TR, Hiller C, Keller B, Warnke P, Koberle M, Bohn E, Biedermann T, Buhning HJ, Hammerling GJ, Rammensee HG, Autenrieth IB. 2010. Immune evasion by *Yersinia enterocolitica*: differential targeting of dendritic cell subpopulations in vivo. PLoS Pathog 6:e1001212.
191. Atif SM, Winter SE, Winter MG, McSorley SJ, Baumler AJ. 2014. *Salmonella enterica* serovar Typhi impairs CD4 T cell responses by reducing antigen availability. Infect Immun 82:2247-2254.
192. Bueno SM, Riquelme S, Riedel CA, Kalergis AM. 2012. Mechanisms used by virulent *Salmonella* to impair dendritic cell function and evade adaptive immunity. Immunology 137:28-36.
193. Billard E, Dornand J, Gross A. 2007. *Brucella suis* prevents human dendritic cell maturation and antigen presentation through regulation of tumor necrosis factor alpha secretion. Infect Immun 75:4980-4989.
194. Son YM, Ahn SM, Jang MS, Moon YS, Kim SH, Cho KK, Han SH, Yun CH. 2008. Immunomodulatory effect of resistin in human dendritic cells stimulated with lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*. Biochem Biophys Res Commun 376:599-604.
195. Butcher JP, Malcolm J, Benson RA, Deng DM, Brewer JM, Garside P, Culshaw S. 2011. Effects of *Streptococcus mutans* on dendritic cell activation and function. J Dent Res 90:1221-1227.
196. Matheoud D, Moradin N, Bellemare-Pelletier A, Shio MT, Hong WJ, Olivier M, Gagnon E, Desjardins M, Descoteaux A. 2013. *Leishmania* evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8. Cell Host Microbe 14:15-25.
197. Richardson ET, Shukla S, Sweet DR, Wearsch PA, Tschlis PN, Boom WH, Harding CV. 2015. Toll-Like Receptor 2-Dependent Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling in *Mycobacterium tuberculosis*-Infected Macrophages Drives Anti-Inflammatory Responses and Inhibits Th1 Polarization of Responding T Cells. Infect Immun 83:2242-2254.
198. De Gassart A, Camosseto V, Thibodeau J, Ceppi M, Catalan N, Pierre P, Gatti E. 2008. MHC class II stabilization at the surface of human dendritic cells is the result of maturation-dependent MARCH I down-regulation. Proc Natl Acad Sci U S A 105:3491-3496.
199. Bosch B, Heipertz EL, Drake JR, Roche PA. 2013. Major histocompatibility complex (MHC) class II-peptide complexes arrive at the plasma membrane in cholesterol-rich microclusters. J Biol Chem 288:13236-13242.

200. Karacsonyi C, Bedke T, Hinrichsen N, Schwitzer R, Lindner R. 2005. MHC II molecules and invariant chain reside in membranes distinct from conventional lipid rafts. *J Leukoc Biol* 78:1097-1105.
201. Bouillon M, El Fakhry Y, Girouard J, Khalil H, Thibodeau J, Mourad W. 2003. Lipid raft-dependent and -independent signaling through HLA-DR molecules. *J Biol Chem* 278:7099-7107.
202. Taylor SC, Posch A. 2014. The design of a quantitative western blot experiment. *Biomed Res Int* 2014:361590.
203. McDonough AA, Veiras LC, Minas JN, Ralph DL. 2015. Considerations when quantitating protein abundance by immunoblot. *Am J Physiol Cell Physiol* 308:C426-433.
204. Miyadera H, Ohashi J, Lernmark A, Kitamura T, Tokunaga K. 2015. Cell-surface MHC density profiling reveals instability of autoimmunity-associated HLA. *J Clin Invest* 125:275-291.
205. Villadangos JA, Cardoso M, Steptoe RJ, van Berkel D, Pooley J, Carbone FR, Shortman K. 2001. MHC class II expression is regulated in dendritic cells independently of invariant chain degradation. *Immunity* 14:739-749.
206. Kleijmeer M, Ramm G, Schuurhuis D, Griffith J, Rescigno M, Ricciardi-Castagnoli P, Rudensky AY, Ossendorp F, Melief CJ, Stoorvogel W, Geuze HJ. 2001. Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II antigen presentation by dendritic cells. *J Cell Biol* 155:53-63.
207. Kessler T, Reich M, Jahn G, Tolosa E, Beck A, Kalbacher H, Overkleeft H, Schempp S, Driessen C. 2008. Human cytomegalovirus infection interferes with major histocompatibility complex type II maturation and endocytic proteases in dendritic cells at multiple levels. *J Gen Virol* 89:2427-2436.
208. Geneve L, Menard C, Labrecque N, Thibodeau J. 2012. The p35 human invariant chain in transgenic mice restores mature B cells in the absence of endogenous CD74. *Int Immunol* 24:645-660.
209. del Campo Sepulveda EM, Altman E, Kobisch M, D'Allaire S, Gottschalk M. 1996. Detection of antibodies against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a purified capsular polysaccharide antigen-based indirect ELISA. *Vet Microbiol* 52:113-125.

VII. ANNEXES

ANNEXE I

Group B *Streptococcus* Induces a Robust IFN- γ Response by CD4⁺ T Cells in an *In Vitro* and *In Vivo* Model

Damian Clarke,^{1,*} Corinne Letendre,^{1,*} Marie-Pier Lecours,¹ Paul Lemire,¹ Tristan Galbas,² Jacques Thibodeau,² and Mariela Segura^{1#}

¹*Laboratory of Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada J2S 2M2*

²*Laboratory of Molecular Immunology, Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, University of Montreal, Montreal, QC Canada H3C 3J7*

* These authors contributed equally to this work.

Corresponding author

Publié chez : *Journal of Immunology Research*, vol. 2016, Article ID 5290604, 12 pages.

Doi :10.1155/2016/5290604

Rôle de la candidate dans la conception de l'article :

Je suis co-premier auteur de cet article. J'ai participé activement à la conception et au design des expériences sur les T CD4⁺ mémoires. J'ai effectué les manipulations, analysé les résultats et conçu les graphiques. J'ai aussi contribué de façon importante à la rédaction du manuscrit.

ABSTRACT

Group B *Streptococcus* (GBS) serotype III causes life-threatening infections. Cytokines have emerged as important players for the control of disease, particularly IFN- γ . Although potential sources of this cytokine have been proposed, no specific cell line has ever been described as a leading contributor. In this study, CD4⁺ T cell activation profiles in response to GBS were evaluated through *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro* approaches. Total splenocytes readily produce a type 1 proinflammatory response by releasing IFN- γ , TNF- α and IL-6 and actively recruit T cells via chemokines like CXCL9, CXCL10, and CCL3. Responding CD4⁺ T cells differentiate into Th1 cells producing large amounts of IFN- γ , TNF- α as well as IL-2. *In vitro* studies using dendritic cell and CD4⁺ T cell cocultures infected with wild-type GBS or a nonencapsulated mutant suggested that GBS capsular polysaccharide, one of the major bacterial virulence factors, differentially modulates surface expression of CD69 and IFN- γ production. Overall, CD4⁺ T cells are important producers of IFN- γ and might thus influence the course of GBS infection through the expression balance of this cytokine.

1. Introduction

Group B *Streptococcus* (GBS) or *Streptococcus agalactiae* is the main cause of life-threatening infections in newborns worldwide [1, 2]. GBS also affects pregnant women, elders and immunocompromised patients [3]. Type III GBS is frequently involved in neonatal infections and is the most common type in GBS meningitis [1, 2].

Cytokines are important for controlling GBS disease, although exaggerated responses might be dangerous [4, 5]. While IL-10, IL-12, and IL-18 are beneficial [6-9], TNF- α contributes to GBS-induced sepsis [7, 10]. IFN- γ appears promising for control of GBS disease; IL-12 and IL-18 exert therapeutic effects by stimulating immune cells to produce IFN- γ [6, 8, 9], IFN- γ production is impaired in neonates and this might partly explain their susceptibility to GBS infection [8, 11, 12], and IFN- γ inhibits GBS survival in human endothelial cells [13]. Although NK and NKT cells have been proposed to secrete IFN- γ in response to GBS [14, 15], no specific cell line has been clearly identified yet as a major source.

Activated CD4⁺ T cells can differentiate into T helper (Th) cell types depending on the signals they receive. Th1 cells readily produce IFN- γ upon activation. GBS-infected dendritic cells (DCs) produce large amounts of proinflammatory cytokines like TNF- α , IL-6, and IL-12 [16] that could activate T cells. Furthermore, GBS-activated DCs release chemokines recruiting T cells, like CXCL9 and CXCL10 [16]. Although these evidences support IFN- γ production by T cells [17, 18], the participation of CD4⁺ T cells during GBS-induced disease is unknown.

GBS possesses a thick sialylated polysaccharide capsule (CPS) [19]. It is known as the most important factor for GBS survival within the host and interferes with innate defense mechanisms [4, 20, 21]. Encapsulated GBS is highly internalized by DCs but survives better intracellularly than its nonencapsulated counterpart. Bacterial internalization and the presence of CPS are also related to modulation of several cytokines and chemokines released by GBS-infected DCs [16, 22, 23].

It is hypothesized here that GBS drives CD4⁺ T cells differentiation into IFN- γ -producing Th1 cells and that the CPS can modify this response. The role of CD4⁺ T cells in the immune response against GBS type III was investigated using *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro* approaches in a mouse model. A nonencapsulated GBS mutant was included to dissect the role of this virulence factor in T cell activation.

2. Materials and Methods

2.1. *Bacterial Strains.* COH-1, a highly encapsulated type III GBS isolate extensively described in [16, 22, 24], and its isogenic nonencapsulated ($\Delta cpsE$) mutant [16, 22] were used. GBS strains were cultivated as described previously [22].

2.2. *Antibodies.* Anti-mouse antibodies (BioLegend unless otherwise noted) used for FACS analysis were as follows: FITC-conjugated anti-CD3 (17A2) and anti-CD4 (GK1.5; BD Pharmingen); PE-conjugated anti-CD4 (GK1.5), anti-CD19 (6D5), anti-CD69 (H1.2F3; BD Pharmingen), anti-IFN- γ (XMG1.2; eBioscience), anti-TNF- α (MP6-XT22; eBioscience), and anti-IL-2 (JES6-5H4; eBioscience); PE-Cy7-conjugated anti-NK-1.1 (PK136) and anti-CD44 (IM7; BD Pharmingen); APC-conjugated anti-IFN- γ (XMG1.2), anti-TNF- α (MP6-XT22) and anti-IL-7R α (A7R34), and BV421-conjugated anti-CD62L (MEL-14).

2.3. *Mice and Experimental Infections.* Five-week-old female C57BL/6 mice (Charles River Laboratories) were used for all experiments. The University of Montreal Animal Welfare Committee guidelines and policies were followed. On the day of the experiment, 0.5 mL of the bacterial suspension (10^6 , 10^7 , or 10^8 CFU) or sterile vehicle solution was administrated intraperitoneally (i.p.). Mortality and clinical signs were monitored [25]. Blood samples (5 μ l) were collected at different times after infection. Bacteremia (number of CFU/mL) was determined by plating samples onto blood agar using an Automated Spiral Plater (Spiral Biotech).

2.4. *Generation of Bone Marrow-Derived DCs and Isolation of Splenic CD4⁺ T cells.* DCs were generated as described previously from naive mice [16]. Cell purity was 86-90% CD11c^{high} and F4/80^{-dim} cells by FACS analysis as reported previously [16]. For purification of untouched CD4⁺ T cells, spleens (from either naive or infected mice) were harvested, perfused with RPMI complete medium (Gibco), and pressed gently through a sterile fine wire mesh. After red blood cells lysis (eBioscience), total splenocytes were suspended in 2 mM EDTA-PBS solution and separated using Lympholyte-M density gradient (Cedarlane Lab.). Low-density cells at the interphase were purified by magnetic-activated cell sorting (MACS)

negative selection (Miltenyi Biotec). The enriched CD4⁺ T cells had > 96% purity by FACS analysis using CD3 and CD4 antibodies (data not shown). For all experiments, cells were incubated at 37°C, 5% CO₂.

2.5. In Vivo Infection Model. For survival curves and selection of the infectious dose, mice (n = 16) were injected i.p. with 10⁶, 10⁷, or 10⁸ CFU (strain COH-1) and clinical signs were monitored. Based on the obtained data (Figure 1(a)), mice were injected i.p. with 10⁶ CFU. Surviving animals who displayed clinical signs were boosted with 10⁶ CFU 2 weeks after initial infection. Bacteremia was monitored during 72 h after primary infection or at 24 h after boost. Spleens of animals with clinical signs and positive bacteremia were harvested 96 h after primary infection or 48 h after boost (n = 2 per group x 5 individual experiments). Five hours before spleen collection, mice were injected i.p. with 200 µg of Brefeldin A (eBioscience), a protein transport inhibitor. Control (mock-infected) animals were similarly treated. Brefeldin A was kept throughout the purification steps. The selected time points are based on pretrials analysis (data not shown). Purified CD4⁺ T cells were analyzed for cytokine production by intracellular flow cytometry (IC-FACS). Total splenocytes were analyzed for memory surface markers by multiparametric FACS. Cells were gated on CD3⁺CD4⁺ double-positive cells, followed by gating CD44^{high}CD62L⁻ (effector [memory] T cells) and CD44^{high}CD62L⁺ (central memory T cells). Analysis with a fifth surface marker, IL-7Rα was used to further identify memory cells (CD44^{high}IL-7Rα⁺) within these two subsets [26, 27].

2.6. Ex vivo Analysis of Total Splenocytes. Mice were injected i.p with 10⁷ CFU (strain COH-1) (n = 3 per group x 3 individual experiments). Spleens were harvested 6 h after infection. Total splenocytes (5 x 10⁶ cells/mL) were plated in complete medium without antibiotics and incubated for 48 and 72 h. After an initial 4 h incubation, the bacteriostatic agent chloramphenicol (12 µg/mL, Sigma-Aldrich) was added to control the bacterial load as reported previously [16]. Total splenocytes from control (mock-infected) animals were similarly treated. Concanavalin A (ConA, 0.1 µg/mL, Sigma-Aldrich) served as positive control. Supernatants were harvested at different time points for cytokine analysis. In selected experiments, Brefeldin A (3 µg/mL) was added for the last 5 h of incubation, and total splenocytes or CD4⁺ T cells (MACS-isolated from the culture wells) were analyzed by

IC-FACS after a total 48 h incubation. The culture conditions were selected based on pretrials (data not shown).

2.7. In Vitro DC-T Cell Coculture Model. DCs were plated in 48-well flat-bottom plates (10^5 cells/well; 1 h) prior to a 1 h infection with COH-1 or $\Delta cpsE$ strains (MOI:1). After a 1 h treatment with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ penicillin G (Sigma-Aldrich) to kill extracellular bacteria as described previously [16], DCs were washed. Freshly isolated CD4^+ T cells from naive mice were added (5:1 T cell/DC ratio; 8 and 24 h). Cocultures incubated with medium alone or ConA (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) served as negative and positive controls, respectively. Cells were harvested for FACS analysis of surface marker expression. For T cell cytokine expression, after a 48 h-incubation, plates were centrifuged and replenished with fresh medium containing 10 ng/mL of mouse rIL-2 (Miltenyi Biotec). After a 3-day resting period, T cells were harvested, washed, and seeded into 96-well flat-bottom culture plates coated with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of anti-mouse-CD3 mAb (BD PharMingen) (10^5 cells/well; 48 h). Supernatants were harvested for ELISA testing. Single cell cultures (DCs or T cells alone) served as controls.

2.8. Cytokine and Chemokine Quantification by ELISA. Levels of IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α , CCL3, CXCL9, and CXCL10 in cell culture supernatants were measured by sandwich ELISA using pair-matched antibodies (R&D Systems or eBioscience). Sample dilutions giving OD readings in the linear portion of a standard curve were used to quantify the levels of each cytokine. The results include at least three independent ELISA measurements.

2.9. FACS Analysis. For multiparametric IC-FACS, total splenocytes were treated with FcR-blocking reagent (Fc γ III/II R α Ab; BD Pharmingen) for 15 min on ice. Cells were stained for CD19, NK-1.1, CD3, and/or CD69 (30 min on ice), fixed, and permeabilized (eBioscience). After intracellular staining for IFN- γ or TNF- α (45 min, room temperature), FACS was performed using a FACSCanto II instrument (BD Biosciences). Fluorescence Minus One (FMO) control staining was performed for proper analysis and gating of target cells. For IC-FACS of MACS-purified CD4^+ T cells from *in vivo* or *ex vivo* experiments, cells were stained intracellularly for IFN- γ , TNF- α and IL-2 as described above and analyzed with a FACSCalibur instrument (BD Biosciences). For analysis of the memory response by multiparametric FACS, total splenocytes were blocked and surface-stained for CD3, CD4,

CD44, CD62L, and IL-7R α (45 min on ice). FACS was performed using a FACSCanto II instrument. Cells from *in vitro* cocultures were surface-stained for CD4 and CD69 (30 min on ice). FACS was performed using a Cell Lab QuantaTM SC MPL MultiPlate Loader instrument (Beckman Coulter).

2.10. Statistical Analysis. Survival curves of infected mice were generated using Kaplan-Meier plots and Log-rank (Mantel-Cox) tests allowed comparison between groups. Bacteremia levels were compared using the Mann-Whitney test. Cytokine data (expressed as mean \pm SEM) and FACS data were analyzed for significance using Student's unpaired t-test. All analyses were performed using the Sigma Plot System (Systat Software). A $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

3. Results

3.1. Survival of GBS-infected Mice is Dose-dependent. After 18 h, infection with 10^7 or 10^8 CFU of COH-1 strain resulted in 75% and 69% mortality ($P > 0.05$), respectively (Figure 1(a)). Mortality continued to increase until 24 h after infection to 82% and 94% ($P > 0.05$), respectively, and was maintained until 60 h after infection when the experiment was terminated. Mice infected with 10^6 CFU were significantly less prone to mortality than mice from the other groups. At 18 h after infection, only a 6% mortality rate was observed, which was significantly lower than in the other groups ($P < 0.05$). Mortality continued to increase at 24 and 36 h after infection yet remained significantly lower than in mice infected with higher doses ($P < 0.05$). Indeed, mice infected with 10^7 or 10^8 CFU manifested intense clinical signs as early as 8 h after infection, while 10^6 CFU usually induced less severe signs starting 12 h after infection.

Bacteremia induced by COH-1 infection was consistent with survival curves (Figure 1(b)). Mice infected with 10^7 or 10^8 CFU showed high bacteremia at 18 h after infection and reached an average of 2.6×10^8 and 1.3×10^9 CFU/mL, respectively. In contrast, mice infected with 10^6 CFU showed significantly lower bacteremia and reached an average of 5.7×10^5 CFU/mL. High mortality rates impeded follow-up of bacteremia in mice infected with high doses. However, in mice infected with 10^6 CFU, bacteremia slowly decreased, reaching an average of 7.2×10^4 CFU/mL at 72 h after infection.

3.2. Splenocytes Produce Type-1 Proinflammatory Cytokines in Response to Encapsulated GBS Infection. Before investigating T cell activation, the splenic immunological environment was characterized. Total splenocytes from mice infected with COH-1 strain were incubated *ex vivo* for 48 and 72 h (Figure 2). High amounts of IFN- γ , TNF- α and IL-6 were detected ($P < 0.05$), suggesting a type-1 proinflammatory response. IL-10 was also upregulated in infected spleens, suggesting an homeostatic role. Important chemokines for T cell recruitment were also detected: CXCL9, CXCL10, and CCL3 ($P < 0.05$). It is worth noting that CXCL9 and CXCL10 are mainly released in response to IFN- γ activation [28], thus in agreement with the observed high levels of IFN- γ produced by GBS-infected splenocytes. No significant

differences were observed between 48 and 72 h cultures, except for CXCL9 which maximal production was delayed to 72 h of incubation.

3.3. Activated CD4⁺ T Cells Contribute to IFN- γ Production During Encapsulated GBS Infection. With current understanding of the splenic environment, the contribution of activated T cells to cytokine production was investigated. A multiparametric IC-FACS analysis of IFN- γ production from *ex vivo* total splenocytes cultures was performed. CD3⁺ T cells markedly contributed to the IFN- γ response in the spleen of infected mice (Figure 3(a); $P < 0.05$). NKT cells (NK1.1⁺CD3⁺) produced very low levels of IFN- γ (data not shown). NK cells (NK1.1⁺) were major contributors to IFN- γ production within the CD3⁻ population (data not shown). As expected, B cells (CD19⁺) did not produce significant levels of this cytokine (data not shown). Activated CD3⁺ T cells also contributed to approximately half the production of TNF- α by splenic cells (Figure 3(c); $P < 0.05$). Compared to control mice, splenocytes from infected animals showed a significant increase in surface expression of the early activation marker CD69. High expression of CD69 was also observed within the CD3⁺ population (Figure 3(b); $P < 0.05$).

CD4⁺ T cells were isolated from *ex vivo* total splenocyte cultures and analyzed by IC-FACS to specifically evaluate their role (Figure 4). Activated CD4⁺ T cells contributed to the production of IFN- γ and TNF- α . Low levels of intracellular IL-2 were also observed (Figure 4). *In vivo* experiments confirmed these results; CD4⁺ T cells directly isolated from the spleen of infected mice 96 h after primary infection showed that they contribute to the production of IFN- γ and TNF- α . Intracellular levels of IL-2 were hardly detected during a primary infection (Figure 5, black histograms). CD4⁺ T cells isolated 48 h after boost displayed an enhanced contribution to IFN- γ , TNF- α and IL-2 production (Figure 5, dark grey histograms). This is consistent with the generation of memory CD4⁺ T cells (CD44^{high}IL-7R α ⁺) observed at that time with the increase in IL-7R α ⁺ cells in the central memory subset (CD44^{high}CD62L⁺) (Figures 6(a-b), red population and histograms). The decrease in IL-7R α ⁺ cells in the effector (memory) subset (CD44^{high}CD62L⁻) likely reflects cellular migration from the spleen to peripheral tissues (Figures 6(a-b), blue population and histograms).

3.4. *The CPS of GBS Modulates Cytokine Release by CD4⁺ T Cells.* As GBS is a well-encapsulated bacterium, the impact of CPS on CD4⁺ T cell activation was evaluated by comparing COH-1 with its nonencapsulated mutant, $\Delta cpsE$, in an *in vitro* DC-T cell coculture system. Since nonencapsulated GBS mutants are rapidly cleared from circulation [20], *in vivo* comparison was impossible. Coculture supernatants were tested by ELISA for CD4⁺ T cell-derived cytokines. No significant cytokine production was observed in single cell cultures (DCs or T cells alone) that served as controls (data not shown). COH-1-activated cocultures showed extremely high levels of IFN- γ (~ 45000 pg/mL) and significant levels of TNF- α (~ 1500 pg/mL). $\Delta cpsE$ -activated cocultures showed a significant reduction in IFN- γ production (Figure 7; $P = 0.012$), along with reduced TNF- α production, although this difference was not statistically significant ($P = 0.053$). Overall, these results suggest that nonencapsulated GBS-pulsed DCs induce reduced cytokine production by CD4⁺ T cells compared to encapsulated GBS-pulsed DCs.

3.5. *The CPS of GBS Affects Surface Expression of CD69 on Activated CD4⁺ T Cells.* In addition to cytokine production, expression of surface molecules is essential for proper T cell activation. The effect of CPS on CD69 expression on activated CD4⁺ T cells was investigated. In COH-1-activated cocultures, CD69 expression on CD4⁺ T cells was significantly lower than in $\Delta cpsE$ -activated cocultures after an 8 h incubation (Figure 8; $P < 0.01$). CD69 expression remained lower in COH-1-activated cocultures at 24 h ($P < 0.05$), although the difference and levels of expression were less pronounced. After 48 h, no significant differences in CD69 expression were observed between strains (data not shown).

4. Discussion

Although interactions between GBS and innate immune cells are increasingly documented, activation profiles of adaptive immune cells have never been investigated. This is the first study evaluating CD4⁺ T cells contribution to GBS immune response using *in vivo*, *ex vivo*, and *in vitro* analysis.

While cytokines contribute to host defense development, they can also exacerbate GBS-induced pathologies. Initial *ex vivo* analysis of cytokine production by total splenocytes from encapsulated GBS-infected mice revealed the presence of IFN- γ , TNF- α , IL-6, and IL-10. Production of IFN- γ , TNF- α , and IL-6 suggests a type-1 proinflammatory response being developed shortly after infection, while IL-10 production can be related to immune regulation. Interestingly, TNF- α and IL-6 have routinely been reported as mediators of GBS sepsis [7, 10]. This result might also highlight the homeostatic role of IL-10. Indeed, IL-10 was shown to reduce TNF- α and thus protect neonatal mice from developing GBS sepsis [7].

DCs, monocytes, and macrophages are known to secrete TNF- α , IL-6, and/or IL-10 when responding to GBS [16, 17, 29-31]. However, sources of IFN- γ remain poorly identified. Early works reporting IFN- γ production used GBS-infected total splenocytes or mixed mononuclear cells, without identifying the cellular source [8-10, 17]. The present study defined the role of T cells in IFN- γ production. *Ex vivo* and *in vivo* analysis showed that CD4⁺ T cells are important producers of IFN- γ and TNF- α during GBS infection. Activated CD4⁺ T cells also produce low, but still significant levels of IL-2, suggesting the development of a Th1 response. CD4⁺ T cells produce the same pattern of cytokines more efficiently after a boost infection, likely thanks to the memory response [32]. An important contribution of NK cells to the IFN- γ response was also evidenced *in vivo*, in accordance with previous *in vitro* studies with splenocytes from severe combined immunodeficiency mice [15]. IFN- γ production by NKT cells was very limited during GBS infection, even at earlier time points (unpublished observations), although purified GBS glycolipids have been shown to activate NKT cells [14].

Early chemokine release by innate immune cells attracts T cells to the site of infection. *Ex vivo* analysis of chemokine production by total splenocytes suggested that T cells are actively recruited via CCL3, CXCL9 and CXCL10. Interestingly, CXCL9 and CXCL10 are two CXCR3 ligands, both induced by IFN- γ . CXCR3 is rapidly up-regulated on naive T cells following activation and remains preferentially highly expressed on Th1 cells [28]. Different splenic cell types, like DCs, might produce these chemokines in response to GBS [16]. Although up-regulation of *Cxcl10* gene expression was observed in mouse peritoneal macrophages [31], GBS was unable to induce either CXCL10 or CXCL9 secretion by these cells [33]. Nevertheless, both macrophages and DCs seem to contribute to CCL3 production [31, 33, 34].

As GBS possesses a thick CPS, its most important virulence factor, the potential of CPS to modulate CD4⁺ T cell activation was investigated. Similarly to *ex vivo* and *in vivo* results, DCs pulsed *in vitro* with encapsulated GBS induced the release of high levels of IFN- γ and TNF- α by CD4⁺ T cells. The production of IFN- γ was significantly decreased with nonencapsulated GBS. Production of TNF- α was also reduced. It is surprising that the loss of capsule does not trigger an exaggerated response or increased IFN- γ production by T cells, as reported for other encapsulated pathogens [35-37]. However, studies on GBS-activated DCs have shown similar trends; encapsulated GBS induced similar or stronger cytokine production by infected DCs than nonencapsulated GBS-infected counterparts [16, 34]. The only exception was IL-10, which production was significantly higher in DCs infected with the nonencapsulated mutant [16]. Two interrelated hypothesis were suggested to explain these observations, a) increased IL-10 production by DCs reduces the production of other cytokines; or b) more efficient killing of the nonencapsulated mutant reduces cytokine production by DCs [16, 22]. Moreover, it was reported that the presence of CPS modulates the endocytic pathways used by DCs for GBS up-take [22]. Since the route of entry influences the repertoires of epitopes presented to CD4⁺ T cells, the ensuing immune response might be affected [38]. Thus, in our DC-T cell coculture system, DC modulation by the nonencapsulated strain may lead to lower levels of IFN- γ production by CD4⁺ T cells.

In contrast to cytokine production, the surface expression of CD69 was higher (early time points) or similar (late time points) in CD4⁺ T cells cocultured with nonencapsulated mutant-pulsed DCs compared to encapsulated GBS-infected cocultures. However, this could just be related to different kinetics of CD69 expression. In fact, attempting to explain modulation of CD69 expression on CD4⁺ T cells is quite difficult, due to limited information on this marker. Indeed, characterization of its ligand has just started [39]. CD69 is known to be one of the earliest markers induced upon activation of T cells and acts as a signal-transmitting receptor for immunoregulatory events [40]. Of the few studies available on CD69 expression by T cells upon streptococcal infection, Harimaya *et al.* demonstrated a dose-dependent up-regulation of CD69 on CD3⁺ T cells from peripheral blood lymphocytes infected with *Streptococcus pneumoniae*. Yet, authors failed to correlate CD69 expression and IFN- γ production by these target cells [41]. More recently, in a *S. pneumoniae* mouse model of infection, CD4⁺ T cells exhibited significant up-regulation of CD69 in the spleen. As this response was MHC-II unrestricted, authors suggested that this increased CD69 expression on T cells might be due to secondary factors like cytokine release by other cells [42]. Likely, a polyclonal (indirect) activation of T cells in our system cannot be ruled out, although GBS failed to directly activate T cells without antigen-presenting cells (data not shown), similarly to that reported for *S. pneumoniae* [37, 42]. Finally, it has been suggested that CD69 plays an immunoregulatory role by preventing infection-induced immunopathology [43]. Enhanced expression of CD69 may result in reduced IFN- γ production by CD4⁺ T cells [44].

5. Conclusion

Undoubtedly, IFN- γ production by CD4⁺ T cells during GBS infection is crucial for host defense [8] but might also result in disease pathology, as suggested in the mouse model of pneumococcal sepsis [42]. Although this study characterized for the first time IFN- γ production by CD4⁺ T cells, a definitive understanding of all mechanisms regulating IFN- γ production during GBS infection requires further research. For instance, as the CPS confers a survival advantage to GBS [16, 22], persistence of GBS within antigen-presenting cells may affect their activation and thus the ensuing T cell immune response, including altered IFN- γ and CD69 expression balance early during infection.

Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflict of interests in the research.

Acknowledgments

This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada [NSERC #342150-2013 to Mariela Segura] and by Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and Canada Foundation for Innovation (CFI) through grants to Jacques Thibodeau [CIHR #93592]. Corinne Letendre is the recipient of a M.S. Award granted by NSERC. Marie-Pier Lecours and Paul Lemire are the recipients of Ph.D. Awards granted by NSERC and by the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies, respectively.

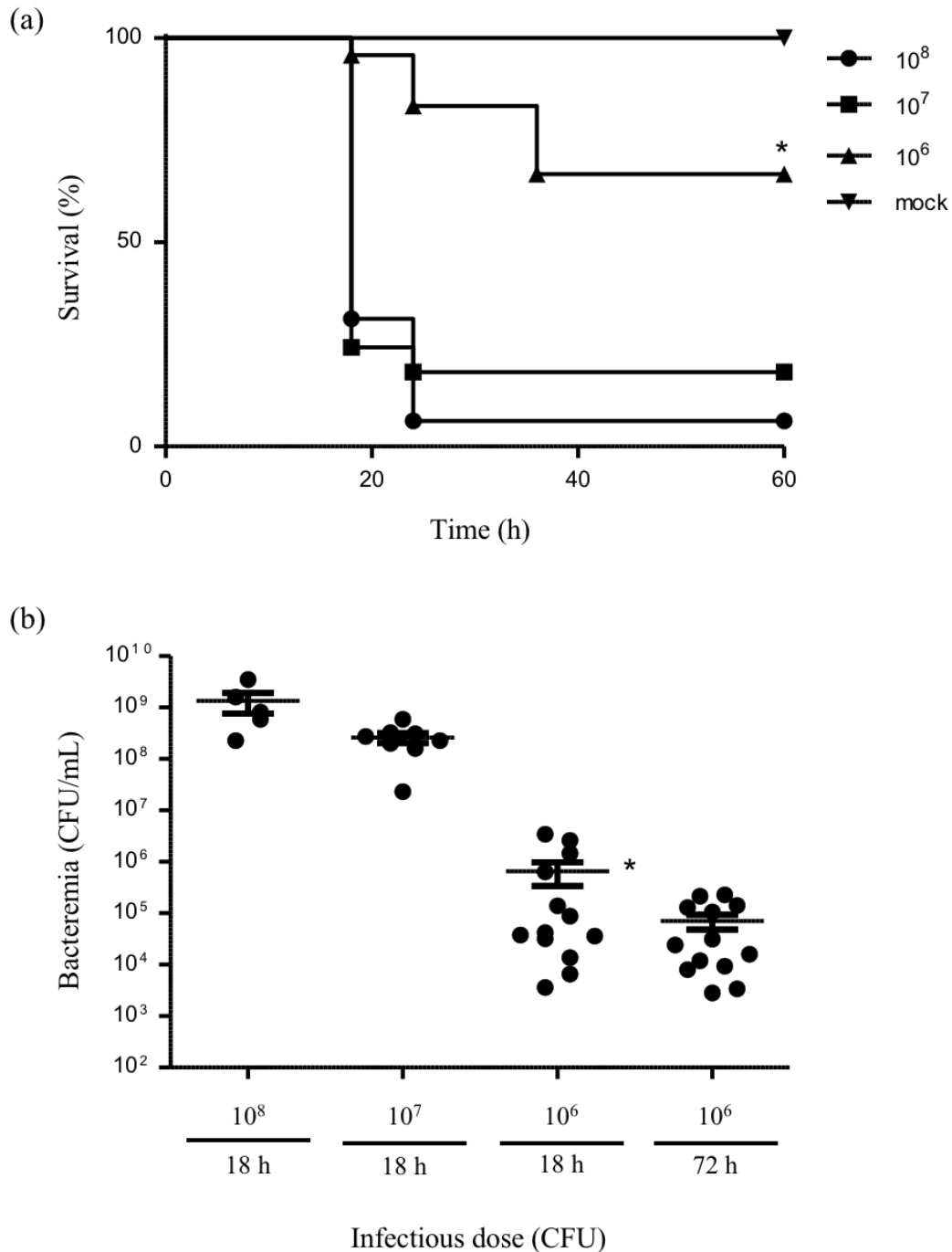


FIGURE 1. Survival curves and bacteremia levels of GBS-infected C57BL/6 mice. (a) Mice (n = 16) were injected intraperitoneally with different doses of wild-type GBS serotype III strain COH-1 and survival levels recorded. Mock-infected animals (injected with the vehicle solution) were used as controls. (b) Systemic bacteremia levels of infected mice was monitored at 18 h after infection (for mice infected with 10⁶, 10⁷, and 10⁸ CFU) and at 72 h after infection (for mice infected with 10⁶ CFU). Blood was drawn by tail puncture and serially diluted in PBS prior to plating on blood agar dishes. Individual colonies were counted and data expressed as CFU/mL of blood. * *P* < 0.05, compared to higher infectious doses.

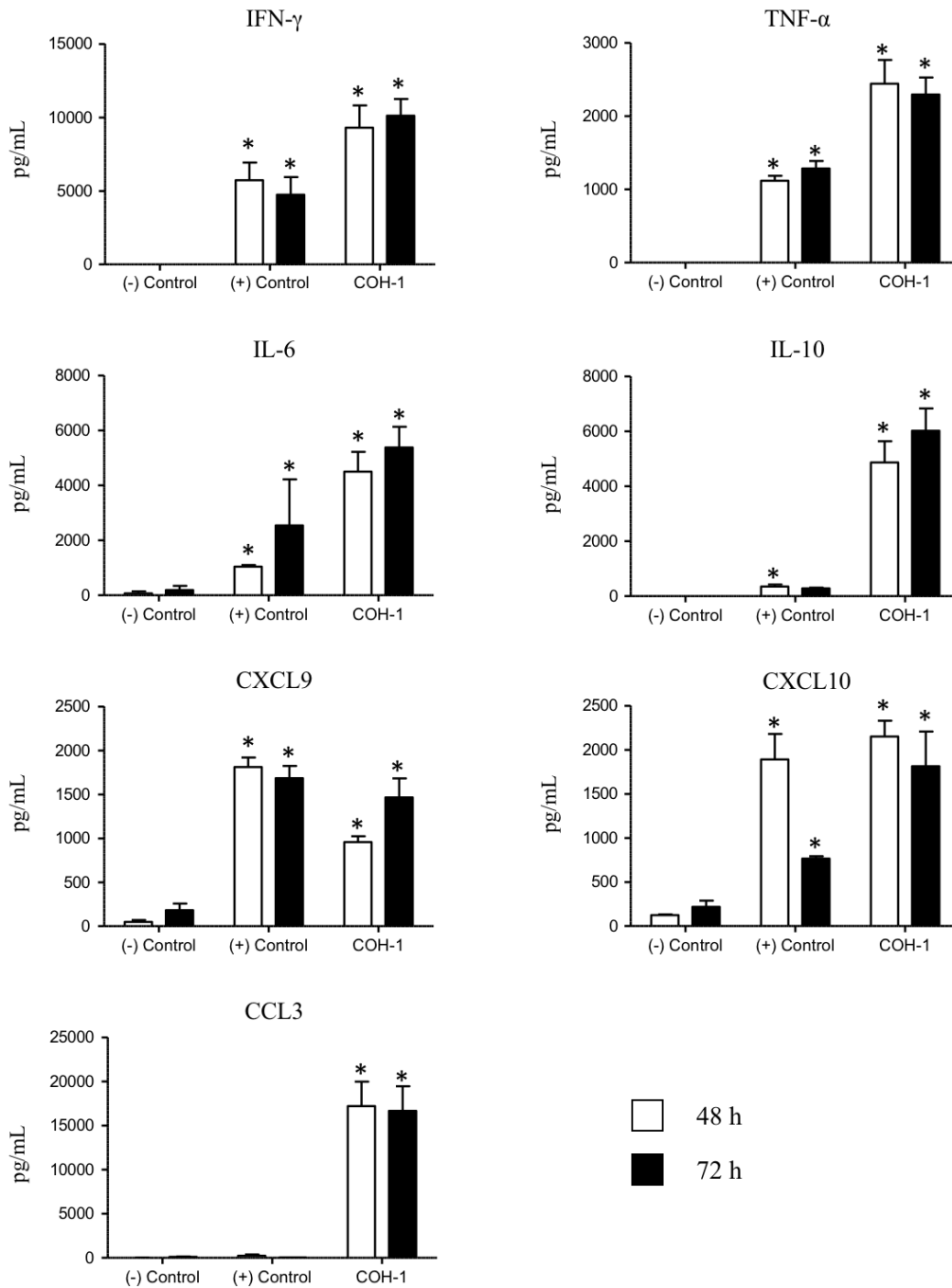


FIGURE 2. Ex vivo cytokine and chemokine production profile by total splenocytes. C57BL/6 mice were injected intraperitoneally with a dose of 10^7 CFU of wild-type GBS serotype III strain COH-1 ($n = 3$ per group \times 3 individual experimental infections). Spleens were harvested 6 h after infection and total splenocytes plated at 5×10^6 cells/well. After 4 h of incubation, the bacteriostatic agent chloramphenicol ($12 \mu\text{g}/\text{mL}$) was added to the culture to prevent cell toxicity. Cells were then incubated for 48 h and 72 h and supernatants were collected for cytokine analysis by ELISA. Nonstimulated cells from mock-infected animals served as negative (-) control for basal expression. Cells stimulated with Concanavalin A ($0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$) were used as positive (+) control. Data are expressed as means \pm SEM (in pg/mL) from 3 different experimental infections. * $P < 0.05$, indicates statistically significant difference compared to (-) control cells.

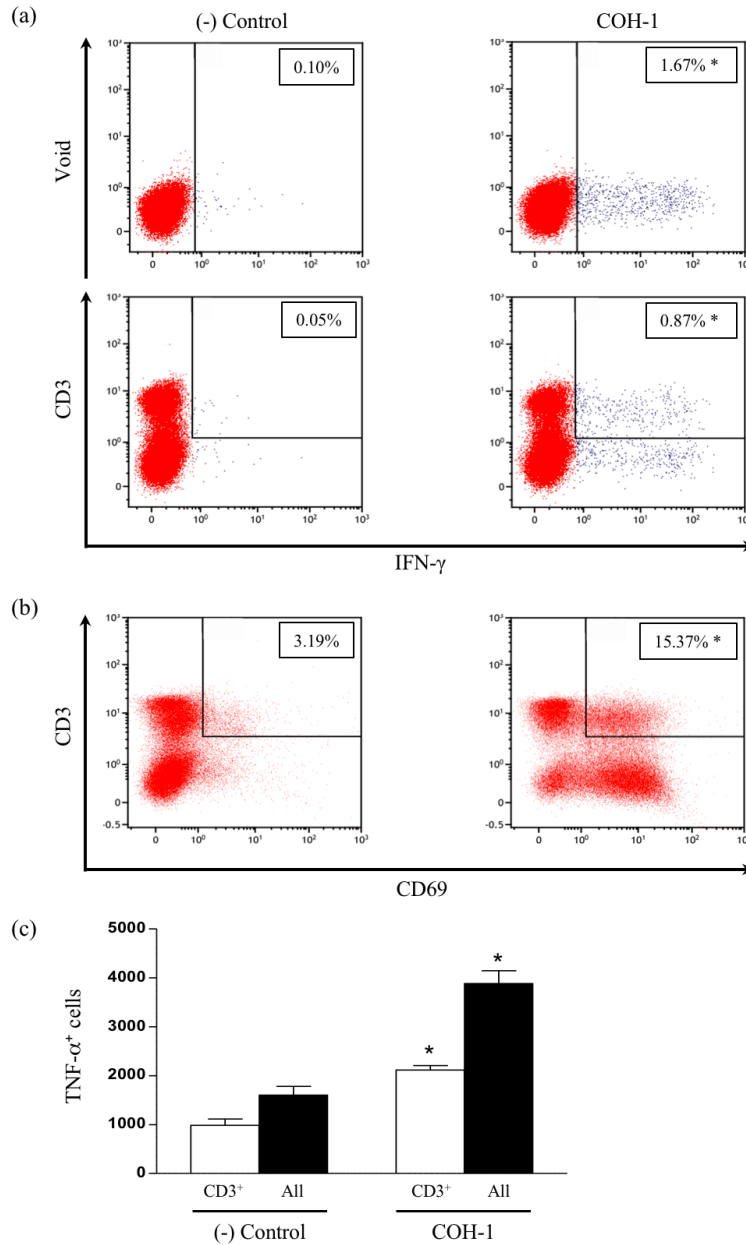


FIGURE 3. Ex vivo analyses of cellular sources of IFN- γ during GBS infection. C57BL/6 mice were injected intraperitoneally with a dose of 10^7 CFU of wild-type GBS serotype III strain COH-1 ($n = 3$ per group \times 3 individual experimental infections). Spleens were harvested 6 h after infection and total splenocytes plated at 5×10^6 cells/well. After 4 h of incubation, the bacteriostatic agent chloramphenicol (12 μ g/mL) was added to the culture to prevent cell toxicity. Nonstimulated cells from mock-infected animals served as negative (-) control for basal expression. Total splenocytes were incubated for 48 h with brefeldin A (3 μ g/mL) added during the last 5 h of incubation. Cells were harvested and intracellularly stained for IFN- γ (a) or surface-stained for CD69 (b) in combination with several surface markers for multiparametric FACS analysis. Representative data from 3 different experimental infections based on CD3 $^+$ population or total splenic population (Void). (c) Number of TNF- α^+ cells within the CD3 $^+$ population or total splenic population (All). Data are expressed as means \pm SEM from 3 different experimental infections; * $P < 0.05$, indicates statistically significant difference compared to (-) control cells. Fifty thousand gated events were acquired per sample and data analysis was performed using FACSDivaTM software.

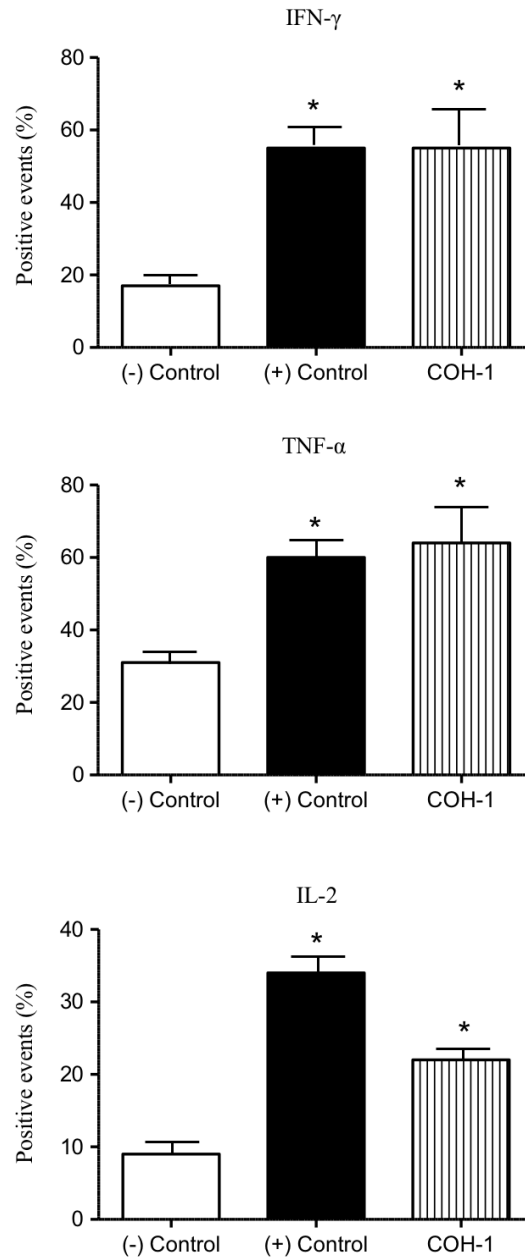


FIGURE 4. *Ex vivo* analyses of CD4⁺ T cell contribution to cytokine production. C57BL/6 mice were injected intraperitoneally with a dose of 10^7 CFU of wild-type GBS serotype III strain COH-1 (n = 3 per group x 3 individual experimental infections). Spleens were harvested 6 h after infection and total splenocytes plated at 5×10^6 cells/well. After 4 h of incubation, the bacteriostatic agent chloramphenicol (12 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added to the culture to prevent cell toxicity. Nonstimulated cells from mock-infected animals served as negative (-) control for basal expression. Cells stimulated with Concanavalin A (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were used as positive (+) control. Total splenocytes were incubated for 48 h. Brefeldin A (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added during the last 5 h of incubation and CD4⁺ T cells were MACS-isolated from the culture, stained intracellularly for different cytokines and analyzed by FACS. Data are expressed as means \pm SEM (in % of positive cells) from 3 individual experimental infections. * $P < 0.05$, indicates statistically significant difference compared to (-) control cells. Twenty thousand gated events were acquired per sample and data analysis was performed using CellQuest software. Histograms were drawn based on PE-control stain and were plotted on logarithmic scales.

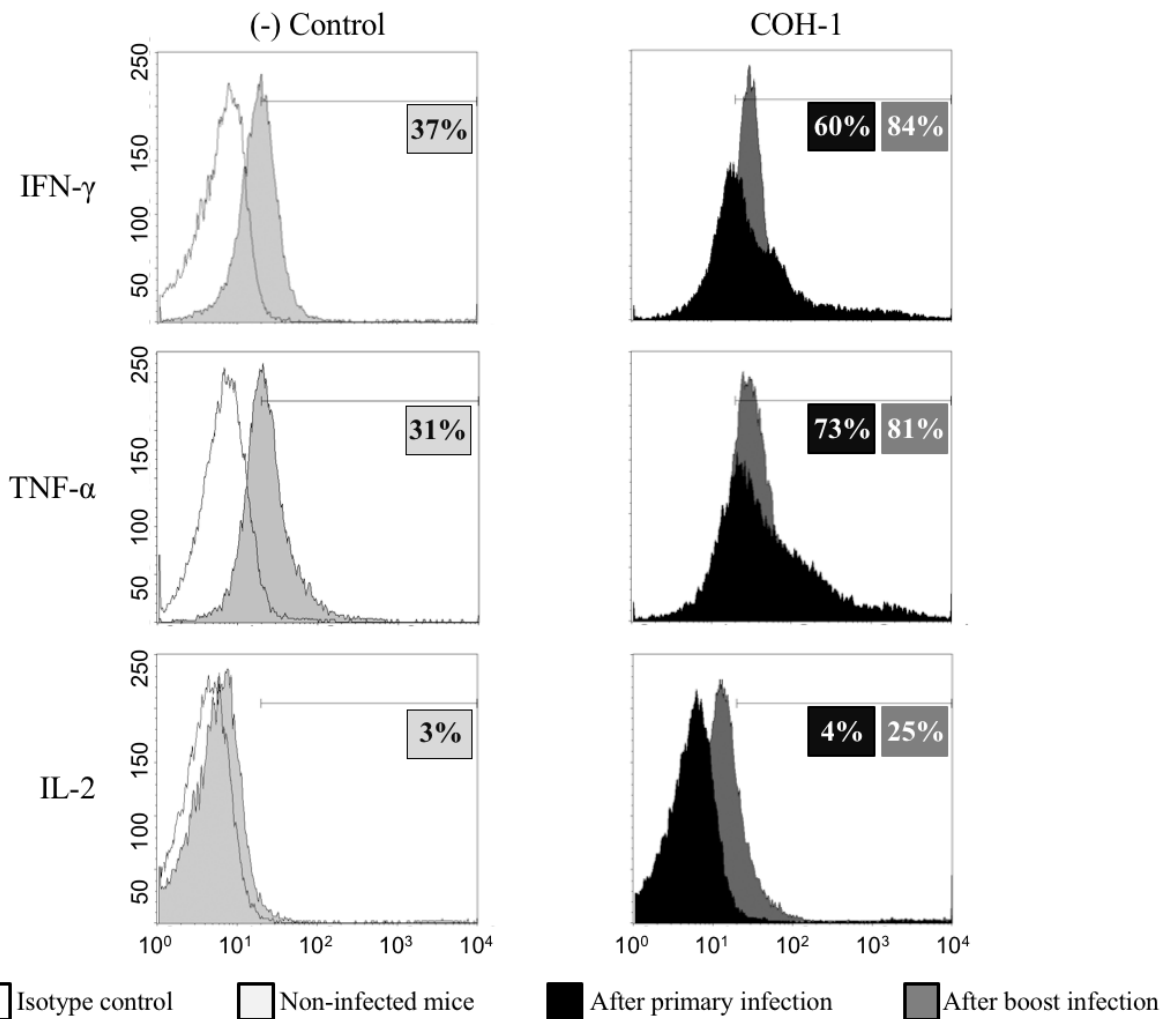


FIGURE 5. *In vivo* CD4⁺ T cell contribution to cytokine production during primary and secondary GBS infections. C57BL/6 mice were injected intraperitoneally with a dose of 10⁶ CFU of wild-type GBS serotype III strain COH-1. Surviving animals who had previously displayed clinical signs were boosted with a second dose of 10⁶ CFU of GBS strain COH-1 two weeks after initial infection. Spleens of animals with clinical signs and positive bacteremia were harvested 96 h after primary infection or 48 h after boost infection (n = 2 per group x 5 individual experimental infections). Five hours prior to spleen collection, mice were injected with Brefeldin A (200 μ g). Control (-) animals were similarly treated. Splenic CD4⁺ T cells were MACS-purified, stained intracellularly for different cytokines and analyzed by FACS. Representative data from 5 different experimental infections. Cytokine basal expression levels in control (-) animals were similar at 96 h after primary mock-infection and 48 h after secondary mock-infection. Representative histograms from the latter time point were selected for the figure. Twenty thousand gated events were acquired per sample and data analysis was performed using CellQuest software. Histograms were drawn based on PE-control stain and were plotted on logarithmic scales. It should be noted that isotype controls are the same in both groups, but only displayed on left panels to simplify the figure.

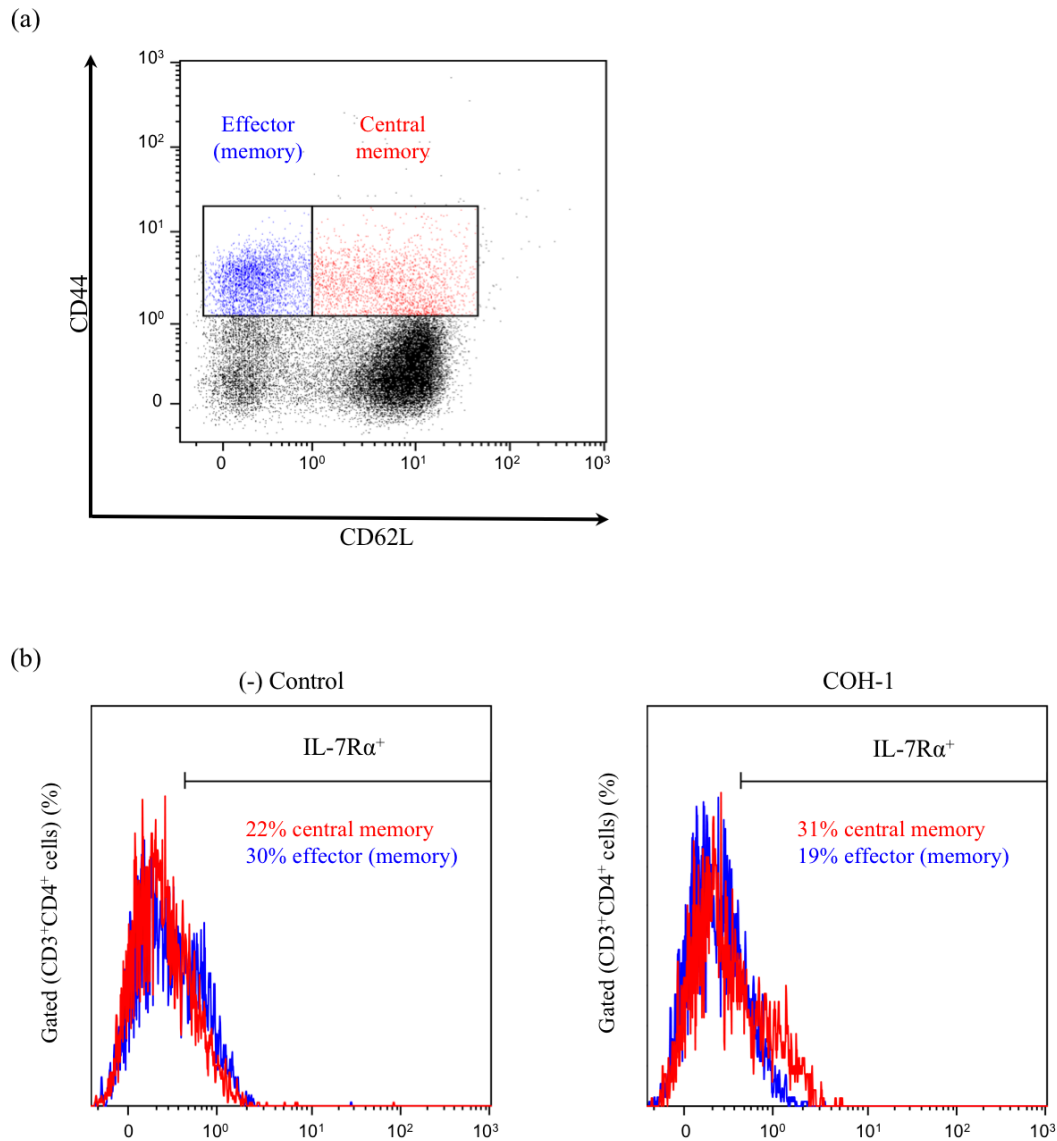


FIGURE 6. *In vivo* generation of memory CD4⁺ T cells during GBS infection. C57BL/6 mice were injected intraperitoneally with a dose of 10⁶ CFU of wild-type GBS serotype III strain COH-1. Surviving animals who had previously displayed clinical signs were boosted with a second dose of 10⁶ CFU of GBS strain COH-1 two weeks after initial infection. Spleens of animals with clinical signs and positive bacteremia were harvested 48 h after boost infection. Total splenocytes were stained and analyzed by multiparametric FACS. (a) Cells were gated on CD3⁺CD4⁺ double-positive cells, followed by gating CD44^{high}CD62L⁻ (effector [memory] T cells) and CD44^{high}CD62L⁺ (central memory T cells). A histogram from a representative control (mock-infected) mouse was selected for the figure. (b) A fifth surface marker, IL-7Rα, was used to further identify memory cells (CD44^{high}IL-7Rα⁺) within the CD44^{high}CD62L⁻ (effector [memory] T cells) and CD44^{high}CD62L⁺ (central memory T cells). IL-7Rα⁺ cells reflect memory cells within these respective populations. Histograms from representative control (mock-infected) and infected mice were selected for the figure. Thirty thousand events gated on CD3⁺I cells were acquired per sample and data analysis was performed using Kaluza® Flow Analysis software.

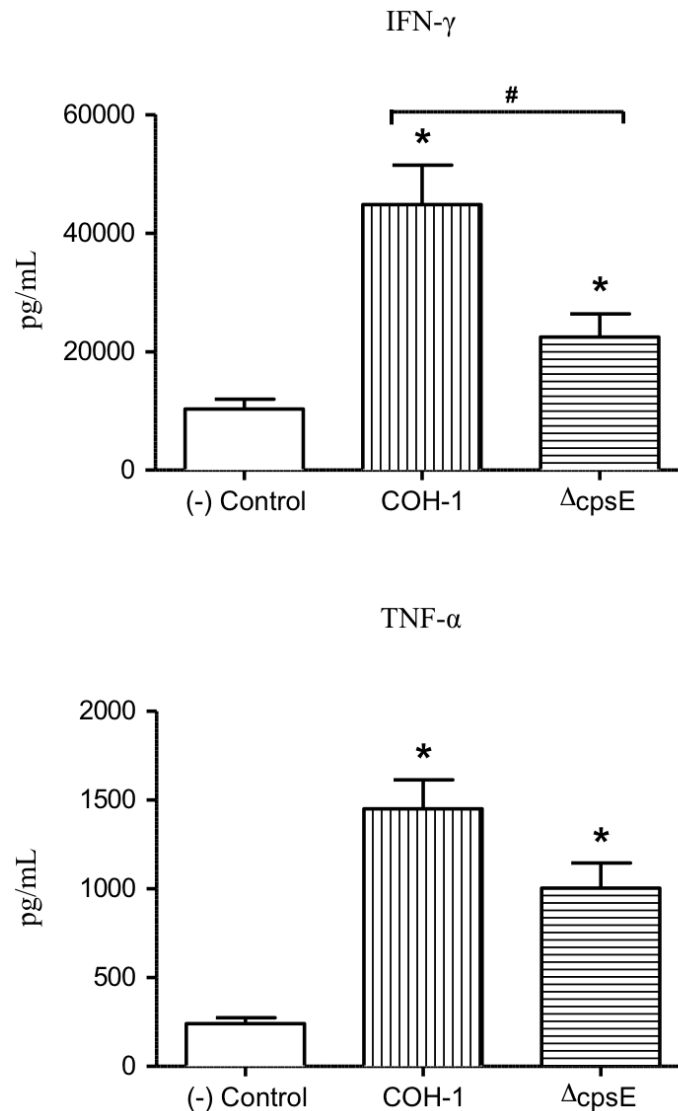


FIGURE 7. Role of bacterial capsular polysaccharide in the modulation of cytokine production by CD4⁺ T cells. Dendritic cells (DCs) were infected with either wild-type GBS strain COH-1 or its nonencapsulated isogenic mutant $\Delta cpsE$ (MOI:1) for 1 h. Extracellular bacteria were killed by antibiotic treatment and cultures washed prior to addition of freshly isolated splenic CD4⁺ T cells from naive mice (T cell: DC ratio of 5:1). Cocultures were incubated for 48 h, resuspended in fresh medium containing 10 ng/mL of IL-2 for 72 h (resting period) and then transferred to anti-CD3 coated plates for 48 h. Supernatants were then collected and cytokines quantified by ELISA. Nonstimulated cocultures served as negative (-) controls for basal expression. Data are expressed as means \pm SEM (in pg/mL) from 5 different experiments. * $P < 0.05$, indicates statistically significant differences compared to (-) control. # $P < 0.05$, indicates statistically significant differences between cocultures infected with wild-type strain COH-1 and those infected with the nonencapsulated mutant $\Delta cpsE$.

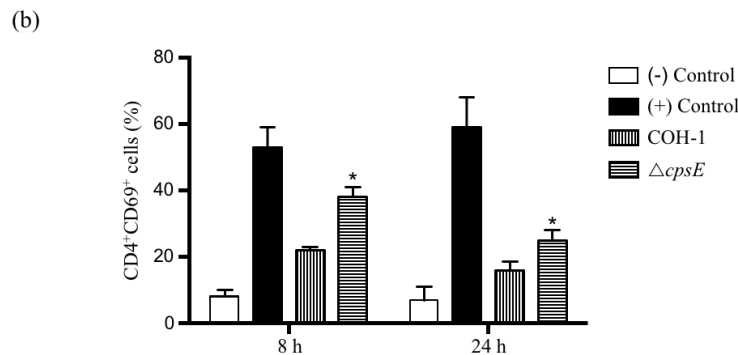
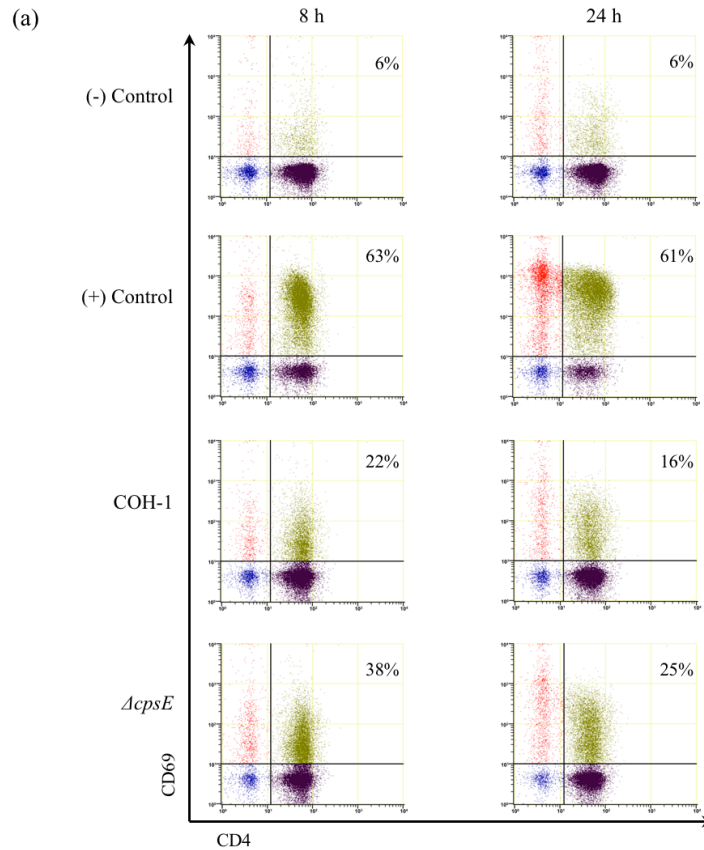


FIGURE 8. Role of bacterial capsular polysaccharide in the modulation of CD4⁺ T cell surface expression of CD69. Dendritic cells (DCs) were infected with either wild-type GBS strain COH-1 or its nonencapsulated isogenic mutant $\Delta cpsE$ (MOI:1) for 1 h. Extracellular bacteria were killed by antibiotic treatment and cultures washed prior to addition of freshly isolated splenic CD4⁺ T cells from naive mice (T cell: DC ratio of 5:1). Cocultures were incubated for 8 h and 24 h, cells harvested, and CD69 expression analyzed by FACS. Cocultures incubated with medium alone or Concanavalin (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) served as negative (-) and positive controls (+), respectively. (a) Representative data from 3 different experiments. Twenty thousand gated events were acquired per sample and data analysis was performed using Cell Lab Quanta Collection/Analysis software. Quadrants were drawn based on FITC- and PE-control stains and were plotted on logarithmic scales. Numbers in the upper quadrants indicate the % of CD4⁺CD69⁺ cells. (b) Data are expressed as means \pm SEM from 3 different experimental infections; * $P < 0.05$, indicates statistically significant differences between cocultures infected with wild-type strain COH-1 and those infected with the nonencapsulated mutant $\Delta cpsE$.

References

- [1] P. Melin, "Neonatal group B streptococcal disease: from pathogenesis to preventive strategies," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 17, no. 9, pp. 1294-1303, 2011.
- [2] J. R. Verani and S. J. Schrag, "Group B streptococcal disease in infants: progress in prevention and continued challenges," *Clinics in Perinatology*, vol. 37, no. 2, pp. 375-392, 2010.
- [3] M. S. Edwards and C. J. Baker, "Group B streptococcal infections in elderly adults," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 41, no. 6, pp. 839-847, 2005.
- [4] H. C. Maisey, K. S. Doran, and V. Nizet, "Recent advances in understanding the molecular basis of group B *Streptococcus* virulence," *Expert Reviews in Molecular Medicine*, vol. 10, e27, 2008.
- [5] J. Wennekamp and P. Henneke, "Induction and termination of inflammatory signaling in group B streptococcal sepsis," *Immunological Reviews*, vol. 225, pp. 114-127, 2008.
- [6] V. Cusumano, A. Midiri, V. V. Cusumano et al., "Interleukin-18 is an essential element in host resistance to experimental group B streptococcal disease in neonates," *Infection and Immunity*, vol. 72, no. 1, pp. 295-300, 2004.
- [7] V. Cusumano, F. Genovese, G. Mancuso et al., "Interleukin-10 protects neonatal mice from lethal group B streptococcal infection," *Infection and Immunity*, vol. 64, no. 7, pp. 2850-2852, 1996.
- [8] V. Cusumano, G. Mancuso, F. Genovese et al., "Role of gamma interferon in a neonatal mouse model of group B streptococcal disease," *Infection and Immunity*, vol. 64, no. 8, pp. 2941-2944, 1996.
- [9] G. Mancuso, V. Cusumano, F. Genovese et al., "Role of interleukin 12 in experimental neonatal sepsis caused by group B streptococci," *Infection and Immunity*, vol. 65, no. 9, pp. 3731-3735, 1997.
- [10] G. Teti, G. Mancuso, and F. Tomasello, "Cytokine appearance and effects of anti-tumor necrosis factor alpha antibodies in a neonatal rat model of group B streptococcal infection," *Infection and Immunity*, vol. 61, no. 1, pp. 227-235, 1993.
- [11] D. B. Lewis, A. Larsen, and C. B. Wilson, "Reduced interferon-gamma mRNA levels in human neonates. Evidence for an intrinsic T cell deficiency independent of other genes involved in T cell activation," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 163, no. 4, pp. 1018-1023, 1986.

- [12] C. B. Wilson, "Immunologic basis for increased susceptibility of the neonate to infection," *Journal of Pediatrics*, vol. 108, no. 1, pp. 1-12, 1986.
- [13] V. O. Lione, M. H. Santos, J. S. Oliveira et al., "Interferon-gamma inhibits group B *Streptococcus* survival within human endothelial cells," *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 109, no. 7, pp. 940-943, 2014.
- [14] Y. Kinjo, P. Illarionov, J. L. Vela et al., "Invariant natural killer T cells recognize glycolipids from pathogenic Gram-positive bacteria," *Nature Immunology*, vol. 12, no. 10, pp. 966-974, 2011.
- [15] C. A. Derrico and K. J. Goodrum, "Interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha mediate innate production of gamma interferon by group B *Streptococcus*-treated splenocytes of severe combined immunodeficiency mice," *Infection and Immunity*, vol. 64, no. 4, pp. 1314-1320, 1996.
- [16] P. Lemire, M. Houde, M. P. Lecours et al., "Role of capsular polysaccharide in Group B *Streptococcus* interactions with dendritic cells," *Microbes and Infection*, vol. 14, no. 12, pp. 1064-1076, 2012.
- [17] D. J. Kwak, N. H. Augustine, W. G. Borges et al., "Intracellular and extracellular cytokine production by human mixed mononuclear cells in response to group B streptococci," *Infection and Immunity*, vol. 68, no. 1, pp. 320-327, 2000.
- [18] T. R. La Pine, J. L. Joyner, N. H. Augustine et al., "Defective production of IL-18 and IL-12 by cord blood mononuclear cells influences the T helper-1 interferon gamma response to group B streptococci," *Pediatric Research*, vol. 54, no. 2, pp. 276-281, 2003.
- [19] M. J. Cieslewicz, D. Chaffin, G. Glusman et al., "Structural and genetic diversity of Group B *Streptococcus* capsular polysaccharides," *Infection and Immunity*, vol. 73, no. 5, pp. 3096-3103, 2005.
- [20] K. S. Doran and V. Nizet, "Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: no longer in its infancy," *Molecular Microbiology*, vol. 54, no. 1, pp. 23-31, 2004.
- [21] A. F. Carlin, S. Uchiyama, Y. C. Chang et al., "Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to engage neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response," *Blood*, vol. 113, no. 14, pp. 3333-3336, 2009.
- [22] P. Lemire, M. Houde, and M. Segura, "Encapsulated group B *Streptococcus* modulates dendritic cell functions via lipid rafts and clathrin-mediated endocytosis," *Cellular Microbiology*, vol. 14, no. 11, pp. 1707-1719, 2012.
- [23] A. Costa, R. Gupta, G. Signorino et al., "Activation of the NLRP3 inflammasome by group B streptococci," *Journal of Immunology*, vol. 188, no. 4, pp. 1953-1960, 2012.

- [24] G. Mancuso, M. Gambuzza, A. Midiri et al., "Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells," *Nature Immunology*, vol. 10, no. 6, pp. 587-594, 2009.
- [25] P. Lemire, C. Calzas, and M. Segura, "The NOD2 receptor does not play a major role in the pathogenesis of Group B Streptococcus in mice," *Microbial Pathogenesis*, vol. 65, pp. 41-47, 2013.
- [26] R. Stephens and J. Langhorne, "Effector memory Th1 CD4 T cells are maintained in a mouse model of chronic malaria," *PLoS Pathogens*, vol. 6, no. 11, e1001208, 2010.
- [27] M. N. Khan and M. E. Pichichero, "CD4 T cell memory and antibody responses directed against the pneumococcal histidine triad proteins PhtD and PhtE following nasopharyngeal colonization and immunization and their role in protection against pneumococcal colonization in mice," *Infection and Immunity*, vol. 81, no. 10, pp. 3781-3792, 2013.
- [28] J. R. Groom and A. D. Luster, "CXCR3 in T cell function," *Experimental Cell Research*, vol. 317, no. 5, pp. 620-631, 2011.
- [29] M. Bebien, M. E. Hensler, S. Davanture et al., "The pore-forming toxin beta hemolysin/cytolysin triggers p38 MAPK-dependent IL-10 production in macrophages and inhibits innate immunity," *PLoS Pathogens*, vol. 8, no. 7, e1002812, 2012.
- [30] M. A. De Francesco, F. Gargiulo, R. Negrini et al., "Different sequence strains of *Streptococcus agalactiae* elicit various levels of cytokine production," *Immunological Investigations*, vol. 37, no. 8, pp. 741-751, 2008.
- [31] D. W. Draper, H. N. Bethea, and Y. W. He, "Toll-like receptor 2-dependent and -independent activation of macrophages by group B streptococci," *Immunology Letters*, vol. 102, no. 2, pp. 202-214, 2006.
- [32] Q. Zhang, L. Bagrade, E. Clarke et al., "Bacterial lipoproteins differentially regulate human primary and memory CD4⁺ T and B cell responses to pneumococcal protein antigens through Toll-like receptor 2," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 201, no. 11, pp. 1753-1763, 2010.
- [33] H. Fan, D. L. Williams, B. Zingarelli et al., "Differential regulation of lipopolysaccharide and Gram-positive bacteria induced cytokine and chemokine production in macrophages by Galpha(i) proteins," *Immunology*, vol. 122, no. 1, pp. 116-123, 2007.
- [34] P. Lemire, D. Roy, N. Fittipaldi et al., "Implication of TLR- but not of NOD2-signaling pathways in dendritic cell activation by group B *Streptococcus* serotypes III and V," *PLoS One*, vol. 9, no. 12, e113940, 2014.
- [35] M. P. Lecours, M. Gottschalk, M. Houde et al., "Critical role for *Streptococcus suis* cell wall modifications and sulysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 204, no. 6, pp. 919-929, 2011.

- [36] A. Kolb-Maurer, A. Unkmeir, U. Kammerer et al., "Interaction of *Neisseria meningitidis* with human dendritic cells," *Infection and Immunity*, vol. 69, no. 11, pp. 6912-6622, 2001.
- [37] M. Olliver, J. Hiew, P. Mellroth et al., "Human monocytes promote Th1 and Th17 responses to *Streptococcus pneumoniae*," *Infection and Immunity*, vol. 79, no. 10, pp. 4210-4217, 2011.
- [38] A. von Delwig, E. Bailey, D. M. Gibbs, and J. H. Robinson, "The route of bacterial uptake by macrophages influences the repertoire of epitopes presented to CD4 T cells," *European Journal of Immunology*, vol. 32, no. 12, pp. 3714-3719, 2002.
- [39] C. R. Lin, T. W. Wei, H. Y. Tsai et al., "Glycosylation-dependent interaction between CD69 and S100A8/S100A9 complex is required for regulatory T-cell differentiation," *FASEB Journal*, fj.15-273987; published ahead of print August 21, 2015.
- [40] S. F. Ziegler, F. Ramsdell, and M. R. Alderson, "The activation antigen CD69," *Stem Cells*, vol. 12, no. 5, pp. 456-465, 1994.
- [41] A. Harimaya, T. Himi, N. Fujii et al., "Induction of CD69 expression and Th1 cytokines release from human peripheral blood lymphocytes after *in vitro* stimulation with *Alloiococcus otitidis* and three middle ear pathogens," *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, vol. 43, no. 3, pp. 385-392, 2005.
- [42] K. LeMessurier, H. Hacker, E. Tuomanen, and V. Redecke, "Inhibition of T cells provides protection against early invasive pneumococcal disease," *Infection and Immunity*, vol. 78, no. 12, pp. 5287-5294, 2010.
- [43] J. Vega-Ramos, E. Alari-Pahissa, J. D. Valle et al., "CD69 limits early inflammatory diseases associated with immune response to *Listeria monocytogenes* infection," *Immunology and Cell Biology*, vol. 88, no. 7, pp. 707-715, 2010.
- [44] K. Radulovic, C. Manta, V. Rossini et al., "CD69 regulates type I IFN-induced tolerogenic signals to mucosal CD4 T cells that attenuate their colitogenic potential," *Journal of Immunology*, vol. 188, no. 4, pp. 2001-2013, 2012.

ANNEXE II

Licences de droits d'auteurs pour l'utilisation des figures

Figure, page	Journal Éditeur	Licence obtenue via	Numéro de licence, date d'octroi
Figure 1-3, p.15, 16 et 18	<i>Future Microbiology</i> Future Medicine Ltd	Copyright Clearance Center	3881390698701 3 juin 2016
Figure 4, p.22	<i>Nature Reviews Immunology</i> Macmillan Publishers Ltd	Copyright Clearance Center	3881411055342 3 juin 2016
Figure 5, p.23	<i>Immunological Reviews</i> John Wiley and Sons Inc	Copyright Clearance Center	3884260642555 7 juin 2016
Figure 7, p.26	<i>Immunological Reviews</i> John Wiley and Sons Inc	Copyright Clearance Center	3883750453729 3 juin 2016
Figure 8, p.27	<i>Frontiers in Immunology</i> Frontiers Media SA	Creative Commons Attribution License (CC BY)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4707441/ 3 juin 2016
Figure 9, p.31	<i>Nature Reviews Immunology</i> Macmillan Publishers Ltd	Copyright Clearance Center	3881481140934 3 juin 2016
Figure 10, p.34	<i>User atropos235</i> en.wikipedia	Creative Commons Attribution License (CC BY 2.5)	https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1805483 10 juin 2016
Figure 11, p.36	<i>Frontiers in Physiology</i> Frontiers Media SA	Creative Commons Attribution License (CC BY)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4311620/ 10 juin 2016
Figure 12, p.38	<i>Nature Reviews Microbiology</i> Macmillan Publishers Ltd	Copyright Clearance Center	3883080308456 6 juin 2016
Figure 14, p.41	<i>Nature Reviews Immunology</i> Macmillan Publishers Ltd	Copyright Clearance Center	3885510366285 10 juin 2016
Figure 15, p.46	<i>PLOS One</i> PLOS	Creative Commons Attribution License (CC BY)	http://journals.plos.org/plosone/s/content-license 10 juin 2016
Figure 16, p.47	<i>Journal of Infectious Diseases</i> Oxford University Press	Copyright Clearance Center	3883080583166 6 juin 2016
Figure 1, p.124	<i>Nature Reviews Immunology</i> Macmillan Publishers Ltd	Copyright Clearance Center	3885510366285 10 juin 2016
Figure 2, p.128	<i>Infection and Immunity</i> American Society for Microbiology - Journals	Copyright Clearance Center	3887380695410 6 juin 2016