

Université de Montréal

**Les cellules dendritiques porcines comme modèle *in vitro* pour évaluer la réponse immunitaire des candidats vaccinaux chez *Streptococcus suis***

par

LÉA MARTELET

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

Novembre 2016  
©Léa Martelet, 2016

## Résumé

*Streptococcus suis* est une bactérie encapsulée causant des pertes économiques majeures dans l'industrie porcine en provoquant la méningite et la septicémie chez le porc. C'est aussi un important agent zoonotique. Depuis de nombreuses années de recherche sur des vaccins, aucun n'est efficace et commercialement disponible. En effet, les bactérines (bactéries entières inactivées) autogènes sont les plus couramment utilisées sur le terrain, mais demeurent avec des résultats controversés. Pourtant, *S. suis* exprime de nombreux composants immunogéniques pouvant être potentiellement utilisés pour des vaccins sous-unitaires. Cependant, tester la capacité immunogénique de ces nombreux candidats vaccinaux ainsi qu'évaluer le meilleur adjuvant pour la formulation d'un vaccin contre *S. suis* est un processus long et onéreux qui requiert l'utilisation d'un nombre élevé d'animaux. En effet, les essais vaccinaux contre *S. suis* débutent par un premier dépistage chez la souris pour ensuite être testés chez le porc. Il est donc nécessaire de développer des stratégies permettant d'avancer et de faciliter la recherche.

Dans cette optique, un système *in vitro* a été développé utilisant des cellules dendritiques (DC) différenciées à partir des cellules souches de la moelle osseuse de fémur de porc. Ce modèle permettra l'analyse des candidats vaccinaux et de leur potentiel immunogénique ainsi que l'évaluation préliminaire des adjuvants. Ce système *in vitro* pourrait réduire le nombre d'animaux utilisés pour les essais précliniques en délivrant des connaissances immunologiques fondamentales sur les formulations de vaccins testés, dont ceux retenus mériteront une étude approfondie chez l'animal.

Pour développer ce modèle *in vitro*, l'utilisation de plusieurs cultures de DCs, dérivées des cellules souches de la moelle osseuse de 10 porcelets différents, ont été utilisées afin de tenir compte du polymorphisme génétique de chacun. Différents composants antigéniques de *S. suis*, dont leurs pouvoirs immunogéniques ont déjà été évalués lors des essais vaccinaux, ont été choisis. Parmi eux, une protéine de surface de *S. suis* a été sélectionnée : l'énolase. *In vivo*, elle a été reconnue comme ayant une forte immunogénicité, cependant la protection conférée par cette protéine dépend de l'adjuvant utilisé dans la formulation vaccinale. La capsule

polysaccharidique (CPS) de *S. suis*, l'antigène le plus exposé en surface de la bactérie et en première ligne de contact avec le système immunitaire, est le deuxième antigène à être sélectionné pour cette étude. Étant donné la faible immunogénicité de la CPS, reliée à sa nature polysaccharidique, un prototype glycoconjugué a été précédemment développé dans notre laboratoire et son effet protecteur a été validé chez le porc. Le glycoconjugué et ses dérivées ont aussi fait l'objet de cette présente étude. Finalement, la capacité des DCs à répondre à des bactéries a aussi été évaluée. Différentes catégories d'adjuvants ont été sélectionnées (Poly I:C, Quil A®, Alhydrogel 2%®, TiterMax Gold® et Stimune®) et leurs effets ont été comparés. L'activation des DCs a été évaluée par la production de cytokines de type 1 (IL-12 et TNF- $\alpha$ ) et de type 2 (IL-6).

Il a été observé que les adjuvants intensifiaient l'activation des DCs par une augmentation de production des cytokines par rapport aux antigènes seuls. De plus, il a été constaté que les DCs distinguaient un adjuvant de type 1 ou de type 2 par l'observation d'un profil cytokinique spécifique à chaque type de réponse suite à leur activation par les adjuvants combinés aux différents antigènes. Il a aussi été constaté que l'ampleur de la production de cytokines variait selon la nature de l'antigène présent avec les adjuvants. Enfin, il a été noté que les DCs répondaient différemment selon la nature chimique des antigènes.

En conclusion, ce système *in vitro* a permis d'évaluer la capacité immunogénique de candidats vaccinaux, mais aussi de présélectionner les meilleurs adjuvants favorisant la réponse immunitaire désirée contre *S. suis*. À cette fin, ce modèle pourrait permettre la réduction du nombre d'animaux utilisés en test préclinique, en permettant une présélection des candidats vaccinaux à tester *in vivo* ou en fournissant des connaissances scientifiques additionnelles sur des choix des candidats cibles. Sur le long terme, ce modèle facilitera la découverte des vaccins sous-unitaires contre *S. suis*.

**Mots-clés:** *Streptococcus suis*, cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de porc, adjuvants, vaccin, réponse immunitaire type 1/type 2, cytokines type 1/type 2, émolase, glycoconjugué, bactéries.

## Abstract

*Streptococcus suis*, an encapsulated bacterium, is a major swine pathogen and an important zoonotic agent mainly causing septicemia and meningitis. Despite decades of vaccine research, no effective vaccine is currently commercially available. Indeed, autogenous bacterins (whole inactivated bacteria) are the most commonly used vaccines in the field; however, their protective capacity remains controversial. Nevertheless, *S. suis* expresses many immunogenic constituents that may have potential as sub-unit vaccines. However, testing the immunogenic potential of the many *S. suis* candidates and appropriate adjuvants is a long and costly process requiring the use of many animals. Indeed, studies of vaccines against *S. suis* start with a first screening in mice prior to evaluation in pigs. Therefore, it is necessary to develop strategies to advance and facilitate the research.

Hence, an *in vitro* porcine bone marrow-derived dendritic cell (DC) culture was developed as a model for screening vaccine candidates, evaluation of their immunogenicity, and assessment of the best(s) adjuvant(s) to be used. This model could reduce the number of animals used in pre-clinical trials by providing fundamental immunological knowledge on selected vaccine formulations that would deserve further analysis in animal trials.

To develop this model, porcine bone marrow-derived DC cultures from 10 different pigs were used to take into account the genetic polymorphism of individual animals. Different antigenic components of *S. suis*, the immunogenic properties of which have already been evaluated in vaccine trials, were selected. Among them, a surface protein of *S. suis* was selected: enolase. *In vivo*, this protein has been recognized as having high immunogenicity; however, the protection conferred by this protein depends on the adjuvant used in the vaccine formulation. The *S. suis* capsular polysaccharide (CPS), the most exposed antigen on the surface of the bacterium and the first line of contact with the immune system, is the second antigen selected for this study. Given the low immunogenicity of CPS, linked to its polysaccharide nature, a prototype glycoconjugate vaccine was previously developed in our laboratory and its protective effect validated in pigs. This glycoconjugate and its derivatives have also been the subject of this study. Finally, the ability of DCs to respond to bacterins was also evaluated.

Different categories of adjuvants (Poly I:C, Quil A®, Alhydrogel 2%®, TiterMax Gold®, and Stimune®) were compared. The activation of DCs was evaluated by the production of type 1 (IL-12 and TNF- $\alpha$ ) and type 2 (IL-6) cytokines.

It was observed that adjuvants amplify DC activation as demonstrated by an increase of cytokine production when compared to the antigen alone. Moreover, DCs distinguish type 1 or 2 adjuvants in combination with different *S. suis* antigens, according to the cytokine profile observed. It has also been found that the extent of cytokine production varies depending on the nature of the antigen present with the adjuvants. Finally, it was observed that DCs respond differently depending on the chemical nature of the antigens.

In conclusion, this *in vitro* model allows the evaluation of the immunogenic potential of vaccine candidates while also screening for adjuvants favoring the desired immune response against *S. suis*. Therefore, this model could permit a reduction in the number of animals used in pre-clinical trials by allowing a preselection of candidates to be tested *in vivo* or by providing additional scientific knowledge as a basis for the target choices. As a result, the list of candidates to be screened in the natural host *in vivo* would be reduced, facilitating the discovery of a subunit vaccine against *S. suis*.

**Key words:** *Streptococcus suis*, porcine bone marrow-derived dendritic cells, adjuvants, vaccine, type 1/type 2 immune response, type 1/type 2 cytokines, enolase, glycoconjugate, bacterins.

## Table des matières

Résumé .....	ii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures .....	ix
Liste des abréviations .....	xi
Remerciements .....	xiii
I. Introduction.....	1
II. Revue de littérature .....	6
1. <i>Streptococcus suis</i> .....	7
1.1. Microbiologie générale .....	7
1.2. Les sérotypes et ‘sequence types’ de <i>S. suis</i> .....	7
1.2.1. Les sérotypes .....	7
1.2.2. ‘Sequence types’ .....	9
1.3. Épidémiologie porcine et humaine de <i>S. suis</i> .....	11
1.3.1. Épidémiologie porcine.....	11
1.3.2. Épidémiologie humaine .....	12
1.3.3. Transmission, signes cliniques et traitements.....	14
1.4. La pathogenèse et les principaux facteurs de virulence de <i>S. suis</i> sérotype 2.....	15
1.4.1. La pathogenèse de <i>S. suis</i> .....	15
1.4.2. Les facteurs de virulence de <i>S. suis</i> .....	21
1.4.2.1. La capsule polysaccharidique (CPS) .....	24
1.4.2.2. L’énolase .....	27
1.5. Les vaccins contre <i>S. suis</i> .....	29
1.5.1. L’immunité passive transmise de la truie aux porcelets .....	29
1.5.2. Les vaccins contre <i>S. suis</i> .....	30
1.5.2.1. Les vaccins utilisant <i>S. suis</i> inactivé (les bactérines) .....	30
1.5.2.2. Les vaccins vivants atténués .....	32
1.5.2.3. Les vaccins sous-unitaires.....	33
2. La cellule dendritique et le développement de la réponse immunitaire adaptative .....	38
2.1. La cellule dendritique (DC) .....	39
2.1.1. Généralité .....	39
2.1.2. Les DCs porcines .....	40
2.2. La reconnaissance du pathogène par les DCs .....	43
2.3. La synapse biologique entre la DC et les lymphocytes T <i>helper</i> .....	44
2.3.1. La maturation des DCs.....	44
2.3.2. La présentation de l’antigène .....	46
2.4. L’activation et la différenciation des lymphocytes Th.....	48
2.4.1. Les lymphocytes Th1.....	48
2.4.2. Les lymphocytes Th2.....	49

2.5. L'activation des lymphocytes B .....	49
2.5.1. L'activation thymodépendante.....	50
2.5.2. L'activation thymoindépendante.....	50
2.5.3. La production d'anticorps.....	51
<b>3. Les adjuvants utilisés en médecine vétérinaire .....</b>	<b>54</b>
<b>3.1. Les constituants bactériens .....</b>	<b>55</b>
<b>3.2. Les adjuvants huileux .....</b>	<b>57</b>
3.2.1. L'émulsion eau-dans-huile (w/o).....	58
3.2.2. L'émulsion huile-dans-eau (o/w).....	59
<b>3.3. Les saponines.....</b>	<b>61</b>
<b>3.4. Les adjuvants minéraux.....</b>	<b>62</b>
<b>III. Article scientifique .....</b>	<b>64</b>
<b>IV. Discussion générale.....</b>	<b>95</b>
<b>1. L'activation des DCs porcines par les adjuvants .....</b>	<b>96</b>
1.1. Le Poly I:C .....	96
1.2. Le Quil A® .....	98
1.3. L'alhydrogel® .....	99
1.4. Le TiterMax Gold® .....	101
1.5. Le Stimune®.....	101
<b>2. L'effet de l'antigène sur la polarisation de l'adjuvant .....</b>	<b>102</b>
<b>3. Déficit technique du modèle et autres perspectives d'étude .....</b>	<b>105</b>
<b>4. L'application de ce modèle d'étude <i>in vitro</i> dans le cas de la recherche d'un vaccin     contre <i>S. suis</i>.....</b>	<b>105</b>
<b>V. Conclusions et perspectives.....</b>	<b>107</b>
<b>VI. Bibliographie.....</b>	<b>110</b>
<b>VII. Annexe.....</b>	<b>xv</b>
Annexe I : Licences des droits d'auteurs pour l'utilisation des figures de la revue de littérature .....	xvi

## Liste des tableaux

### Revue de littérature

<b>Tableau I.</b> Distribution mondiale des sérotypes les plus fréquemment isolés chez les porcs infectés par <i>S. suis</i> , et le nombre de cas cliniques porcins recensés entre 2002 et 2013 .....	<b>11</b>
<b>Tableau II.</b> Distribution mondiale des sérotypes les plus fréquemment retrouvés dans les cas de zoonoses par <i>S. suis</i> , et le nombre de cas cliniques humains recensés entre 2002 et 2013 .....	<b>13</b>
<b>Tableau III.</b> Les principaux facteurs de virulence putatifs, associés à la membrane ou secrétés, exprimés par <i>S. suis</i> sérotype 2. ....	<b>22</b>
<b>Tableau IV.</b> Différents essais de vaccination utilisant des vaccins sous-unitaires contre <i>S. suis</i> . ....	<b>36</b>
<b>Tableau V.</b> Les marqueurs de différenciation (CD pour « cluster of differentiation ») des différentes populations de DCs identifiées chez le porc .....	<b>42</b>
<b>Tableau VI.</b> Les TLRs exprimés par les DCs et leurs principaux ligands .....	<b>44</b>
<b>Tableau VII.</b> Principales cytokines jouant un rôle dans le développement de la réponse immunitaire de type 1 et de type 2. ....	<b>48</b>
<b>Tableau VIII.</b> Les différentes sous-classes d'Ig ainsi que leur rôle dans la protection contre les pathogènes selon les espèces . ....	<b>52</b>

### Article scientifique

<b>Table I.</b> Surface phenotype of bmDCs after 8 days differentiation using either pGM-CSF supernatant or commercial rGM-CSF. ....	<b>76</b>
--	-----------

## Liste des figures

### Revue de littérature

<b>Figure 1.</b> Image de <i>S. suis</i> sérotype 2 par microscopie électronique .....	7
<b>Figure 2.</b> Les STs et complexes ST appartenant à <i>S. suis</i> sérotype 2, identifiés par MLST.....	10
<b>Figure 3.</b> Distribution mondiale des plus importantes 'sequence type' (ST) de <i>S. suis</i> sérotype 2 isolés des porcs malades et/ou des cas d'infection chez l'homme .....	11
<b>Figure 4.</b> Interaction de <i>S. suis</i> avec les cellules épithéliales et les composants de la matrice extracellulaire .....	17
<b>Figure 5.</b> La résistance de <i>S. suis</i> à la réponse immunitaire de l'hôte après avoir passé la barrière épithéliale .....	19
<b>Figure 6.</b> Invasion du système nerveux central par <i>S. suis</i> .....	20
<b>Figure 7.</b> Structure chimique de la CPS de <i>S. suis</i> sérotype 2. ....	25
<b>Figure 8.</b> Photo d'une cellule dendritique porcine par microscopie électronique à l'état immature (a) versus à l'état mature, identifié par la surexpression des molécules de costimulation et du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (b) .....	45
<b>Figure 9.</b> Schéma illustrant la présentation de l'antigène, via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) par les DCs aux lymphocytes T .....	46
<b>Figure 10.</b> Schéma récapitulatif et général du développement des réponses immunitaires de type 1 et de type 2.....	53

### Article scientifique

<b>Supplemental Figure S1.</b> Dose-response to select optimal enolase concentration for in vitro bmDC studies. ....	75
<b>Supplemental Figure S2.</b> Dose-response and toxicity trials to select optimal adjuvant dose for in vitro bmDC studies. ....	78
<b>Figure 1.</b> Cytokine production by bmDCs is differentially modified by enolase in combination with different adjuvants. ....	80
<b>Figure 2.</b> Type 1/type 2 cytokine profiles of bmDCs stimulated with enolase in combination with different adjuvants.....	82

<b>Figure 3.</b> Cytokine production by bmDCs in response to stimulation by CPS, TT or CPS-TT conjugate.....	<b>83</b>
<b>Figure 4.</b> Type 1/type 2 cytokine profiles of bmDCs stimulated with CPS, TT or CPS-TT conjugate in combination with different adjuvants.....	<b>85</b>

## **Discussion générale**

<b>Figure 11.</b> Profils des cytokines induites par les adjuvants en combinaison avec des bactéries de <i>S. suis</i> sérotype 2 faites à partir des souches P1/7 ou 89-1591.....	<b>103</b>
--	------------

## Liste des abréviations

6PGD	6 phosphoglucoronate-dehydrogenase
ACF	Adjuvant complet de Freund
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNds	Acide ribonucléique double brin
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
ARNss	Acide ribonucléique simple brin
BmDC	« Bone-marrow derived dendritic cell »
BMEC	Cellule endothéliale microvasculaire
BMHC	« Bone-marrow haematopoietic cell »
CD	« Cluster of differentiation »
cDC	Cellule dendritique conventionnelle
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CPEC	Cellule épithéliale du plexus choroïde
CPG ODN	Motifs CPG oligodeoxynucléotides
CPS	Capsule polysaccharidique
DC	Cellule dendritique
DppIV	Dipeptidylpeptidase IV
Fbps	« Fibronectin-binding protein »
Fhb	« Factor h-binding »
Fhbp	« Factor h-binding protein »
GADPH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GM-CSF	« Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor »
Hémato-CSF	barrière hématoencéphalique
IFA	Adjuvant incomplet de Freund
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
ISCOM	« Immunostimulating complexe »
LacCer	Lactosylcéramide
LB	Lymphocyte N
LPS	Lypopolysaccharide
LT	Lymphocyte T
MAP	« Murein-associated protein »
MLST	« Multilocus sequence typing »
MoDC	« Monocyte-derived dendritic cell »

MRP	« Muramidase- release protein »
NK	Cellule Natural Killer
o/w	« Oil-in-water »
PAMP	« Pathogen-associated molecular pattern »
PCR	« Polymerase chain reaction »
pDC	Cellule dendritique plasmacytoïde
POE	polyxyéthylène
Poly I:C	Acide polynosinic-polycytidylic
POP	polyoxypropylène
PRR	« Pattern recognition receptor »
SAF	« Synthex adjuvant formulation »
SAO	« Surface antigen one »
SEM	« Standard error of the mean »
SLA	« Swine leucocyte antigen »
SLY	Suilysine
SspA	« Subtilisin-like-protease »
ST	« Sequence type »
TCR	Récepteur des cellules T
TD	Voie T-Dépendante
Th	Lymphocyte T helper
TI	Voie T-indépendante
TLR	« Toll-like receptor »
TNF	« Tumor necrosis factor »
w/o	« Water-in-oil »

## Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué directement ou indirectement au déroulement de mes deux années de maîtrise :

Ma directrice Dre Mariela Segura, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire de recherche. Merci pour votre encadrement, votre présence et votre confiance qui m'ont permis de m'épanouir dans votre laboratoire et d'acquérir une confiance en moi tout au long du projet de maîtrise. J'ai beaucoup appris durant ces deux années, autant sur moi, mes capacités et mes limites, et autant sur la vie en laboratoire et sur l'immunologie. Ces deux années ont été une excellente expérience autant sur le plan professionnel que personnel. Avoir fait ma maîtrise dans votre laboratoire a été un joli « point final » à ma vie étudiante. Je vous remercie énormément !

Mon codirecteur Dr Marcelo Gottschalk, pour son encadrement, sa disponibilité et ses conseils dont j'ai pu bénéficier.

Les membres de mon comité-conseil : Dre Marie Archambault et Dr Jean-Pierre Lavoie ainsi que les membres du jury d'évaluation de ce mémoire : Dr Martin Lessard, Dr John Morris Fairbrother et Dr Marcelo Gottschalk.

Sonia Lacouture, assistante de recherche du laboratoire de Dr Gottschalk pour toute son aide et ses conseils qui m'ont été précieux, ainsi qu'à sa bonne humeur. Merci aussi à Normand Lacasse, pour sa disponibilité et pour avoir aidé pour les pattes de porcs. Merci aussi à Claudia Duquette pour son aide.

Mes collègues de laboratoire anciens et présents : Cynthia, Paul, Guillaume, Corinne, David, merci pour toute votre aide, votre générosité et votre disponibilité pour avoir répondu à mes questions. Je remercie aussi les collègues du laboratoire du Dr Gottschalk : Sarah, Audrey, Jean-Philippe, Annabelle, Agustina, merci pour votre aide, votre présence et votre bonne humeur.

Enfin, un grand merci à tous pour vos sourires, vos rires et vos délires qui ont su donner une super ambiance au laboratoire ! J'ai vraiment adoré travailler au sein de votre équipe !

Les professeurs et membres du CRIPA et du GREMIP. Merci aussi à Christine Blondin, Diane Rodier, Nancy Bisailon et Hélène Boucher-Rhéaume pour leur aide chaleureuse.

Mes parents, pour m'avoir donné la chance d'étudier au Canada. Merci, car se fut une expérience hors du commun où j'ai pu évoluer, m'épanouir, et apprendre sur moi même. Je ne regrette absolument pas d'avoir posé mes valises dans ce pays il y a maintenant 5 ans. Si c'était à refaire, je le referais sans hésiter. Tout ceci c'est grâce à vous et je ne vous en remercierai jamais assez.

Ma sœur, mon petit-ami et mes amis, pour votre soutien et votre encouragement qui m'ont permis d'aller de l'avant. Merci !

Aux services subventionnaires pour le soutien financier : le CRIPA et FESP.

# I. Introduction

*Streptococcus suis* est un important pathogène porcin, il est d'ailleurs la cause des pertes économiques importantes dans l'industrie porcine. Chez le porc, *S. suis* est principalement à l'origine des méningites et des septicémies. Il peut aussi être responsable d'endocardite, d'arthrite et de pneumonie. Ce pathogène est également un agent zoonotique. Il a longtemps été considéré comme un agent infectieux des professionnels étant en contact étroit avec les porcs. Ce n'est qu'après les deux importantes épidémies humaines qu'ont eues lieu en Chine que *S. suis* est considéré comme une menace sérieuse pour la santé publique [1, 2]. Depuis de nombreuses années de recherche, aucun vaccin efficace n'est commercialement disponible permettant de contrôler les infections par *S. suis* chez le porc [3]. Le développement d'un vaccin universel est principalement entravé par l'importante diversité génotypique et phénotypique des 35 sérotypes et des souches virulentes au sein d'un même sérotype de *S. suis*, selon la répartition géographique. En effet, au sein du sérotype 2, considéré comme le plus virulent, différents 'sequence type' (ST) ont été décrits grâce au séquençage multilocus (MLST) [4, 5].

Les vaccins comprenant des bactérines autogènes sont les seuls appliqués sur le terrain de nos jours procurant qu'une protection homologue et donnant des résultats controversés [3]. Ainsi, les recherches actuelles visent principalement au développement des vaccins sous-unitaires conférant soit une protection universelle ou au moins, contre le ou les sérotypes les plus virulents, dont le sérotype 2 [3]. En effet, de nombreux composants immunogéniques ont été décrits pour *S. suis*, telles que des protéines de surface. Une des protéines retenue est l'énolase, décrite comme étant une protéine de liaison aux composants de la matrice extracellulaire, et exprimée par tous les sérotypes de *S. suis* [6]. Il s'agit d'une protéine hautement conservée et des anticorps dirigés contre celle-ci ont été retrouvés dans les sérums des porcs en convalescence [6, 7]. La capsule polysaccharidique (CPS) de *S. suis*, est un autre candidat potentiel. En effet, cet antigène est à la base du sérotypage et est exprimé sur toutes les souches au sein d'un même sérotype [3]. Étant peu immunogénique dû à sa nature polysaccharidique, une équipe a développé un glycoconjugué reliant la CPS à une protéine porteuse immunogénique, permettant la génération des anticorps protecteurs après immunisation chez la souris et le porc [8].

Lors du développement d'un vaccin, l'adjuvant a un rôle clé, non seulement dans l'activation du système immunitaire, mais aussi dans la polarisation du type de réponse

immunitaire obtenue suite à la vaccination. Ainsi, trouver le bon adjuvant parmi l'éventail de choix disponible en médecine vétérinaire [9, 10], relève un second défi en recherche d'un vaccin contre *S. suis*.

Le développement de la réponse immunitaire adaptative débute par la reconnaissance des pathogènes par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Ces cellules vont ensuite migrer jusqu'aux organes lymphoïdes afin de présenter l'antigène aux lymphocytes T « helper » (Th), qui, grâce à l'action de cytokines spécifiques, se différencient en lymphocytes Th1, Th2, Th17 ou T régulateurs et vont directement influencer la réponse humorale déclenchée par l'activation des lymphocytes B (ce projet de recherche portera principalement sur les lymphocytes Th1 et Th2). La cellule dendritique (DC) est une puissante CPA. Les adjuvants et les antigènes compris dans un vaccin sont les principales cibles des DCs et modulent aussi directement leur activation. Les DCs peuvent fortement influencer le développement de la réponse immune adaptative par l'expression de cytokines spécifiques du type 1 ou du type 2. En effet, les cytokines de type 1 sécrétées par les DCs, soit IL-12 et TNF- $\alpha$ , influencent la production d'anticorps de type 1 par les cellules B (à savoir IgG2 et IgG3) [11, 12]. Alors que la sécrétion d'IL-6 et d'autres cytokines Th2, stimulent la production d'anticorps de type 2 par les cellules B (soit IgG1) [13] et inhibent le développement de la réponse de type 1 [14]. Chez la souris, les anticorps de type 1 possèdent une fonction opsonisante et permettent d'éliminer les bactéries encapsulées et extracellulaires (tel que *S. suis*) par opsonophagocytose [3]. Chez le porc, les fonctions des anticorps sont moins bien décrites. Néanmoins, les IgG2 semblent être plus opsonisants que les IgG1 [15]. Ainsi, il a été suggéré qu'un adjuvant de type 1 serait requis pour la composition d'un vaccin contre *S. suis*. En effet, les anticorps opsonisants générés par une réponse immunitaire adaptative de type 1, sont principalement requis pour garantir une élimination par opsonophagocytose de *S. suis* [3]. Partant de ces faits, la recherche d'un vaccin contre *S. suis* requiert un temps long, engendrant des coûts élevés et l'utilisation de nombreux animaux afin d'étudier les différentes formulations de vaccins possibles.

Ainsi, malgré de nombreux essais d'immunisation avec différents types de préparations vaccinales, le développement d'un vaccin protecteur contre *S. suis* représente encore un défi à l'heure actuelle. Les vaccins sous unitaires semblent être le type de vaccination le plus prometteur, mais encore faut-il trouver une protéine immunogénique exprimée sur la totalité des souches virulentes de *S. suis*. En outre, plusieurs protéines immunogéniques pourraient faire l'objet d'une vaccination en vue de garantir une protection universelle contre *S. suis*. Un choix judicieux d'un adjuvant sécuritaire et favorisant le développement d'anticorps opsonisants devra compléter la formulation du vaccin.

- Dans cette optique, étudier l'interaction entre les composants d'un vaccin et les DCs serait utile pour mieux comprendre la réponse immunitaire engagée par différents candidats vaccinaux en formulation avec divers adjuvants. C'est pourquoi **l'hypothèse** de ce projet de maîtrise est la suivante : l'analyse des différents candidats vaccinaux grâce à la culture *in vitro* de DCs porcines réduit le nombre d'animaux utilisé en recherche préclinique en délivrant des connaissances immunologiques sur les différentes formulations de vaccins testés, et permet d'effectuer une présélection des différentes formulations à expérimenter *in vivo* chez l'hôte naturel.
- **L'objectif général** de ce mémoire est de développer un modèle *in vitro* pour permettre d'étudier la réponse immunitaire de plusieurs candidats vaccinaux de *S. suis* et l'effet polarisant des adjuvants.
- **Les objectifs spécifiques** sont :
  - Comparer le profil cytokinaire induit par des adjuvants de différentes catégories et initiant, en principe, différentes réponses immunitaires (type 1, type 2 ou mixte). Pour ce faire, nous avons étudié : un ligand de 'Toll-like receptor' (TLR), le Poly I:C) ; une saponine, le Quil A® ; un adjuvant composé de sels minéraux, l'Alhydrogel 2%® ; et deux adjuvants huileux, le TiterMax Gold® et le Stimune®.

- Évaluer la capacité de différents antigènes de *S. suis* à activer les DCs porcines *in vitro*. Un choix d'antigènes de natures variées de *S. suis* ont été sélectionnés pour développer ce modèle : l'énolase, un glycoconjugué reliant la CPS de *S. suis* sérotype 2 avec une protéine porteuse (la toxoïde tétanique [TT]) ; la CPS seule, et deux bactérines préparées à partir des souches phénotypiquement différentes.

➤ **Les retombées scientifiques obtenues sont :**

L'utilisation de différents adjuvants et d'antigènes de nature diverse a permis d'évaluer la capacité de DCs *in vitro* à distinguer la polarisation de la réponse immunitaire induite par ces adjuvants, ainsi qu'à comparer leur efficacité lorsqu'ils étaient en combinaison avec des antigènes de différentes natures.

## **II. Revue de littérature**

# 1. *Streptococcus suis*

## 1.1. Microbiologie générale

*S. suis* est un important pathogène porcin, il est d'ailleurs la cause des pertes économiques importantes dans l'industrie porcine. Chez le porc, *S. suis* est principalement à l'origine de méningite et septicémie, mais peut aussi être responsable d'endocardite, d'arthrite et de pneumonie. Ce pathogène est également un agent zoonotique étant à l'origine de méningite, septicémie et de choc septique chez l'homme. D'un aspect microbiologique, *S. suis* est une bactérie encapsulée gram positive (**Figure 1**), anaérobie facultative se retrouvant seule, en paires ou en courtes chaînes de formes ovoïdes ou sphériques. Après une croissance à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>, cette bactérie se distingue par des petites colonies grises α-hémolytiques sur gélose agar au sang de mouton [16].



**Figure 1.** Image de *S. suis* sérotype 2 par microscopie électronique [17].

## 1.2. Les sérotypes et 'sequence types' de *S. suis*

### 1.2.1. Les sérotypes

*S. suis* est une bactérie phénotypiquement et génotypiquement hautement diversifiée, composée de 35 sérotypes décrits selon les différences antigéniques de leurs capsules polysacchariques (CPS), dont au sein de ces derniers, de nombreuses variantes (souches) sont différenciées selon l'expression de facteurs et de gènes de virulence [18].

D'un point de vue historique, les premiers cas de méningo-encéphalites ont été diagnostiqués chez des porcs en 1950 par Jansen et van Dorssen, où des streptocoques  $\alpha$ -hémolytiques ont été isolés [19]. À partir de ceux-ci, les premiers sérotypages réalisés par de Moor entre 1956 et 1963, ont révélé des nouveaux groupes Lancefield R, S, RS et T [20]. Par la suite, Windsor et Elliot ont renommé les *S. suis* appartenant aux groupes S et R en sérotypes 1 et 2 respectivement. Le groupe RS montre une réaction croisée avec les antisérums du sérotype 1 et 2, et a donc été appelé sérotype 1/2. Quant au groupe T, il a été désigné comme sérotype 15 en 1989 [21]. Ce n'est qu'en 1987 que *S. suis* est officiellement reconnu comme étant une nouvelle espèce de *Streptococcus*. En effet, ce pathogène est génétiquement distinct des autres streptocoques et ne possède pas de relation avec ces derniers [22]. Entre 1983 et 1995, 32 nouveaux sérotypes ont été décrits. Ces derniers ont été isolés de porcs sains (sérotypes 17, 18, 19 et 21) ou malades, mais aussi d'autres espèces contaminées, tels que des veaux (sérotypes 20 et 31), des agneaux (sérotype 33) et l'homme (sérotype 14) [23]. Cependant, d'après des analyses biochimiques de leurs génomes (analyses des séquences des ARNr 16S et du gène de ménage *cpn60*, conservés dans toutes les espèces de bactéries), les sérotypes 34 et 35 sont éloignés génotypiquement des autres sérotypes et sont donc remis en question quant à leur appartenance à l'espèce de *S. suis*. En effet, leurs ADNs et leurs profils biochimiques sont similaires à ceux du *Streptococcus orisratti*, un streptocoque isolé des dents de rat [24]. Récemment, la taxonomie et la sérotypie de *S. suis* a été révisée, et d'autres sérotypes de *S. suis*, soient le 20, 22, 26, 32 et 33, semblent aussi être génétiquement éloignés de l'espèce *S. suis* [25].

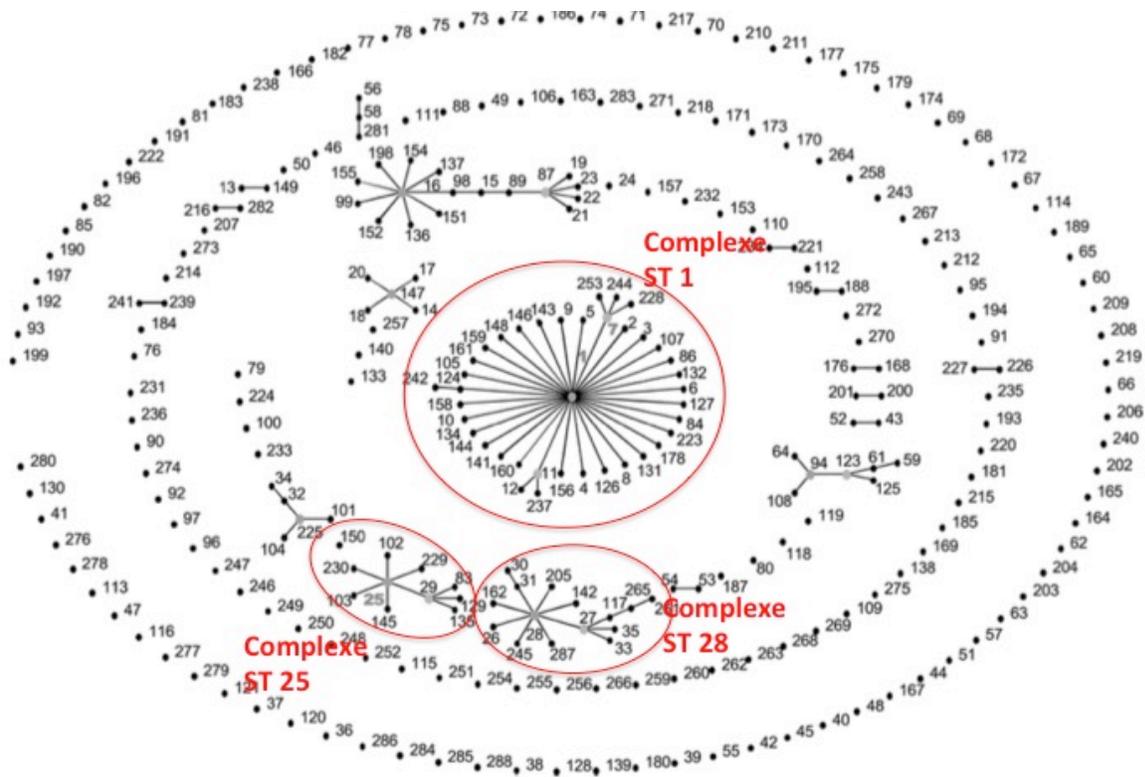
La détermination des sérotypes peut se dérouler grâce à plusieurs méthodes telles que la co-agglutination, la précipitation capillaire, la réaction capsulaire de Neufeld ou encore par PCR. La co-agglutination est le test le plus utilisé dans les laboratoires en Amérique du Nord [18, 26, 27]. Le sérotypage par méthode PCR est basé sur l'amplification des gènes codant pour la CPS des 35 différents sérotypes. Cependant, ce test est incapable de distinguer les sérotypes 2 et 14 des sérotypes 1/2 et 1, respectivement. Ces observations suggèrent que les souches appartenant à ces sérotypes ne contiennent pas de gène unique codant pour leurs CPSs. Il est donc recommandé d'utiliser des antisérums spécifiques afin de différencier ces sérotypes [18].

Plusieurs sérotypes présentent des réactions croisées indiquant des déterminants antigéniques en commun, tels que le sérotype 1/2 avec les sérotypes 1 et 2, le sérotype 6 avec le 16, le sérotype 2 avec le 22, et le sérotype 1 avec le 14. Ces réactions croisées sont probablement dues à des structures similaires ou épitopes communs entre les CPSs de ces sérotypes [18].

Des souches dépourvues de CPS peuvent aussi être rencontrées, dont leur appartenance à un sérotype ne peut être déterminée par méthode de co-agglutination. En effet, des souches non-typables, ayant perdues leurs CPSs par des délétions ou insertions au niveau des gènes codant pour la CPS appartenant originellement aux sérotypes 2 et 1/2, ont été isolées de cas d'infections chez l'homme au Japon [18]. L'isolement des souches non-typables peut aussi s'expliquer par la présence d'un nouveau sérotype jamais répertorié, ou par la présence de souches non-encapsulées ayant perdues leurs CPSs suite à la culture ou à l'entreposage, mais possèdent toujours le locus *cps* intact [18].

### 1.2.2. 'Sequence types'

Tel que mentionné, les souches au sein d'un même sérotype possèdent une diversité génotypique et phénotypique très marquée. Ainsi, différentes 'sequence types' (ST) ont été identifiées grâce au séquençage multilocus (MLST : « multilocus sequence typing »). La MLST compare des gènes de ménage (« housekeeping genes »), exprimés par toutes les souches, qui sont responsables de la maintenance des fonctions cellulaires. Les souches sont ensuite classées en ST en fonction de la similarité présente au niveau des séquences nucléotidiques des gènes de ménage. L'avantage de la MLST est que les données des séquences sont publiques et peuvent donc être comparées entre les laboratoires [18, 26, 28]. Pas moins de 288 STs ont été dénombrés au sein du sérotype 2 [29] et sont classés en complexes STs selon leurs similarités identifiées au sein de leurs génomes. Trois complexes STs dominant, soient le ST1, ST25 et ST28, tels qu'illustrés dans la **Figure 2** ci-dessous [28, 29].



**Figure 2.** Les STs et complexes ST appartenant à *S. suis* sérotype 2, identifiés par MLST.

Les complexes STs dominant la population de *S. suis* sérotype 2 sont entourés en rouge [29].  
 ST : « sequence type » ; MLST : « multilocus sequence typing »

Les souches retrouvées dans le complexe ST1 sont décrites comme les plus virulentes et les plus invasives chez le porc et l'homme. Les ST1 et ST7 sont les principaux STs isolés de cas de méningites, septicémies et arthrites et expriment les gènes *ef*, *mrp* et *sly*, hypothétiquement considérés comme des marqueurs de virulence [28, 30]. Ces souches sont retrouvées fréquemment en Europe et en Asie chez les porcs malades et cas humains (**Figure 3**) [26, 28, 30]. Les ST25 et ST28 représentent les principaux STs retrouvés en Amérique du Nord et sont considérés moins virulents (**Figure 3**). Cependant, des différences dans la virulence des souches appartenant au même ST ont également été révélées. En effet, les souches ST28 sont souvent isolées de porcs malades en Chine et au Japon, et au moins quatre cas humains associés au ST28 ont été signalés en Thaïlande et au Japon [26, 28, 30].



**Figure 3.** Distribution mondiale des plus importantes 'sequence type' (ST) de *S. suis* sérotype 2 isolés des porcs malades et/ou des cas d'infection chez l'homme [18].

### 1.3. Épidémiologie porcine et humaine de *S. suis*

#### 1.3.1. Épidémiologie porcine

Selon une étude répertoriant les cas cliniques de *S. suis* chez le porc à travers le monde entre 2002 et 2013, il s'est avéré que le sérotype 2 est le plus fréquemment isolé (28%), suivi du sérotype 9 (19%) et 3 (16%). Cependant, la distribution et la prédominance de ces sérotypes varient selon les pays, tel qu'indiqué dans le **Tableau I** ci-dessous [18].

**Tableau I.** Distribution mondiale des sérotypes les plus fréquemment isolés chez les porcs infectés par *S. suis*, et le nombre de cas cliniques porcins recensés entre 2002 et 2013 [18].

Pays	Sérotypes (fréquence en %)			Cas cliniques recensés (fréquence en %)
	2	3	1/2	
<b>Amérique du Nord</b>	2 (24%)	3 (21%)	1/2 (13%)	<b>3162 (67%)</b>
<b>Amérique du Sud</b>	2 (58%)	1/2 (10%)	14 (8.8%)	<b>125 (2.7%)</b>
<b>Europe</b>	9 (61%)	2 (19%)	7 (7%)	<b>765 (16%)</b>
<b>Asie</b>	2 (44%)	3 (12%)	4 (6%)	<b>659 (14%)</b>

D'après cette même publication, il a été constaté que les études portant sur le diagnostic de *S. suis* chez le porc sont peu présentes dans la majorité des pays à forte production porcine. En

effet, presque 70% des études sur la distribution des sérotypes de *S. suis* à travers le monde appartiennent à l'Amérique du Nord [18]. Alors qu'en Asie, pays où deux graves épidémies humaines ont eu lieu (voir le **Tableau II** dans section suivante), seulement 14% des données disponibles portent sur les études des cas cliniques porcins, et ce, uniquement en Chine et en Corée du Sud [18]. Également, en Amérique du Sud les cas cliniques porcins recensés proviennent du Brésil, pourtant des cas humains ont été diagnostiqués dans plusieurs autres pays de ce continent, mais aucune donnée n'est disponible sur les porcs [18]. Enfin, en Europe le dernier cas clinique porcin enregistré remonte à l'an 2000 [18]. Seulement l'Espagne et les Pays-Bas possèdent des données récentes sur les porcs malades. En 2002, une étude démontre que le sérotype 1 est dominant en Belgique et au Royaume-Uni, cependant il n'est pas clair si ces données sont toujours d'actualité. De même qu'observé en Asie, des cas humains sont recensés en Europe, cependant peu ou pas d'études épidémiologiques sur les porcs infectés sont disponibles [18]. Enfin, en Nouvelle-Zélande et en Australie, il y a aussi un manque de données sur la distribution des sérotypes, et de rares parutions des données cliniques sur les porcs malades sont rapportées [18].

→ En conclusion de ces observations, certains pays, avec une forte production porcine et nombreux cas cliniques humains, démontrent peu de données disponibles sur les cas de porcs malades. Il y a donc un réel manque de rigueur sur le diagnostic et sur l'étude épidémiologique de la distribution des sérotypes. Ceci pose problème pour le développement de stratégies de prévention, tels que des vaccins [18].

### 1.3.2. Épidémiologie humaine

Un total de 1642 cas cliniques humains sont rapportés mondialement jusqu'en 2013, et sont causés principalement par le sérotype 2 (76%) suivi de loin par le sérotype 14 (2%). Comme il est décrit dans le **Tableau II** ci-dessous, ces données sont répertoriées principalement en Asie [18].

**Tableau II.** Distribution mondiale des sérotypes les plus fréquemment retrouvés dans les cas de zoonoses par *S. suis*, et le nombre de cas cliniques humains recensés entre 2002 et 2013 [18].

<b>Pays</b>	<b>Sérotypes</b> (fréquence en %)		<b>Cas cliniques recensés</b> (fréquence en %)
<b>Amérique du Nord</b>	<b>2</b> (88 %)	<b>14</b> (13 %)	<b>8</b> (0,5 %)
<b>Amérique du Sud</b>	<b>2</b> (22 %)	<b>14</b> (0 %)	<b>9</b> (0,5 %)
<b>Europe</b>	<b>2</b> (60 %)	<b>14</b> (2 %)	<b>140</b> (9 %)
<b>Asie</b>	<b>2</b> (77 %)	<b>14</b> (2 %)	<b>1481</b> (90 %)

Le premier cas clinique humain a été rapporté au Danemark en 1968, et de nombreux autres cas sont apparus ensuite. Ainsi, le Royaume-Uni (en 1983) et la France (en 1995), instaurent des législations sur la l'industrialisation des porcs considérant les infections par *S. suis* comme une maladie professionnelle à déclaration obligatoire. Par conséquent, les cas de zoonoses sont moins fréquents dans ces deux pays. En effet, les dernières données recensées datent de 1995 et 2001 pour la France et le Royaume-Uni, respectivement [18].

Tel qu'indiqué dans le **Tableau II**, la majorité des cas humains sont diagnostiqués en Asie, et particulièrement en Chine (durant les deux grandes épidémies de 1998 et 2005), au Vietnam et en Thaïlande. Les cas de zoonoses en Asie sont importants pour des raisons épidémiologiques particulières, s'expliquant, entre autres, par une forte densité de porcs et de fermes d'élevage porcin, ainsi que la pratique de l'abattage à domicile sans mesure de protection et d'hygiène. *S. suis* se transmet chez l'espèce humaine par voie cutanée (par des lésions au niveau de la peau) ou par voie orale (par ingestion). Conséquemment, les personnes se retrouvent directement en contact avec la viande de porc contaminée sont à risque. En effet, les nombreux cas humains recensés en Thaïlande et au Vietnam s'expliquent par la culture culinaire. Dans ces deux pays, il est coutume de consommer de la viande de porc crue ainsi que du sang de porc, ce qui est rare en Chine. Les consommateurs se retrouvent donc directement en contact avec *S. suis* non tué par la cuisson [18].

En Amérique du Nord, la situation est différente. De nombreuses études publiées portent sur les cas de porcs malades, mais quelques rares données sont disponibles sur les cas humains. Ceci peut s'expliquer par les différences dans les niveaux de virulence des souches selon la

répartition géographique. En effet, comme vu dans la section 1.2.2, les souches au sein du sérotype 2 sont classées en ST, et chaque ST possède des niveaux de virulence différents. En effet, les STs isolés en Amérique du Nord, soit le ST25 et le ST28, ont un potentiel de virulence moins élevé que le ST1. Ceci pourrait être une raison quant au faible nombre des cas de zoonose rapportés dans ce continent [18]. Finalement, de rares cas sont recensés en Amérique du Sud et en Océanie, malgré une production porcine élevée [18].

### 1.3.3 Transmission, signes cliniques et traitements

La transmission de *S. suis* chez le porc peut se dérouler à la fois verticalement et horizontalement. Durant la mise-bas, le porcelet naissant peut s'infecter via le tractus génital de la truie (transmission verticale), ou la contamination peut se faire après la naissance par contact avec d'autres porcelets de la portée ou des porcs plus âgés, mais aussi par contact avec les structures environnantes souillées (transmission horizontale) [31]. Il est essentiel de préciser que ce n'est pas tous les porcs colonisés par *S. suis* qui développeront la maladie. En effet, *S. suis* fait partie de la flore du système respiratoire supérieur (particulièrement au niveau des amygdales et des cavités nasales), du système intestinal et génital du porc. De nombreux sérotypes de *S. suis* peuvent se loger pendant une longue période dans les amygdales sans causer de maladie [23]. En effet, la majorité des porcs ne développeront jamais d'infection. Ces derniers sont appelés des porteurs sains. Alors que d'autres développeront une bactériémie qui amènera à des septicémies, méningites ou d'autres manifestations cliniques de la maladie. Le développement de la maladie peut se faire à tout âge, mais particulièrement entre 5 et 10 semaines d'âge lorsque l'immunité maternelle diminue et rend le porcelet vulnérable aux infections [22].

Plusieurs facteurs peuvent jouer un rôle dans le développement d'une infection au sein d'une ferme. Ceux-ci incluent le statut immunitaire du troupeau, des infections concurrentes (telles que les infections virales), la qualité de l'environnement, et d'autres facteurs de la ferme qui peuvent être surveillés pour réduire l'apparition de la maladie, par exemple une surpopulation dans un endroit clos, une ventilation défectueuse, ou encore des variations excessives de la température sont des facteurs importants de stress qui peuvent être impliqués dans le début de l'infection par *S. suis* [22].

Le premier signe clinique observé est l'augmentation de la température rectale accompagnée par une bactériémie détectable ou une septicémie prononcée qui persistent si le traitement n'est pas fait à temps. Durant cette période, il est souvent observé une fluctuation de la fièvre, une diminution de l'appétit, une dépression ou une boiterie (signe d'arthrite). Le développement d'une méningite peut être observé et diagnostiqué par plusieurs signes cliniques, par exemple, une posture inhabituelle, des convulsions, ou encore un rougissement des muqueuses. L'infection peut aussi être diagnostiquée par des lésions microscopiques prédominantes au niveau du cerveau. Elles se traduisent par une méningite neutrophilique, une hyperémie des vaisseaux sanguins méningiques, une encéphalite, un oedème et une congestion du cerveau. Enfin, les manifestations cliniques les plus rares sont des endocardites [22].

Les différences phénotypiques et génotypiques des souches et des sérotypes de *S. suis* selon la répartition géographique influencent aussi sur l'apparition de signes cliniques. Par exemple en Amérique du Nord, les porcs infectés par *S. suis* développent fréquemment des endocardites. Alors qu'en Europe, la majorité des cas diagnostiqués se sont avérés des méningites ou des septicémies [22].

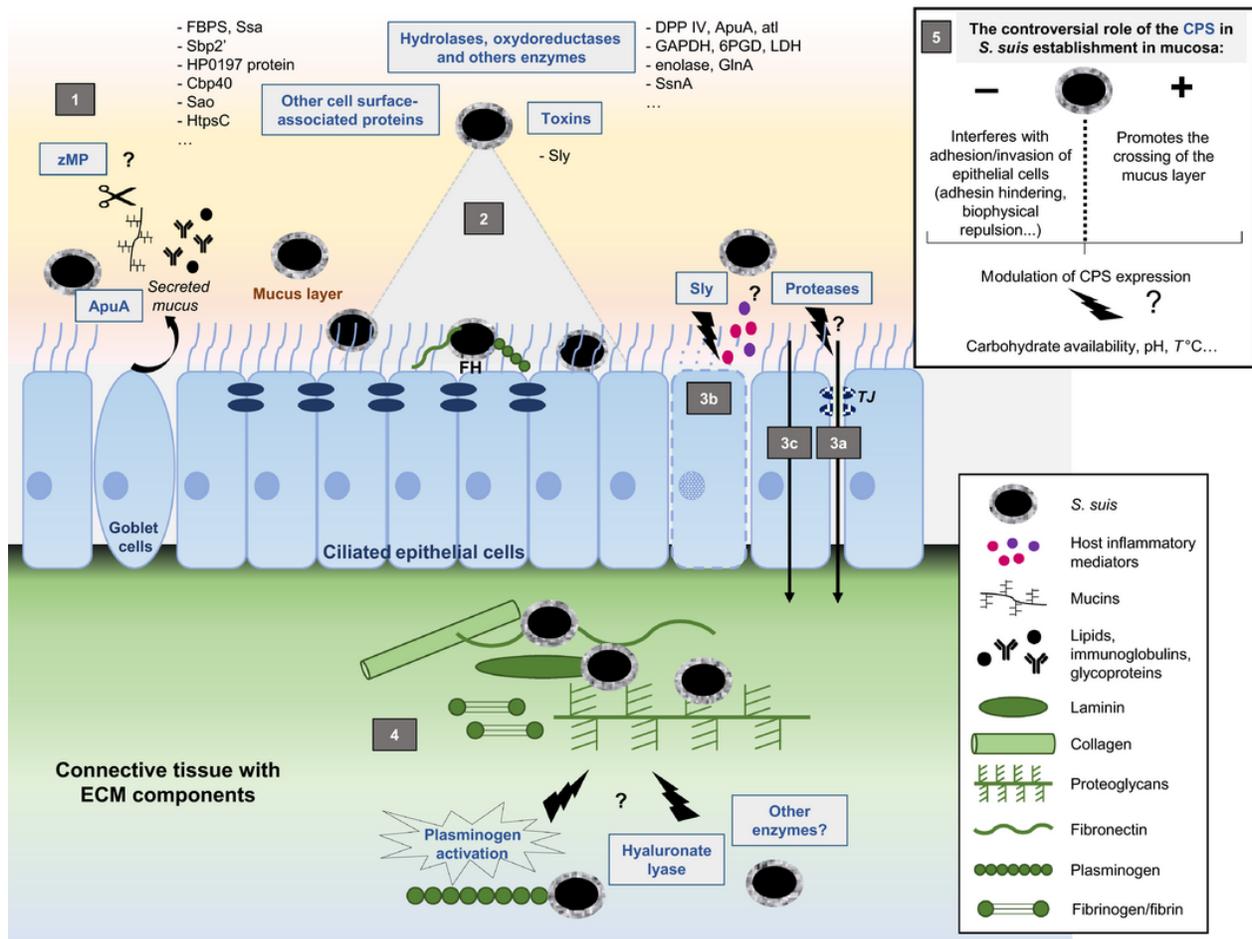
Le traitement est basé sur l'administration des antibiotiques lorsqu'il débute tôt. Plusieurs antibiotiques peuvent être utilisés, tels que l'ampicilline, ceftiofur, tiamuline, thimethoprime et sulfonamide. De plus, la plupart des souches sont sensibles aux  $\beta$ -lactamines étant les antibiotiques de choix. Les antibiotiques peuvent aussi être additionnés d'un produit anti-inflammatoire dans les cas de méningite. Dans un but prophylactique, des aliments médicamenteux sont administrés après le sevrage afin de prévenir la maladie chez les porcelets [22].

## **1.4. La pathogenèse et les principaux facteurs de virulence de *S. suis* sérotype 2**

### **1.4.1. La pathogenèse de *S. suis***

Les études du mécanisme d'infection de *S. suis* ont été réalisées à partir du sérotype 2 et concernent principalement la septicémie et le développement de la méningite. Cependant la pathogenèse de cette infection n'est que pauvrement connue [31].

Chez le porc, la principale porte d'entrée de *S. suis* est le système respiratoire supérieure. Tel que mentionné précédemment, *S. suis* se retrouve principalement dans les amygdales palatines et pharyngées et survit dans celles-ci en faible quantité, pendant une longue période en échappant à la surveillance immunitaire, sans induire de signes cliniques chez le porc [32, 33]. Les mécanismes impliqués durant cette phase de la colonisation restent cependant peu connus [33]. Il est supposé que *S. suis* se logerait dans les cryptes du tissu lymphoïde formées au niveau de la surface épithéliale des amygdales palatines et permettrait au pathogène d'échapper à la première ligne de la défense immunitaire au niveau des muqueuses. Par la suite, *S. suis* adhère et pénètre à travers la barrière épithéliale afin d'atteindre la circulation sanguine [32, 33]. Cette étape se réalise grâce à de nombreuses protéines exprimées à la surface de *S. suis* ou sécrétées. La **Figure 4** ci-dessous illustre les multiples façons utilisées par *S. suis* pour l'adhésion et l'invasion des cellules épithéliales [32].



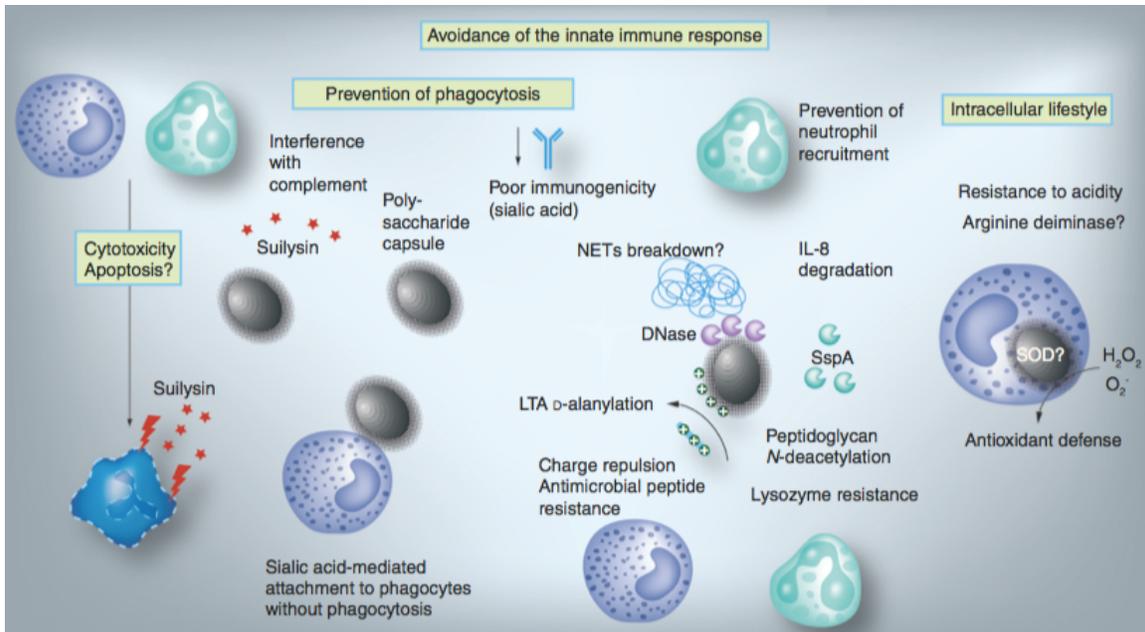
**Figure 4.** Interaction de *S. suis* avec les cellules épithéliales et les composants de la matrice extracellulaire [33].

(1) Le mucus sécrété par les cellules calciformes ('Goblet cells') constitue la première barrière mucosale rencontrée par *S. suis*. *In vitro*, il a été démontré que *S. suis* adhère à la mucine grâce au facteur d'adhésion ApuA ; cependant la capacité de *S. suis* à cliver (par exemple, grâce à une métalloprotéase: zMP) et à pénétrer la couche de mucus n'a jamais encore été étudiée. (2) Différentes adhésines ont été décrites permettant l'adhésion de *S. suis* aux cellules épithéliales, aux composants de la matrice extracellulaire, ou encore à d'autres composants de l'hôte (tels que le facteur H [FH] ou le plasminogène, par exemple). Ces adhésines sont des protéines exprimées à la surface de *S. suis*, des toxines sécrétées ou encore des enzymes telles que des hydrolases, des ligases, des oxydoréductases, etc. (3) Les mécanismes d'invasion des cellules épithéliales de la barrière mucosale demeurent peu connus. Cependant, certains modèles ont été proposés : (3a) les protéases de *S. suis* induiraient la rupture des jonctions serrées (TJ) de l'épithélium et permettraient ainsi la translocation de la bactérie. (3b) La suilysine, une toxine sécrétée par *S. suis*, endommage les membranes cellulaires et permettrait l'invasion du pathogène. Des médiateurs de l'inflammation sécrétés par les cellules épithéliales en réponse à *S. suis* peuvent aussi induire des dommages aux membranes cellulaires et ainsi jouer un rôle dans l'invasion de *S.*

*suis*. (3c) *S. suis* pourrait aussi utiliser la voie transcellulaire pour envahir les cellules. (4) La dégradation des composants de la matrice extracellulaire par des activités enzymatiques initiées par *S. suis* (par exemple, la ‘hyaluronate lyase’) ou l’activation du plasminogène, peuvent aussi faciliter l’invasion et dissémination de *S. suis*. (5) *S. suis* serait capable de moduler l’expression de sa propre CPS, en réponse à certains facteurs environnementaux ou selon la phase de colonisation, et améliorerait l’adhésion et/ou l’invasion de *S. suis*. Cependant, ce mécanisme est encore controversé.

DPP IV, ‘dipeptidyl peptidase IV’; ApuA, ‘amylopullulanase’; atl, ‘autolysin’; GAPDH, ‘glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase’; 6PGD, ‘6-phosphogluconate-dehydrogenase’; LDH, ‘lactate dehydrogenase’; GlnA, ‘glutamine synthetase’; SsnA, ‘surface- anchored DNA nuclease’; Ssa (FBPS), ‘fibronectin(/fibrinogen) binding protein’; Sbp2, ‘major truncated pilin subunit’; Cbp40, ‘collagen type I-binding protein’; Sao, ‘surface antigen one’; HtpsC, ‘type II histidine triad protein’ ; ECM, composants de la matrice extracellulaire.

Après avoir franchi la barrière épithéliale, *S. suis* résiste à la phagocytose et persiste à haute concentration dans la circulation sanguine, amenant à de fortes conséquences inflammatoires. Cette persistance dépend majoritairement de la CPS [32]. En effet, celle-ci lui procure un atout anti-phagocytaire qui sera décrit en détail dans la partie **1.4.2.1** de cette revue. Bien entendu, d’autres facteurs participent à l’évasion du système immunitaire. La **Figure 5** illustre les différents moyens employés par *S. suis* pour s’échapper de la réponse immunitaire.



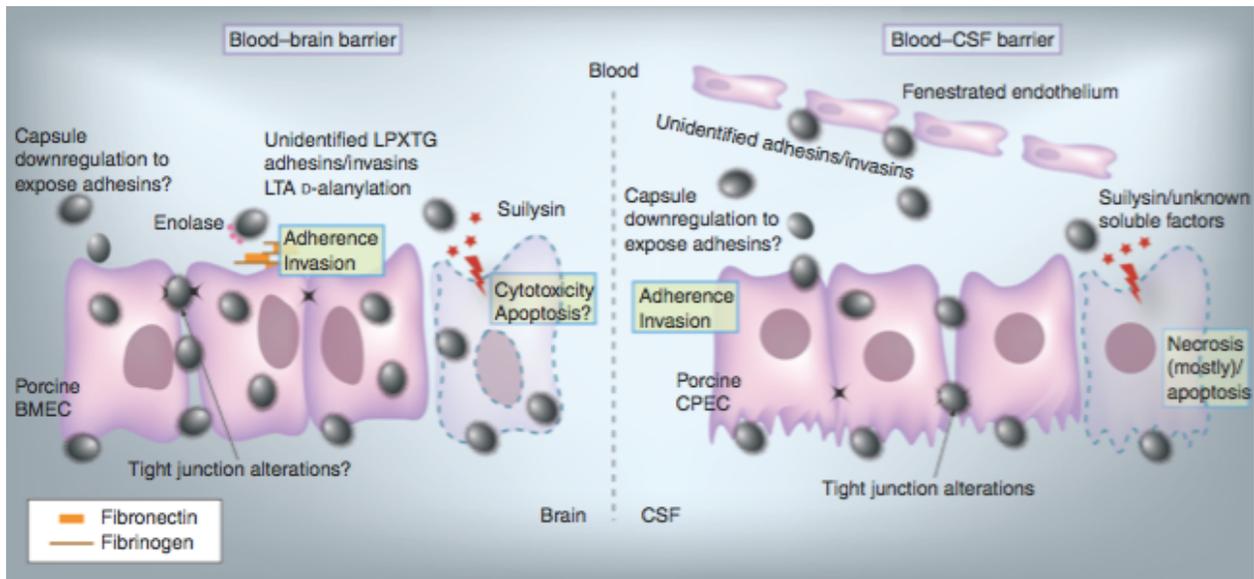
**Figure 5.** La résistance de *S. suis* à la réponse immunitaire de l'hôte après avoir passé la barrière épithéliale [32].

Il a été démontré que la capsule polysaccharidique (CPS) interfère avec la phagocytose. De plus, il est également proposé que l'attachement aux cellules peut être régulé par l'acide sialique présent dans la structure de la CPS. La *N*-déacétylation du PGN et la *D*-alanylation du LTA contribuent à la résistance aux peptides/enzymes antimicrobiens et à l'action bactéricide des neutrophiles. Une DNase produite par *S. suis* participe à la résistance de l'action des NETs. La SspA, une protéase, est capable de dégrader l'IL-8, une chimiokine importante pour l'attraction des neutrophiles. La suliyisine est toxique pour les phagocytes et interfère dans l'action du complément. Si internalisé, *S. suis* utilise l'enzyme Sod et l'arginine déiminase pour résister à l'environnement intracellulaire.

LTA, acide lipotéichoïque; NET, 'neutrophil extracellular traps'; PGN, peptidoglycane; SspA, 'surface-associated subtilisin-like protease'; Sod, superoxyde dismutase.

Une fois dans la circulation sanguine, *S. suis* peut déclencher un choc septique. Le choc septique est une conséquence d'une réponse immunitaire excessive et mal gérée. Brièvement, *S. suis* induit une surrégulation de nombreuses et différentes cytokines pro-inflammatoires par différentes cellules immunitaires, et amène au déclenchement d'une forte réponse inflammatoire [32]. En effet, selon une étude *in vivo* chez la souris, la phase septique, suite à l'infection par *S. suis*, se caractérise par des hauts niveaux de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$  et des chimiokines dans le sang, ainsi que par une forte bactériémie durant les deux premiers jours de l'infection [34].

Lorsque le choc septique n'est pas produit, *S. suis* en forte concentration dans la circulation sanguine peut atteindre les organes spécifiques, tel que le cerveau, afin d'induire une méningite. La **Figure 6** ci-dessous illustre les différents moyens employés par *S. suis* pour envahir le système nerveux central.



**Figure 6.** Invasion du système nerveux central par *S. suis* [32].

Les deux principales portes d'entrée du système nerveux central sont la barrière hémato-encéphalique (BHE) et le liquide céphalo-rachidien (CSF). Les BMECs sont les principales cellules composant la BHE. L'invasion des BMECs porcines se déroule par des adhésines/invasines, notamment le LTA, des protéines avec des motifs LPXTG et l'énolase. L'interaction avec les protéines de la matrice extracellulaire est aussi importante. La CPS interfère partiellement avec les habiletés des adhésines/invasines, impliquant donc un mécanisme possible de régulation de la CPS. La production de sulysine pourrait compromettre l'intégrité de la BHE grâce à son action cytotoxique. L'invasion et la translocation de *S. suis* à travers la barrière hémato-CSF faciliteraient le trafic de *S. suis* et des leucocytes à travers cette barrière.

BMEC, cellules endothéliales microvasculaires du cerveau; CEPC, cellules épithéliales du plexus choroïde; CPS; capsule polysaccharidique; LTA, acide lipotéichoïque

Pour envahir le système nerveux central, *S. suis* doit premièrement franchir la barrière hémato-encéphalique, qui sépare le cerveau du compartiment intravasculaire, responsable du maintien de l'homéostasie du système nerveux central. Celle-ci est composée de cellules endothéliales microvasculaires (BMEC). *S. suis* adhère à ces cellules et les envahit grâce à ses

protéines de surfaces (notamment l'énolase décrite en détail dans la partie **1.4.2.2**). Il a été démontré que *S. suis* peut survivre environ 7 heures à l'intérieur des BMECs, ce qui constituerait une étape cruciale pour le développement de la méningite, au cours de laquelle le pathogène traverserait cette barrière. Cependant, cette observation est controversée par une seconde étude démontrant que *S. suis* adhère effectivement aux BMEC, mais serait incapable de les envahir [32]. Un autre moyen d'atteindre le cerveau est de franchir la barrière séparant le liquide céphalorachidien du sang (barrière hémato-CSF), composée de cellules épithéliales du plexus choroïde (CPEC). Cette barrière joue un rôle important dans la transmigration des leucocytes ainsi que des bactéries. *S. suis* altère l'intégrité et la fonction de ces cellules et permettrait alors au pathogène et aux neutrophiles de traverser cette barrière plus facilement. De plus, il a été démontré que *S. suis* induit une nécrose des CPECs [32]. Finalement, après avoir franchi l'une ou l'autre de ces barrières, *S. suis* déclenche une forte inflammation du système nerveux central qui se traduit par la mort des cellules neuronales et par conséquent, le développement d'une méningite [32].

#### **1.4.2. Les facteurs de virulence de *S. suis***

Selon la littérature, la virulence d'une même souche de *S. suis* peut être controversée. En effet, des variations dans les modèles expérimentaux utilisés selon les études peuvent être la cause d'un manque d'uniformité sur la définition de la virulence des souches. Non seulement le modèle animal mais aussi les voies d'infection utilisées peuvent influencer la définition de la virulence établie par certaines études. Malgré ce manque d'uniformité, le sérotype 2 reste le plus virulent et il est clairement démontré qu'au sein de ce sérotype des souches virulentes et non virulentes sont présentes, s'expliquant par des variations dans l'expression de facteurs de virulence [22, 31].

Les différentes étapes de la pathogenèse de *S. suis*, décrites dans la partie précédente, emploient de nombreux facteurs de virulence, tels que des adhésines pour adhérer aux composants de la matrice extracellulaire et/ou aux cellules épithéliales et/ou endothéliales, ou encore des invasines, qui quant à elles, permettent de traverser ces barrières et d'atteindre les organes spécifiques [32]. Bien que les rôles de ces facteurs de virulence ne sont pas

complètement élucidés, notamment par le manque de mutants ‘knockouts’ disponibles [22], de nombreux facteurs de virulence potentiels ont été décrits. Le **Tableau III** ci-dessous reporte les facteurs de virulence, identifiés à ce jour, associés à la membrane ou sécrétés de *S. suis* sérotype 2, ainsi que leurs rôles dans la pathogenèse.

**Tableau III.** Les principaux facteurs de virulence putatifs, associés à la membrane ou sécrétés, exprimés par *S. suis* sérotype 2.

<b>Facteurs de virulence</b>	<b>Rôle dans la pathogenèse</b>
CPS	Faiblement immunogénique, rôle anti-phagocytaire (décrit en détail ci-dessous) [35].
Acide sialique	Résidu (N-acetyl-neuraminic acid) contenu dans la séquence des sucres de la CPS. Son rôle est peu connu. Ce résidu est impliqué dans l’adhérence aux monocytes qui permettrait à <i>S. suis</i> de circuler dans le sang en s’associant à ces cellules phagocytaires [32].
Suilyisin	Toxine sécrétée décrite comme une hémolysine de 54 kDa. Elle se lie au cholestérol des membranes des cellules épithéliales, endothéliales, ainsi qu’à divers types de cellules en provoquant leur lyse. Elle jouerait un rôle dans l’évasion du système immunitaire [36] et l’invasion des barrières épithéliales et endothéliales [31, 37]. Contribue à la résistance au complément.
MRP	Protéine associée à la membrane. Considérée comme marqueur de virulence [32]. Elle participerait à l’adhésion de <i>S. suis</i> en liant le fibrinogène [33], mais ceci reste controversé.
EF	Protéine extracellulaire considérée comme marqueur de virulence ; son rôle est encore inconnu [32].
Fbps	Protéine de surface qui adhère au fibrinogène et à la fibronectine, ainsi qu’aux cellules épithéliales. Elle est impliquée dans la colonisation des organes spécifiques, mais n’est pas nécessaire pour la colonisation initiale des amygdales [6, 32].
Enolase	Enzyme glycolytique identifiée comme protéine de surface de <i>S. suis</i> . Elle adhère aux cellules épithéliales ainsi qu’au plasminogène, à la fibronectine, au fibrinogène et à la laminine [33]. C’est aussi une protéine immunogénique (son rôle est décrit en détail ci-dessous) [6].
GADPH	Protéine de surface de 39 kDa. Elle permet l’adhésion au plasminogène et à la laminine, ainsi qu’aux cellules épithéliales de la trachée du porc [33, 38].
SspA	‘Subtilisin-like’ protéase associée à la surface de <i>S. suis</i> qui jouerait un rôle dans la modulation de la sécrétion des cytokines par les leucocytes et pourrait contribuer au développement de la méningite [39]. Elle contribue à la résistance de la bactérie aux peptides antimicrobiens et clive les chimiokines [33].
SAO	Protéine de surface de 75 kDa ayant un rôle peu connu. Elle permet à <i>S. suis</i> d’adhérer aux cellules épithéliales de la trachée du porc. Elle joue rôle mineur dans la virulence de <i>S. suis</i> , mais elle est très immunogénique [40, 41].

Sortase A	Enzyme permettant l'ancrage de protéines d'adhésion à motifs LPXTG à la surface de <i>S. suis</i> . Ces protéines (encore inconnues) jouent un rôle dans l'adhésion de <i>S. suis</i> à la fibronectine et au collagène de l'hôte. Les mutants déficients au gène codant pour la sortase A diminuent leur capacité à adhérer et à envahir les cellules endothéliales microvasculaires du cerveau du porc [43] et à adhérer aux cellules épithéliales [33].
IgA protéase	Protéine sécrétée par <i>S. suis</i> , hautement immunogénique. Elle clive les IgA sécrétoires [42]. Il a été aussi démontré que cette protéine fait partie des métalloprotéases et son rôle d'IgA protéase est contesté.
Collagenase	Enzyme faisant partie de la famille des peptidases U32 qui dégrade le collagène de l'hôte. La virulence des mutants dépourvus du gène codant pour la collagenase est partiellement atténuée chez le porc [32].
HP0197	Protéine de surface avec un motif LPXTG impliquée dans l'adhésion aux cellules épithéliales et aux glycosaminoglycanes [43].
DppIV	Protéine de surface de 85 kDa jouant le rôle de peptidase à sérine qui coupe les dipeptides X-proline à partir de l'extrémité N-terminale. Elle jouerait aussi un rôle dans l'adhésion aux cellules épithéliales de l'hôte en liant la fibronectine de la matrice extracellulaire de l'hôte [44].
6PGD	Protéine de surface de 53 kDa ayant un rôle dans l'adhésion aux cellules épithéliales de l'hôte. C'est aussi une protéine immunogénique [45].
Glutamine synthétase	Protéine de surface qui permet l'adhésion aux cellules épithéliales. Elle joue un rôle dans la colonisation des organes spécifiques tels que le cerveau, le cœur, le poumon, et le foie [46].
Fhb et Fhbp	Protéines de surface jouant un rôle dans la liaison du facteur H et favorisant l'adhésion et l'invasion des cellules épithéliales et endothéliales [47-49]. Rôle dans la résistance à l'opsonophagocytose controversé.
ApuA	Enzyme qui permet à <i>S. suis</i> d'adhérer à la mucine de la barrière mucoale de l'hôte, ainsi qu'aux cellules épithéliales de la trachée du porc [50].
IMPDH	Protéine de surface de <i>S. suis</i> jouant un rôle dans l'adhésion aux composants de la matrice extracellulaire (laminine) [51, 52].
KAR	Protéine de surface jouant un rôle dans l'adhésion à la matrice extracellulaire en se liant à la laminine [51].
FBA	Protéine de surface se liant à la fibronectine et à la laminine de la matrice extracellulaire de l'hôte, et jouerait un rôle dans l'adhésion aux cellules épithéliales de l'hôte [51].
LDH	Protéine de surface se liant à la fibronectine et à la laminine de la matrice extracellulaire de l'hôte, et jouerait un rôle dans l'adhésion aux cellules épithéliales de l'hôte [51].
EF-Tu	Protéine de surface se liant à la fibronectine et à la laminine de la matrice extracellulaire de l'hôte, et jouerait un rôle dans l'adhésion aux cellules épithéliales de l'hôte [51].
Protéines 1038, 1538 et 1868	Protéine de surface se liant au fibrinogène de la matrice extracellulaire de l'hôte [53].
atl	Protéine de surface se liant au fibronectine de la matrice extracellulaire de l'hôte, et jouerait un rôle dans l'adhésion aux cellules épithéliales de l'hôte [54].
Sbp2	Protéine de surface se liant à la fibronectine et à la laminine de la matrice extracellulaire de l'hôte [55].
HtpsC	Protéine de surface se liant à la fibronectine et à la laminine de la matrice extracellulaire de l'hôte [56].
Lmb CDS 0330	Protéine de surface se liant à la lamine de la matrice extracellulaire de l'hôte [57].

OppA	Protéine de surface se liant à la fibronectine, au collagène et à la laminine de la matrice extracellulaire de l'hôte [51, 52].
Facteur G	Protéine de surface se liant à la fibronectine et au collagène de la matrice extracellulaire de l'hôte [52].
PGK	Protéine de surface se liant à la fibronectine de la matrice extracellulaire de l'hôte [52].
PDH	Protéine de surface se liant à la fibronectine de la matrice extracellulaire de l'hôte [52].
GroEL	Protéine de surface se liant à la fibronectine de la matrice extracellulaire de l'hôte [52].
Cbp40	Protéine de surface se liant au collagène de la matrice extracellulaire de l'hôte [58].
Ssa	Protéine de surface se liant à la fibronectine de la matrice extracellulaire de l'hôte et participe à l'adhésion et l'invasion des cellules épithéliales [59].

CPS : capsule polysaccharidique ; MRP : « Muraminidase-released protein » ; EF : Facteur extracellulaire ; Fbps : « Fibronectin- and fibrinogen-binding protein » ; GADPH : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ; DppIV : Dipeptidylpeptidase IV ; 6PGD : 6-phosphogluconate-dehydrogenase ; SAO : « surface antigen one » ; SspA : « Susbitilis-like protease » ; HP0197 : « hypothetical protein 0197 » ; Fhb/Fhbp : « factor-H binding protein » ; ApuA : Amylopullulanase ; IMPDH : inosine 5-monophosphate dehydrogenase ; KAR : « 3-ketoacyl-ACP reductase » ; FBA : fructose-bisphosphate aldolase ; LDH : Lactate dehydrogenase ; EF-Tu : « Elongation factor Tu » ; Sbp2 : « putative pilin subunit » ; HtpsC : « type II histidine triad protein » ; Lmb CDS 0330 : « Laminin binding protein CDS 0330 » ; OppA : « Oligopeptide-binding protein OppA precursor » ; Facteur G : « translation elongation factor G » ; PGK : Phosphoglycerate kinase ; PDH : « Pyruvate dehydrogenase E1 component, alpha subunit » ; GroEL : « Chaperonin GroEL » ; Cpb40 : « Collagen type I-binding protein 40 » ; Ssa : « Fibronectin-binding protein » ; atl : « autolysin ».

Il existe encore de nombreux facteurs de virulence putatifs jouant différents rôles, plus ou moins décrits dans la littérature, et notamment dans le métabolisme de *S. suis* [32]. La CPS et l'énolase faisant partie de ce projet de recherche seront décrits en détail dans les parties suivantes.

#### 1.4.2.1. La capsule polysaccharidique (CPS)

La CPS est un facteur de virulence majeur qui protège *S. suis* contre la défense immunitaire de l'hôte. Tel que mentionné précédemment, la classification de *S. suis* en sérotypes est basé sur l'antigénicité de la CPS, qui est propre à chaque sérotype [35]. Malgré l'importance de la CPS et sa diversité sérotypique, seules les structures des CPS des sérotypes 1, 2, 1/2, 9 et 14 ont été décrites jusqu'à présent [60-63].



qui sont à l'origine des réactions croisées entre ces sérotypes [62]. Enfin, la structure de la CPS du sérotype 9 est très différente des quatre autres décrits ici haut. En effet, celle-ci ne contient pas d'acide sialique, mais un 4-céto-hexose (2-acétamido-2,6-didésoxy-xylo-hexopyranos-4-ulose), suivi de l'arrangement d'un phosphate et de 4 autres sucres : le rhamnose, le galactose, le glucitol [63].

Les études sur le rôle de la CPS dans la pathogenèse ont essentiellement été réalisées avec le sérotype 2. Cette CPS est décrite comme un facteur anti-phagocytaire en perturbant les radeaux lipidiques des cellules phagocytaires (dont les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques). Les radeaux lipidiques sont composés de microdomaines riches en cholestérol et sphingolipides dirigeant les signaux de transduction de la membrane. Par exemple, la lactosylceramide (LacCer), un glycosphingolipide neutre, agit comme récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires (ou PRR) reconnaissant les motifs associés aux pathogènes. De façon générale, le pathogène se liant aux LacCer présents à la membrane des phagocytes induit une accumulation de ce glycosphingolipide au point de contact et déclenche ainsi les voies de signalisation impliquées dans la phagocytose (Lyn/PI3K/p38MAPK/PKC) [35, 64]. Toutefois, il a été observé que la CPS de *S. suis* induit une déstabilisation des radeaux lipidiques et inhibe l'accumulation des LacCer au point de contact entre la membrane cellulaire et la bactérie, perturbant ainsi les voies de signalisation reliées à la phagocytose. C'est de ce fait que la CPS de *S. suis* permet d'échapper à la phagocytose par les cellules phagocytaires [35]. De plus, des expériences utilisant des mutants non encapsulés de *S. suis* ont confirmé le rôle clé de la CPS dans la capacité anti-phagocytaire de la bactérie et dans sa persistance en circulation sanguine [32, 65].

L'acide sialique, un élément présent dans la séquence polysaccharidique de la CPS du sérotype 2, permet l'attachement de *S. suis* à la surface des cellules phagocytaires de l'hôte. Ainsi, *S. suis* voyagerait dans la circulation sanguine grâce à cet attachement, ce qui contredit la théorie de « trojan horse » établie au départ pour ce pathogène (dont la définition était que les bactéries voyagent dans la circulation sanguine de l'hôte à l'intérieur des phagocytes) [35]. *S. suis* sérotype 2 utilise donc plusieurs et puissantes stratégies grâce à sa CPS pour échapper à la surveillance du système immunitaire inné afin de permettre sa survie dans la circulation sanguine

de l'hôte [35]. De plus, de par sa nature polysaccharidique, la CPS est considérée comme un antigène T-indépendant (décrit dans la section 2.5.2), ainsi l'activation optimale des lymphocytes B et/ou la commutation isotypique sont compromises et par conséquent des anticorps spécifiques contre la CPS ne sont pas ou peu produits [66]. Or les anticorps anti-CPS sont essentiels pour la défense de l'hôte contre les bactéries encapsulées, tel que *S. suis*, afin de les éliminer par opsonophagocytose [35, 41]. De plus, une étude de la réponse adaptative humorale, induite lors d'une infection par *S. suis* sérotype 2 chez la souris et le porc, a démontré une très faible réponse anticorps dirigée contre la CPS par rapport à la réponse anticorps dirigée contre les antigènes protéiques de *S. suis* [67]. Dans son ensemble, ces observations suggèrent que la CPS est un antigène faiblement immunogénique et probablement impliqué dans l'évasion immunitaire de la bactérie.

Finalement, il est nécessaire de noter que certaines souches encapsulées du sérotype 2 sont non-virulentes et, inversement, certaines dépourvues de leur CPS peuvent induire des pathologies [32]. En effet, des souches non-encapsulées ont été isolées de cas d'endocardites [68, 69]. Ceci sous-entend que la CPS n'est pas le seul facteur de virulence critique pour la bactérie.

#### 1.4.2.2. L'énolase

En plus de la CPS, *S. suis* contient de nombreuses protéines de surface décrites en partie dans le **Tableau III**, dont l'énolase.

La protéine « émolase » a été identifiée comme récepteur au plasminogène sur les cellules eucaryotes, ainsi qu'à la surface de plusieurs bactéries, *Fungi* et nématodes. Cette protéine joue un rôle important pour plusieurs Streptocoques. En effet, pour *Streptococcus pneumoniae*, l'énolase est la principale protéine qui lie le plasminogène et permet à la bactérie de transmigration à travers la matrice extracellulaire de l'hôte. Chez *Streptococcus mutans*, l'énolase est associée à l'attachement et à l'altération des vaisseaux sanguins de l'hôte. Chez les Streptocoques du groupe A, les deux résidus lysines présents à l'extrémité C-terminal de l'énolase, contribuent à la liaison au plasminogène et permettent aussi l'invasion des cellules épithéliales. L'énolase de *S. suis* possède 96% d'homologie avec celle retrouvée chez les Streptocoques du groupe A [70].

L'énolase a été identifiée chez *S. suis* en 2008 par Esgleas *et al.* [6]. Cette protéine de 52 kDa se retrouve à la surface de *S. suis* sérotype 2, ainsi que sur tous les autres sérotypes. Le mécanisme utilisé par cette protéine, pour sa translocation à la surface bactérienne, reste à ce jour inconnu. En effet, l'énolase ne contient pas de motif LPXTG (Leu-Pro-X-Thr-Gly). Or ce dernier, contenu dans la majorité des séquences protéiques retrouvées à la surface des bactéries gram-positives, permet l'ancrage de ces protéines à la surface bactérienne suite à un mécanisme de clivage par des enzymes (telles que des Sortases) [6, 71]. Bien qu'elle soit quantifiée en faible quantité à la surface de *S. suis*, sa présence est suffisante pour contribuer à la pathogénicité de la bactérie. En effet, il a été démontré que l'énolase lie plusieurs composants de la matrice extracellulaire tels que la fibronectine, la laminine, ou encore des protéines plasmatiques soient le plasminogène et le fibrinogène [6, 51, 53]. Ces composants servent de médiateurs lors du processus de colonisation du pathogène.

Le mécanisme d'internalisation de *S. suis* au sein des cellules épithéliales et endothéliales au moyen de la liaison de la fibronectine à l'énolase est encore peu connu. Il est décrit que d'une façon générale, la fibronectine se lie aux intégrines des cellules et déclenche ainsi une voie de signalisation initiant des modifications au niveau des composants du cytosquelette. La liaison de *S. suis* à la fibronectine, par le biais de l'énolase, déclencherait ainsi ce phénomène qui aurait un rôle à jouer dans la capacité de la bactérie à envahir les cellules de l'hôte. Cependant, le ou les domaine(s) de l'énolase nécessaire(s) pour sa liaison à ce composant de la matrice extracellulaire n'ont pas encore été identifiés [6, 51]. *S. suis* peut aussi se lier via l'énolase à la laminine, une glycoprotéine de la matrice extracellulaire, et constitue un autre moyen d'adhésion du pathogène [51].

Le mécanisme d'adhésion et d'internalisation via la liaison au plasminogène qu'emploie *S. suis* grâce à l'énolase a été décrit pour ce pathogène, mais aussi pour d'autres bactéries employant le même processus d'invasion [6, 72, 73]. Le plasminogène joue un rôle central dans le processus de fibrinolyse (dernière étape de la coagulation qui a pour but de dissoudre le caillot sanguin), mais aussi dans la migration des cellules eucaryotes au sein de l'hôte, notamment durant la migration des cellules blanches au site de l'inflammation en dégradant les composés de la matrice extracellulaire [72]. La liaison de l'énolase au plasminogène favorise les dommages de la matrice extracellulaire et permet à *S. suis* de migrer à travers celle-ci afin de se propager au

sein de l'organisme [72, 73]. L'énolase de *S. suis* se lie au plasminogène grâce à deux domaines de liaison comprenant des résidus lysines [6]. Le fibrinogène, outre le fait qu'il soit un facteur de coagulation, participe également à la défense immunitaire en interagissant avec les neutrophiles, améliorant ainsi le processus de phagocytose et en retardant l'apoptose de ces cellules [74]. Il a été récemment constaté que l'énolase de *S. suis* pourrait étrangement contribuer à l'évasion du système immunitaire en interférant avec le fibrinogène qui contribuerait à freiner le processus de phagocytose par les neutrophiles [53].

L'énolase de *S. suis* jouerait aussi un rôle essentiel dans la colonisation du pathogène au niveau du système nerveux central. En effet il a été démontré que cette protéine permet d'adhérer et d'envahir les BMECs [6]. L'énolase augmenterait aussi la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique et stimulerait la production d'IL-8 [75].

Finalement, l'énolase est aussi une protéine immunogénique. En effet, des anticorps dirigés contre celle-ci sont retrouvés dans le sérum des porcs en convalescences [6]. Étant immunogénique et exprimée sur la totalité des sérotypes de *S. suis*, l'énolase ferait un candidat idéal pour la vaccination contre ce pathogène, elle a d'ailleurs fait l'objet de trois tentatives d'immunisations chez la souris, discuté en détail dans la partie suivante de cette revue [7, 76, 77].

## **1.5. Les vaccins contre *S. suis***

### **1.5.1. L'immunité passive transmise de la truie aux porcelets**

Chez le porc, les anticorps maternels se transmettent par le colostrum, de la truie au porcelet principalement dans les premières 24 h après à la naissance. Cette immunité passive perdure quelques semaines après la mise-bas, et protège ainsi la progéniture des infections à leur naissance. Cependant cette immunité diminue après le sevrage des porcelets qui deviennent ensuite vulnérables aux infections, particulièrement entre 5 et 10 semaines d'âge [31, 78]. Différentes études ont démontré que l'immunité passive influence grandement l'efficacité de la vaccination de la progéniture (l'immaturation du système immunitaire du porcelet à la naissance peut aussi être une cause d'une faible réponse à la vaccination). En effet, des porcelets vaccinés dès leur naissance avec des bactérines (décrites ci-dessous) ont démontré une pauvre performance

du vaccin lorsque la truie avait été précédemment vaccinée [79]. L'effet inhibiteur des anticorps maternels sur la vaccination des porcelets a aussi été mis en évidence sur des porcelets allaités ou sevrés (provenant aussi de truies vaccinées). En effet, la réponse immunitaire initiée par le vaccin était faible et la protection face à un challenge n'était que moindre [80].

La connaissance de la cinétique des anticorps maternels est donc essentielle avant la mise en œuvre d'une vaccination. Le défi réside dans le besoin de vacciner le plus tôt possible les porcelets, tout en contrant l'immunité passive de la truie [3].

### **1.5.2. Les vaccins contre *S. suis***

Encore de nos jours, aucun vaccin universel et efficace contre *S. suis* n'est commercialement disponible et son développement est compromis par plusieurs causes, notamment par le manque de connaissance sur les mécanismes impliqués dans l'immunopathogénèse de la maladie, par la liste inachevée de la totalité des facteurs de virulence découverts, mais surtout par la diversité phénotypique et génotypique des souches de *S. suis* [3].

La majorité des résultats des essais vaccinaux demeurent controversés. Ceci peut s'expliquer par des protocoles d'immunisation qui diffèrent selon les études par plusieurs paramètres, tels que les modèles animaux, les doses et le nombre de rappels du vaccin, les voies d'administration ou encore les niveaux de virulence des bactéries utilisées lors du challenge pour évaluer la protection conférée par le vaccin [3]. Finalement, le choix des adjuvants reste empirique dans le développement de vaccins contre *S. suis* et très peu d'études comparatives de l'effet des différents adjuvants sur l'efficacité des vaccins ont été effectuées [3]. Les adjuvants seront décrits en détail dans la dernière partie de cette revue.

#### **1.5.2.1 Les vaccins utilisant *S. suis* inactivé (les bactérines)**

Les bactérines sont des bactéries entières préalablement tuées à la chaleur ou par traitement chimique. De nombreux essais de vaccination avec des bactérines ont été réalisés. Cependant, les résultats qui en découlent sont controversés. Or, ce type de vaccin est communément utilisé sur le terrain pour vacciner les porcs contre *S. suis* [81]. Il est important de

préciser que, sur le terrain, la plupart des bactérines utilisées sont « autogènes », c'est-à-dire qu'elles sont préparées à partir de la souche causant les problèmes cliniques dans une ferme porcine, pour ensuite être appliquées aux porcs présents dans cette même ferme.

Les résultats contrastants obtenus par les bactérines (soit sur le terrain ou lors des essais expérimentaux) peuvent s'expliquer par différents facteurs. Par exemple, la méthode utilisée pour préparer la bactérine peut grandement influencer l'efficacité de ce type de vaccination [82]. En effet, l'utilisation de la chaleur pour inactiver la bactérie peut dénaturer les protéines et conséquemment détruire leur pouvoir immunogénique [83]. D'autre part, un traitement chimique par le formol peut endommager les épitopes des antigènes en causant des modifications chimiques au sein des structures des protéines et des acides nucléiques. Ces traitements ont pour conséquence de diminuer l'efficacité de la bactérine [3]. Pour contrer ces difficultés techniques, une étude a utilisé un antibiotique (le ceftiofur) pour inactiver *S. suis* ; cependant la bactérine ainsi préparée a aussi démontré des résultats décevants [84]. Finalement, l'efficacité des bactérines a également été liée à la dose utilisée (une dose très élevée est généralement requise), au nombre de rappels, à la voie d'administration, ainsi qu'à l'adjuvant incorporé dans la formulation [3].

Des bactérines composées de *S. suis* dépourvues de CPS ont aussi fait l'objet d'immunisation. Du fait que la CPS masque les protéines antigéniques de surface de *S. suis*, il était donc espéré qu'une vaccination composée de bactéries dépourvues de CPS déclencherait une forte réponse immunitaire. Or, une faible protection des porcs face au challenge a été observée par rapport à l'immunisation utilisant des bactérines encapsulées. Ceci supporterait, du moins en partie, l'hypothèse que les anticorps dirigés contre la CPS sont essentiels pour l'élimination de *S. suis* [85].

Enfin, l'absence de protection hétérologue, c'est à dire une protection face à un sérotype différent ou face à une souche phénotypiquement éloignée de celle utilisée pour préparer la bactérine, reste le majeur désavantage de ce type de vaccin [86].

➔ En conclusion, dû à la quasi-absence de vaccin commercialement disponible pour lutter contre *S. suis*, les bactérines autogènes demeurent les seules présentement utilisées dans les fermes malgré les résultats mitigés [3, 81, 87].

### 1.5.2.2. Les vaccins vivants atténués

Les vaccins vivants atténués ont aussi fait l'objet de plusieurs tentatives de vaccination chez le porc contre *S. suis*. Ainsi plusieurs mutants non virulents ou des souches vivantes naturellement non pathogènes ont été testés dans des essais de protection chez le porc et la souris. Leur efficacité est toutefois controversée, et étant composés de bactéries vivantes, ces vaccins peuvent induire d'une part des risques biologiques, et d'autre part, le développement de zoonose peut advenir [3].

Des vaccins composés de mutants thermosensibles des bactéries *S. suis* sérotypes 1, 2 ou 3 ont conféré une protection contre les challenges homologues dans un modèle d'immunisation chez la souris. D'autre part, une vaccination par *S. suis* du sérotype 1/2 vivant atténué a aussi induit une protection contre des souches des sérotypes 1 et 2. À l'inverse, des vaccins vivants atténués des sérotypes 1 ou 2 ont permis de protéger la souris contre une souche challenge du sérotype 1/2. Ces observations démontrent la présence de réactions croisées entre ces 3 sérotypes [88].

D'autres études ont utilisé des mutants non encapsulés de *S. suis*. En effet, *S. suis* dépourvu de sa capsule est considéré comme moins virulent. Or, ce type de vaccination a généré qu'une protection partielle [89] ou a été un échec [85] chez le porc face à l'infection par la souche sauvage. Pour ces deux études, les titres d'anticorps qui découlaient des immunisations étaient faibles pour l'une [85], et modérés pour l'autre [89]. Les différences observées dans le niveau de protection peuvent s'expliquer par l'utilisation de différents modèles expérimentaux et/ou par les degrés de virulence des souches utilisées pour le challenge [3].

Une immunisation par *S. suis* sérotype 2 vivant dont la virulence a été atténuée par une double délétion des gènes codant pour une métalloprotéase putative (SsPep) et une protéine de surface (SsPspC) (*SsPep/SsPspC<sup>-/-</sup>*), a induit une forte réponse anticorps et a conféré une protection contre une infection par la souche mère virulente chez la souris [90]. Cependant, ce vaccin atténué à de fortes doses a révélé des effets pathologiques représentant ainsi un risque pour les animaux et pour l'homme. D'autre part, une immunisation utilisant *S. suis* sérotype 2 vivant, dont la virulence a été atténuée par suppression du gène codant pour le « serum opacity factor », a été pratiquée par voie intranasale chez des porcelets, mais reste un échec face à l'infection [91].

D'autres essais de vaccination ont utilisé des souches de *S. suis* naturellement non-virulentes, telles que la souche 1330 du sérotype 2 isolée des poumons d'un porc ayant une pneumonie [92], ou la souche 05HAS68 isolée des amygdales d'un porc sain [93]. Ces immunisations ont été effectuées chez la souris et chez le porc et ont conféré une protection qu'après deux doses [92-94]. L'utilisation des souches naturellement non virulentes représente, néanmoins, un risque biologique important.

→ En conclusion, tout comme pour les bactérines, le modèle animal, la dose, le nombre d'injections ou encore d'autres paramètres varient selon les essais avec des vaccins vivants-atténués. En effet, les doses principalement administrées chez le porc sont de  $10^9$  CFU/ml [85, 89, 94], tandis que chez la souris elles varient entre  $10^7$  et  $10^{11}$  CFU/ml [88, 90]. De plus, il est observé que deux doses de vaccin vivant atténué sont nécessaires afin d'obtenir une protection face au challenge [92-94]. Ainsi, le *but idéal* de développer un vaccin à dose unique pour le porc reste peu probable, même avec un vaccin vivant atténué [3]. Finalement, des effets secondaires ont été observés suite à l'utilisation de ce type de vaccin, tels qu'une hyperthermie, une boiterie ou des convulsions. Enfin, le risque majeur demeure le développement de zoonose chez l'homme. Une souche atténuée peut être non pathogène chez le porc, mais peut l'être pour l'homme [3].

### 1.5.2.3. Les vaccins sous-unitaires

Face aux résultats décevants obtenus avec les bactérines et les vaccins vivants atténués, une autre stratégie d'immunisation a fait surface, les vaccins sous-unitaires, afin de cibler le système immunitaire de l'hôte vers une molécule spécifique du pathogène. En effet, ces vaccins sont composés d'une partie de la bactérie, telle qu'une protéine, un fragment de la paroi cellulaire ou encore la CPS et ils ont l'avantage d'être plus sécuritaires. Cependant, en raison de la faible immunogénicité de ces composants, il est nécessaire d'ajouter un adjuvant afin d'intensifier et de diriger la réponse immunitaire. Du fait que *S. suis* soit autant diversifié phénotypiquement et génotypiquement, les recherches visent à cibler des protéines exprimées sur la totalité des souches virulentes afin de créer un vaccin universel [3, 22]. A cet effet, de nombreuses tentatives

de vaccins sous-unitaires contre *S. suis* utilisant diverses protéines ont été faites. Le **Tableau IV** ci-dessous recense la majorité des essais de vaccination contre *S. suis* utilisant des protéines de surface comme vaccin sous-unitaire [3]. Les cas particuliers de la CPS et de l'énolase seront adressés ci-dessous.

#### ◆ Vaccin sous-unitaire composé de la CPS

La CPS, comme décrite dans la partie **1.4.2.1**, est faiblement immunogénique. En effet, les sérums provenant des porcs en convalescences ou immunisés par des bactérines ne présentent qu'un très bas titre d'anticorps spécifiques dirigés contre la CPS [95]. Aussi, des immunisations avec la CPS purifiée de *S. suis* sérotype 2 ont été réalisées chez la souris et le porc, et ont démontré une faible réponse humorale dirigée contre la CPS. En effet, cette réponse anticorps est composée essentiellement d'un faible titre d'IgM, et une absence complète des IgG, sous-entendant l'absence d'une commutation isotypique [96]. Ceci s'explique par la réponse thymo-indépendante générée par des antigènes de type polysaccharidique (résumé dans la partie **2.5.2**).

Il a été intéressant de constater qu'une vaccination des truies par une bactérine a généré des anticorps dirigés contre la CPS, mais ceci n'est pas observé chez les porcelets [80]. En effet, il est bien connu que le développement d'une réponse immunitaire contre un antigène polysaccharidique est limité chez les jeunes sujets. Par conséquent l'âge des porcelets pourrait être un obstacle quant à la vaccination par la CPS [3].

Du fait que la CPS est l'antigène à la base du sérotypage de *S. suis*, elle serait considérée comme un candidat potentiel pour garantir une protection universelle contre toutes les souches comprises au sein d'un même sérotype [3]. Cependant, le défi reste à rendre la CPS immunogénique. Pour cela, une récente étude a décrit le développement d'un vaccin glycoconjugué, c'est-à-dire composé de la CPS purifiée de *S. suis* sérotype 2 liée à une protéine porteuse immunogénique (le toxoïde tétanique : TT). En effet, coupler la CPS à une protéine porteuse permet d'activer la réponse thymo-dépendante (expliquée dans la partie **2.5.1**) et donc d'améliorer l'immunogénicité de la CPS. Ce vaccin a démontré une bonne efficacité chez la souris et le porc et a induit des anticorps opsonisants et protecteurs [97].

### ◆ Vaccin sous-unitaire composé de l'énolase

L'énolase purifiée a fait l'objet de trois essais d'immunisation chez la souris [77, 98][7], mais le succès de ces dernières semble dépendre grandement de l'adjuvant utilisé dans la formulation vaccinale. En effet, deux essais d'immunisation comprenant l'adjuvant complet de Freund ont induit une protection contre l'infection chez un modèle de souris BALB/c [77, 98]. En revanche, lorsque la formulation vaccinale était composée de l'énolase et du Quil A® comme adjuvant, la vaccination ne conférait pas de protection chez la souris CD1, malgré la présence d'un titre élevé d'anticorps dans le sérum des souris immunisées [7]. Ces résultats contrastants peuvent aussi s'expliquer par le type de souris, ou par les doses de vaccin et de challenge utilisées [99].

**Tableau IV.** Différents essais de vaccination utilisant des vaccins sous-unitaires contre *S. suis*.

Protéines	Adjuvants	Modèle animal	Challenge	
			Dose et route	Protection
Suilysin	$\alpha$ -tocopherol	Souris	$1 \times 10^9$ i.p	Oui
Suilysin	$\alpha$ -tocopherol	Porcelet	$1 \times 10^9$ i.p	Oui (mais sur 3 porcs)
MRP	Water-in-oil	Porcelet	$10^7$ i.v	Non
EF	Water-in-oil	Porcelet	$10^7$ i.v	Non
MRP et EF	Water-in-oil	Porcelet	$10^7$ i.v	Oui
6PGD	ACF	Souris CD1	$2.5 \times 10^8$ i.p	Oui
6PGD	ACF	Porcelet	$1 \times 10^6$ i.v	Oui
FBPS	ACF	Souris Balb/c	$4 \times 10^7$ i.p	Non
SAO	Emulsigen	Porcelet	$5 \times 10^6$ i.p	Non
SAO	QuilA	Porcelet	$10^7$ i.n	Oui
SAO	ACF	Souris Balb/c	$2 \times 10^9$ i.p	Oui
SAO	ACF	Souris Balb/c	$1 \times 10^9$ i.p	Oui
Enolase	ACF	Souris Balb/c	$2 \times 10^9$ i.p	Oui
Enolase	ACF	Souris Balb/c	$1 \times 10^9$ i.p	Oui
Enolase	QuilA	Souris CD1	$2 \times 10^8$ i.p	Non
38kDa	ACF	Porcelet	$1,5 \times 10^6$ iv	Oui
SsnA	ACF/OW/Alhydrogel	Souris CD1	$5 \times 10^8$ ip	Oui (Alhydrogel)
HP0197	MARCOL 52	Souris Balb/c	$2 \times 10^9$ ip	Oui
HP0197	MARCOL 52	Porcelet	$10^6$ iv	Partiellement
Sat	ACF	Souris CD1	$5 \times 10^8$ ip	Partiellement
SsPepo	MARCOL 52	Souris Balb/c	$1.5 \times 10^9$ ip	Oui
SsPepo	MARCOL 52	Porcelet	$5 \times 10^6$ iv	Partiellement
6PGD	ACF	Souris CD1	$2.5 \times 10^8$ ip	Oui
6PGD	ACF	Porcelet	$1 \times 10^6$ iv	Partiellement
Lmb	ACF	Souris Balb/c	$1 \times 10^8$ ip	Non
abpb	ACF	Souris Balb/c	$1 \times 10^8$ ip	Oui
Spb	Alum	Souris Balb/c	$5 \times 10^9$ ip	Partiellement

MRP : « Muramidase-Released Protein » ; EF : facteur extracellulaire ; 6PGD : 6-phosphogluconate-déhydrogénase ; FBPS : « Fibronectin- and fibrinogen-binding protein » ; SAO : « surface antigen one » ; HP0197 : « hypothetical protein 0197 » ; Sat : « surface antigen two » ; SsPepo : « secreted metalloendopeptidase » ; SsnA : « secreted nuclease » ; Lmb : « laminin-binding protein » ; abpb : « amylase-binding protein B » ; ACF : adjuvant complet de Freund ; O/W : « oil-in-water » ; i.p : intrapéritonéale ; i.v : intraveineux.

Tous les essais d'immunisation présentés dans le Tableau IV ci-haut ont été recensés à partir de la référence [3].

➔ En conclusion, à l'image des vaccins vivants atténués et des bactéries, les protocoles des essais d'immunisation avec des vaccins sous-unitaires diffèrent selon les études par plusieurs

paramètres tels que les modèles animaux, les doses et nombre de rappels du vaccin, ou encore les modèles de challenge pour tester le niveau de protection conféré par le vaccin.

De plus, la majorité des essais étant un succès face au challenge, utilisent l'adjuvant complet de Freund connu pour induire une très forte réponse immunitaire, mais reste très toxique en provoquant de fortes lésions chez l'animal immunisé. Il est à ajouter que l'utilisation de cet adjuvant est interdite dans la majorité des pays, de par ses effets indésirables considérables pour l'animal. Enfin, certains tests de vaccination utilisent des protéines qui ne sont pas exprimées universellement par toutes les souches de *S. suis* (par exemple la suilysin, la MRP ou l'EF). Ceci n'est pas judicieux pour créer un vaccin qui induirait une protection universelle contre *S. suis* [3].

Ainsi, malgré de nombreux essais d'immunisation avec différents types de préparations vaccinales, le développement d'un vaccin protecteur contre *S. suis* représente encore un défi à l'heure actuelle. Les vaccins sous-unitaires semblent être le type de vaccination le plus prometteur, mais encore faut-il trouver une protéine immunogénique exprimée sur la totalité des souches virulentes de *S. suis*. En outre, plusieurs protéines immunogéniques pourraient faire l'objet d'une vaccination en vue de garantir une protection universelle contre *S. suis*. Un choix judicieux d'un adjuvant sécuritaire et favorisant le développement d'anticorps opsonisants devra compléter la formulation du vaccin.

## 2. La cellule dendritique et le développement de la réponse immunitaire adaptative

Le système immunitaire permet de défendre l'organisme contre des pathogènes divers. Il est composé de nombreuses cellules et de molécules composant un réseau dynamique, capable de reconnaître et d'éliminer spécifiquement un grand nombre d'organismes étrangers [100]. Il existe deux systèmes de l'immunité : l'immunité innée et l'immunité adaptative [100]. L'immunité innée fait appel à différentes cellules telles que les macrophages, les neutrophiles, les cellules « Natural Killer » et les cellules dendritiques, parmi d'autres acteurs cellulaires constituant la première ligne de défense de l'organisme contre les pathogènes. Très efficace, elle empêche dès le début la plupart des infections en éliminant la bactérie dans les quelques heures suivant son entrée dans l'organisme. Cependant cette immunité n'est pas spécialisée dans la reconnaissance des différences subtiles entre les molécules étrangères, contrairement à l'immunité adaptative. Cette deuxième ligne de défense permet d'éliminer un pathogène qui aurait échappé à l'immunité innée ou qui persiste malgré l'activation de cette dernière. L'immunité adaptative est dépendante de l'immunité innée et commence quelques jours après l'infection initiale. Une des caractéristiques importantes de l'immunité adaptative est qu'elle est capable d'établir une réponse mémoire contre un pathogène précis, c'est à dire que lors d'une deuxième infection par un même pathogène, il y aura une reconnaissance et élimination très rapide de la bactérie grâce aux cellules mémoires [100].

La cellule dendritique est considérée comme un acteur clé dans l'immunité innée et étant le cœur de ce projet de maîtrise, celle-ci sera décrite en détail, ainsi que le cheminement à partir de celle-ci jusqu'à l'activation de la réponse adaptative incluant les réponses de type humorale et à médiation cellulaire (cependant cette dernière ne sera pas décrite dans le cadre de ce projet).

## 2.1. La cellule dendritique (DC)

### 2.1.1. Généralité

Les cellules dendritiques (DCs) sont les premières cellules du système immunitaire caractérisées en 1868 par Steinman et Cohn qui, en étudiant les cellules de la rate de souris, ont découvert une population de cellules avec une caractéristique unique d'extensions cellulaires à l'image des dendrites des neurones. C'est pourquoi ces auteurs ont nommé ces cellules : les cellules dendritiques [101]. Les DCs sont formées à partir des cellules souches de la moelle osseuse et font donc partie de la lignée myéloïde (à l'exception des DCs plasmocytoïdes). Elles peuvent être résidentes et localisées dans les organes lymphoïdes primaires et secondaires, ou migratoires et localisées dans les tissus périphériques comme la peau ou les muqueuses. Positionnées de façon stratégique dans l'organisme, les DCs s'affirment comme des cellules sentinelles et capturent l'antigène grâce à de nombreux récepteurs aux pathogènes (les PRR pour « pattern recognition factor »). Ces cellules sont aussi décrites comme de puissantes cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et nommées DC conventionnelles (cDC). Le terme CPA professionnelle regroupe les cellules qui expriment les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I et II (CMH-I et II), telles que les macrophages, les DCs et les cellules B, pour présenter les antigènes aux lymphocytes T. Les DCs expriment constitutivement les molécules du CMH-I et CMH-II et possèdent une capacité supérieure à moduler l'activation des cellules T, comparé aux autres CPAs. Ainsi, les DCs font un lien solide entre l'immunité innée et adaptative. Une fois activées, les DCs sont aussi impliquées dans le développement de la réponse humorale par la sécrétion de facteurs stimulants (tels que les cytokines) qui jouent un rôle dans la prolifération, la différenciation et la commutation isotypique des lymphocytes B. Les DCs sont une population hétérogène dont la diversité fonctionnelle des sous-populations de DCs est liée à leur état de différenciation, leur localisation, ainsi que leurs différentes interactions avec les antigènes et les cellules du système immunitaire, mais possèdent toutes le même dénominateur commun : la présentation de l'antigène [100, 102]. Plusieurs sous-populations de DC porcines ont été découvertes, et seront décrites dans la prochaine section ci-dessous [103].

### 2.1.2. Les DCs porcines

Tout comme dans l'espèce humaine et murine, de nombreuses sous-populations de DCs ont été identifiées selon leurs emplacements, leurs activités et leurs phénotypes chez le porc, grâce à des anticorps dirigés contre les marqueurs de surface des cellules (CD pour « cluster of differentiation ») [103, 104]. Le **Tableau V** résume les sous-populations des DCs présentement identifiées dans l'espèce porcine.

Il existe aussi deux sous populations de DCs différenciées *in vitro* : les DCs dérivées des monocytes (MoDC pour « monocyte derived DC ») et les DCs dérivées des cellules souches de la moelle osseuse (bmDC pour « bone marrow-derived DC ») [103, 105].

#### ◆ Les MoDCs et bmDCs

Les MoDCs dérivent des monocytes en circulation dans le sang. Elles peuvent être générées par les cytokines interleukine-4 (IL-4) et le GM-CSF («granulocyte-macrophage colony-stimulating factor»). Après 3 à 7 jours de culture, des cellules non adhérentes et semi-adhérentes ayant la morphologie des DCs peuvent être récoltées. La génération des MoDCs peut aussi se faire par l'ajout de l'interféron- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ). L'addition de IFN- $\alpha$  au cocktail GM-CSF/IL-4 permet d'obtenir une amélioration de la stimulation des lymphocytes T par les DCs. Les MoDCs porcines sont reconnues par des marqueurs de différenciation spécifiques : CD1<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> CD80/86<sup>+</sup> CD172a<sup>+</sup> SLAII<sup>+</sup> [103, 105].

Le CD172a (ou encore appelé le SCW3 pour « swine workshop cluster 3 ») est exprimé sur toutes les cellules faisant partie de la lignée myéloïde du porc, et permet de différencier cette lignée. Le CD80/86 est la molécule de co-stimulation, et le SLA-II (pour « swine leucocyte antigen II») est l'équivalent au CMH-II chez l'humain [103, 105].

Les bmDCs ont un phénotype et une fonctionnalité ressemblante aux MoDCs, et peuvent être générées à partir des cellules souches de la moelle osseuse de porc (BMHC pour « bone marrow haematopoietic cells»). Pour leur différenciation en cDCs, les BMHCs peuvent être stimulées pendant 7 à 10 jours, avec du GM-CSF. Des DCs plasmacytoïdes (pDCs, cellules dendritiques productrices d'IFN- $\alpha$  et intervenant principalement dans les infections virales) peuvent aussi être obtenues grâce à la stimulation des BMHCs par un ligand Flt3. Le phénotype

des cDCs différenciées par le GM-CSF est identique aux MoDC : CD1<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> CD80/86<sup>+</sup> CD172a<sup>+</sup> SLAI<sup>+</sup> [103, 105].

#### ◆ Les DCs porcines du sang

La composition du sang porcin est similaire à celui de l'espèce humaine et représente une haute source de CPAs avec la présence de nombreuses autres cellules telles que les monocytes et les précurseurs des DCs par exemple, dont toutes ces cellules expriment le CD172a. Au sein des cellules mononuclées périphériques du sang CD172a<sup>+</sup>, une population des monocytes exprimant le CD14 domine sur la population des DCs étant dépourvue du CD14. Au sein de la population CD14<sup>-</sup>, les cellules CD4<sup>-</sup> sont identifiées comme étant des cDC, alors que les CD4<sup>+</sup> représentent les pDCs [103, 105].

#### ◆ Les DCs des muqueuses

Les sites d'entrée les plus communs des pathogènes sont les muqueuses respiratoires et intestinales. Il est donc essentiel de réguler l'immunité des muqueuses afin de discriminer les antigènes offensifs de ceux de la flore normale ou de la nourriture, au sein des muqueuses intestinales, par exemple. C'est le rôle des DCs dans les muqueuses [103]. Le phénotype des DCs varie en fonction de leur emplacement. Par exemple dans l'intestin, quatre populations de DCs ont été décrites basées sur l'expression des marqueurs CD172a et CD11R1. Dans les plaques de Peyer, les DCs sont CD172<sup>+</sup>CD11R1<sup>-</sup> ou CD172<sup>-</sup>CD11R1<sup>-</sup>. Dans la lamina propria du petit intestin les DCs sont CD172<sup>+</sup>CD11R1<sup>+</sup>. Dans le ganglion lymphatique mésentérique, les DCs sont CD172<sup>-</sup>CD11R1<sup>+</sup> [103, 105]. Le CD172a est exprimé en forte intensité sur les DCs qui se trouvent aux sites périphériques d'entrée du pathogène ainsi qu'aux sites de contact avec l'antigène tel que la peau, la lamina propria de l'intestin et les plaques de Peyer. Cependant le CD172a n'est pas identifié sur les DCs présentes dans les ganglions lymphatiques mésentériques. Ceci suggère qu'il y a une diminution de l'expression du CD172a durant le processus de maturation et de migration des DCs vers le ganglion, après avoir capturées l'antigène, par un facteur encore inconnu [103, 105].

Les DCs du tractus respiratoire porcin ont aussi été décrites. Les DCs présentes dans la muqueuse trachéale co-expriment le CD16 et SLA-II, mais pas le CD11R1. Dans les amygdales, les DCs sont identifiées CD11R1+ et CD208 + ou CD172a+ et CD11R1+ [103, 105].

#### ◆ Les DCs se situant dans la peau

Cette catégorie de DCs ressemble phénotypiquement aux DCs dérivées des monocytes (MoDCs). Les DCs de la peau sont identifiées par CD172a+/CD1+ avec un haut niveau d'expression du SLA-II et CD80/86. Elles montrent aussi une expression variable de CD11R1, CD14 et CD16 [103, 105].

#### ◆ Les DCs dans les tissus thymiques

Dans les tissus thymiques, de larges DCs sont localisées dans la région médullaire et cortico-médullaire. Phénotypiquement, elles ressemblent aux MoDCs et aux DCs de la peau de par l'expression de CD1, CD172a et SLA-II [103, 105].

**Tableau V.** Les marqueurs de différenciation (CD pour « cluster of differentiation ») des différentes populations de DCs identifiées chez le porc [103].

	CD172a (SCW3)	CD1	CD4	CD11R1	CD14	CD16	SLA-II	CD80/86
MoDC	+	+	-	-	+/low	+	+	+
GM-CSF bmDC	+	+	-	-	+	+	+	+
Flt3L bmDC	+	+	-	-	+/-	+	+	+
cDC du sang	low	+/-	-	-	-	+/-	high	+
DC glande thyroïdienne	+	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	+	n.d
DC thymus	+	+	n.d	n.d	n.d	n.d	+	n.d
DC peau	+	+	n.d	n.d	+	n.d	+	+
DC tissu muqueux	+/-	-	n.d	n.d	-	+	+	+
DC lymphatique muqueuse	+/-	+/-	n.d	n.d	n.d	+/-	+	+

MoDC : « monocyte-derived dendritic cells » ; GM-CSF : « granulocyte-macrophage colony-stimulating factor » ; bmDC : « bone marrow derived dendritic cell » ; cDC : cellule dendritique conventionnelle, pDC : cellule dendritique plasmacytoïde ; DC : cellule dendritique ; SLA : « Swine leucocyte antigen » ; Flt3L : « fms-related tyrosin kinase 3 » ; n.d : non déterminé.

## 2.2. La reconnaissance du pathogène par les DCs

Les cellules faisant partie de l'immunité innée sont capables de discriminer le soi (l'hôte) du non-soi (le pathogène) grâce à des détecteurs moléculaires qui reconnaissent des motifs structuraux variés très conservés au sein d'une espèce microbienne et généralement absents de l'hôte. Ces récepteurs, appelés récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR pour « pattern recognition receptors »), sont exprimés par les cellules de l'immunité innée et reconnaissent des motifs moléculaires particuliers retrouvés chez le pathogène, appelés motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs pour « pathogen-associated molecular patterns »).

Le groupe de PRR comporte plusieurs types de récepteurs tels que les récepteurs « Toll-like » (TLRs pour « Toll-like receptors »). Les TLRs sont des protéines transmembranaires exprimées par les cellules de l'immunité, qui détectent un répertoire distinct de molécules très conservées des pathogènes. L'antigène, une fois reconnu par les PRRs, représente un premier signal de danger et d'activation des DCs qui rentrent dans un processus de maturation identifiable par une surexpression de CMH-II, et CD80/86 et par la sécrétion de diverses cytokines [103]. Le pathogène est ensuite internalisé par les DCs pour être dégradé et présenté aux lymphocytes T via le CMH [100]. Il existe plusieurs TLRs spécialisés dans la reconnaissance des différents antigènes. Le **Tableau VI** ci-dessous recense les différents TLRs exprimés sur les DCs en générale. Cependant, tous les TLRs ne sont pas exprimés uniformément sur les différents types de DCs porcines. En effet, des études de stimulation des DCs porcines par le CpG (oligodeoxynucléotides [ODNs] exprimant des motifs CpG améthylés imitant l'activité immunostimulante de l'ADN bactérien [106]) ont révélé que le TLR9 n'était pas exprimé par les bmDCs porcines [107, 108].

Les récepteurs des DCs porcines jouant un rôle dans la reconnaissance de *S. suis* ne sont pas complètement élucidés. Des études *in vitro* sur la modulation de l'expression des TLRs suite à l'activation des DCs porcines et murines par *S. suis*, semblent conclure que le TLR2, le TLR6, le TLR9 (chez la souris) et le NOD2 (une autre type de PRR) sont requis pour la reconnaissance de *S. suis* [109, 110]. Il reste encore à déterminer les autres récepteurs impliqués dans la reconnaissance de *S. suis* par les DCs porcines.

**Tableau VI.** Les TLRs exprimés par les DCs et leurs principaux ligands [111].

TLR	Principaux ligands	Principaux pathogènes cibles
TLR1	Triacylglycérade	Mycobactéries
TLR2	Peptidoglycanes, Lipopeptides diacylés, zymosane, hémagglutinine, LTA	Bactérie, fungi, mycobactéries, parasites (Trypanosoma), virus (de la rougeole)
TLR3	ARNds	Virus à ARN
TLR4	LPS Protéines de l'enveloppe	Bactérie, virus (enéphalomyocardique, respiratoire syncytial)
TLR5	Flagelline	Bactérie flagellée
TLR6	Diacylglycérade Acide lipotéichoïde zymosane	Bactérie, mycobactérie et fungi
TLR7	ARNss	Bactérie endosomale et virus
TLR8	ARNss	Virus à ARN
TLR9	ADN, CpG oligodéoxynucléotides, hémazoïne	Bactérie, virus à ADN, parasites (plasmodium)
TLR10	Hypothèse de <i>Listeria monocytogenes</i> ?	Hypothèse de <i>Listeria monocytogenes</i> ?
TLR11	Non déterminé, molécule de type profiline	Bactérie uropathogénique, parasites ( <i>Toxoplasma gondii</i> )
TLR13	Motifs non méthylés de l'ARN ribosomal 23S	bactéries

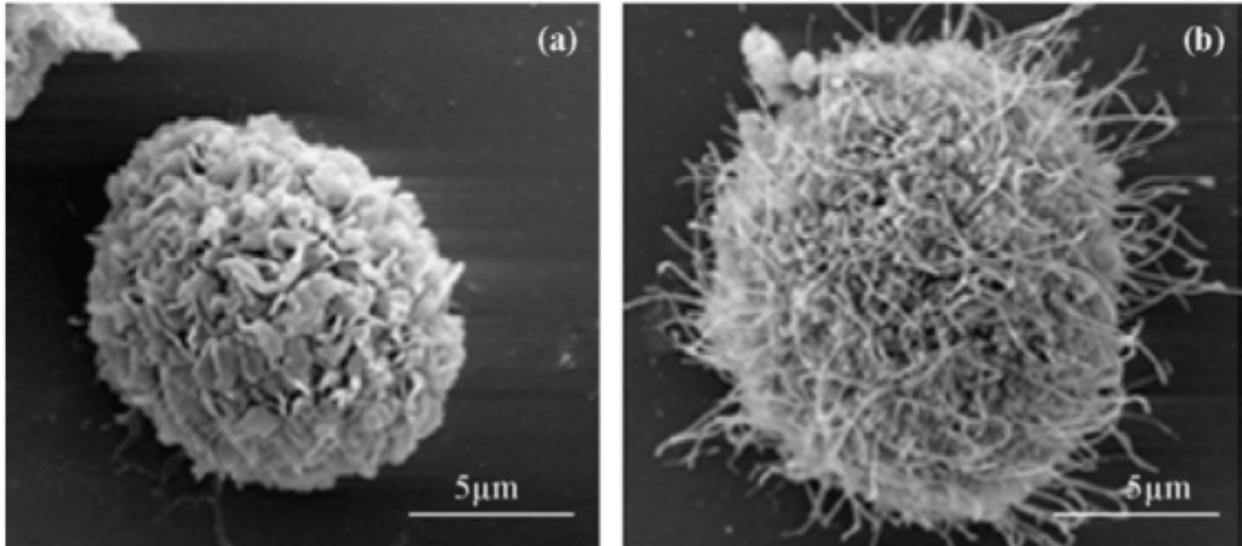
TLR : « Toll-like receptor » ; ARN : acide ribonucléique ; ds : double brin ; ss : simple brin ; ADN : acide désoxyribonucléique ; LPS : lipopolysaccharide ; LTA acide lipoteichoïque ; IFN : Interféron.

## 2.3. La synapse biologique entre la DC et les lymphocytes T helper

### 2.3.1. La maturation des DCs

Après avoir capturé l'antigène par phagocytose, endocytose ou pinocytose, les DCs passent d'un phénotype de capture d'antigènes à celui de présentatrices d'antigènes aux cellules T. Au cours de cette maturation, certaines caractéristiques sont perdues, et d'autres apparaissent. Par exemple, les capacités de phagocytose ou pinocytose sont diminuées, tandis que l'expression de CMH et des molécules de costimulation, nécessaires à la présentation de l'antigène aux lymphocytes T, augmentent significativement, comme illustrée dans la **Figure 8** ci-dessous. De plus, des molécules d'adhésion ainsi que des récepteurs pour certaines chimiokines émergent à la

surface des DCs, qui leurs permettent de migrer du site d'infection vers les organes lymphoïdes secondaires pour aller à la rencontre des lymphocytes T [100].

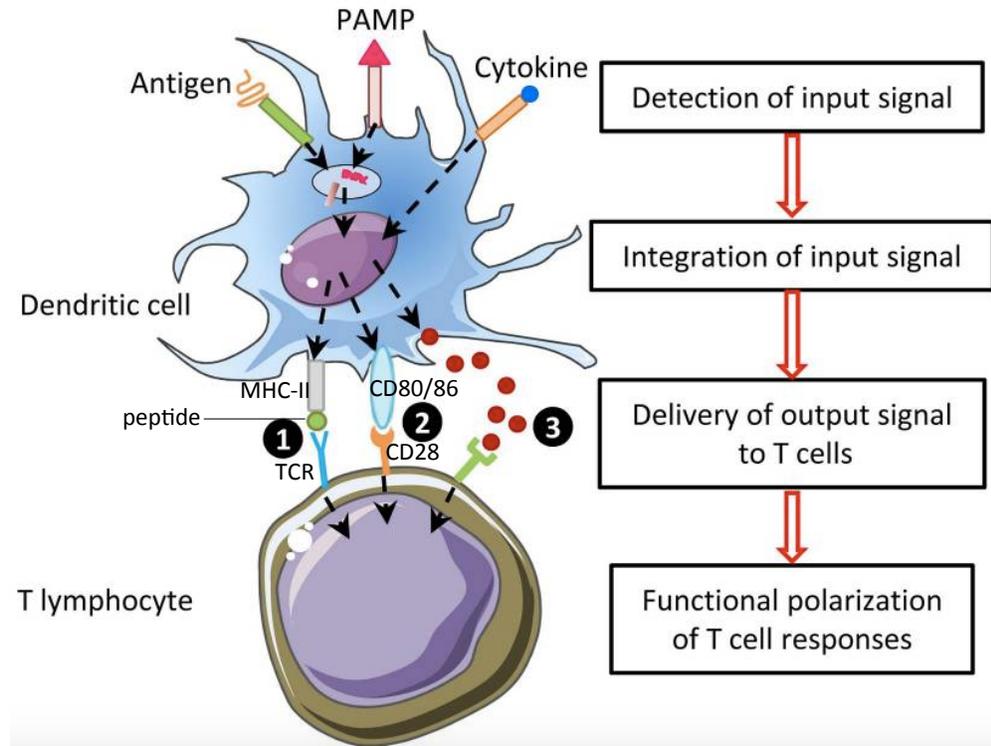


**Figure 8.** Photo d'une cellule dendritique porcine par microscopie électronique à l'état immature (a) *versus* à l'état mature, identifié par la surexpression des molécules de costimulation et du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (b) [112].

Il existe deux classes de CMH ou encore appelés, chez l'espèce porcine, SLA pour « Swine leucocyte antigen ». Le CMH de classe I (CMH-I) est exprimé sur toutes les cellules nucléées de l'organisme, ainsi que les cellules dendritiques. Il permet de présenter les antigènes endogènes aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques, impliqués dans des réponses immunitaires antivirales principalement [100]. Quant au CMH de classe II (CMH-II), il est exprimé seulement sur les CPAs professionnelles, et présente des antigènes exogènes provenant des bactéries extracellulaires aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (ou *helper* [Th]) [100]. De plus, la surexpression du CMH est de pair avec celle des molécules de co-stimulations CD80/86 et CD40.

### 2.3.2. La présentation de l'antigène

Une fois migrées dans les organes lymphoïdes, les DCs matures présentes l'antigène aux lymphocytes Th (CD4+). La présentation de l'antigène se déroule en 3 signaux illustrés dans la **Figure 9** ci-dessous.



**Figure 9.** Schéma illustrant la présentation de l'antigène, via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) par les DCs aux lymphocytes T [113].

Une fois dans les organes lymphoïdes secondaires, la DC présente l'antigène aux lymphocytes T *helper*. Ceci se fait grâce au CMH-II et par la surexpression de molécules de costimulation telles que CD40 et CD80/66. La présentation de l'antigène pour activer les lymphocytes T se déroule en 3 signaux. Le premier signal correspond au complexe CMH/Antigène exprimé à la surface des DCs qui est reconnu par le récepteur des cellules T (TCR) spécifique à l'antigène. Le deuxième signal correspond à la liaison des molécules de stimulations : CD40 exprimé par les DCs se liant au CD40-ligant (CD40L) exprimé par les lymphocytes T, et CD80/86 exprimé par les DCs se liant au CD28 exprimé par les lymphocytes T. Le troisième signal est la sécrétion de cytokines par les DCs, et joue un rôle important dans le développement de la réponse adaptative de type 1 ou de type 2.

Signal 1 : reconnaissance de l'antigène apprêté au CMH par le récepteur des cellules T. Signal 2 : Liaison des molécules de stimulation. Signal 3 : production de cytokines. MHC : complexe majeur d'histocompatibilité ; TCR : récepteur des cellules T ; PAMP : « pathogen-associated molecular pattern »

Le troisième signal, la sécrétion de cytokines, représente une étape cruciale dans l'influence de l'activation des lymphocytes Th. En effet, ces derniers se différencieront en divers sous-types de lymphocytes Th effecteurs, dont : Th1 et Th2 (décrits dans la section suivante), en fonction de l'antigène présenté et les cytokines produites par les DCs (**Tableau VII**). Les cytokines sécrétées par les DCs peuvent être pro-inflammatoires (telles que IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ ), anti-inflammatoires (telle que l'IL-10), ou encore des chimiokines (telle que l'IL-8). En plus de leur rôle dans le processus d'inflammation, ces cytokines influencent grandement l'activation des lymphocytes T et B, en jouant un rôle crucial dans le devenir de la réponse humorale (décrit en détail dans les sections suivantes).

À titre d'exemple, l'IL-12 est universellement décrite comme étant un médiateur clé dans le déclenchement de la réponse immunitaire de type 1. Il s'agit d'un hétérodimère comprenant une sous-unité p35 (de 30-33 kDa) et une autre p40 (de 35-44 kDa). L'hétérodimère p70 est la forme active de la cytokine [100, 115]. Pendant le processus de la présentation de l'antigène aux lymphocytes Th, l'IL-12, sécrétée par les DCs, se lie à un récepteur présent à la surface de ces lymphocytes et initie leur différenciation en lymphocytes CD4<sup>+</sup> Th1. De ce fait, l'IL-12 inhibe le développement de la réponse immunitaire de type 2 en agissant comme antagoniste à la cytokine IL-4 (cytokine Th2) [100]. Selon une étude réalisée chez la souris, le TNF- $\alpha$  constitue un cofacteur pour l'IL-12 afin de promouvoir le développement adéquat d'une réponse immunitaire de type 1 [12]. Au contraire, l'IL-6 joue un rôle dans le développement de la réponse immunitaire de type 2. Sécrétée par les DCs, elle se lie ensuite sur un récepteur présent à la surface des lymphocytes Th naïfs et permet la sécrétion autocrine de l'IL-4 par ces derniers facilitant ainsi leur différenciation en lymphocytes CD4<sup>+</sup> Th2 [116].

**Tableau VII.** Principales cytokines jouant un rôle dans le développement de la réponse immunitaire de type 1 et de type 2.

Cytokine	Produite par	Groupe de cytokines
IL-12 TNF- $\alpha$ IL-1 $\beta$	Cellules dendritiques	Type 1
IFN- $\gamma$ TNF- $\alpha$ IL-2	Lymphocytes Th1	
IL-6 IL-10	Cellules dendritiques et lymphocytes Th2	Type 2
IL-4	Lymphocytes Th2	

IL : Interleukine ; TNF-  $\alpha$  : « Tumor-necrosis factor  $\alpha$  » ; IFN : Interféron ; Th1 : T helper 1 ; Th2 : T helper 2.

## 2.4. L'activation et la différenciation des lymphocytes Th

Tel que mentionné, il y a deux sous populations de cellules T : les cellules T CD4+ auxiliaires (ou *helper* [Th]) et les cellules T CD8+ cytotoxiques (à noter cependant que chez le porc, une population de cellules T doubles positives CD8+/CD4+ se développe avec l'âge). Les cellules Th reconnaissent un antigène présenté par le CMH-II (l'antigène correspond à une bactérie extracellulaire, par exemple) tandis que les cellules T CD8+ reconnaissent un antigène endogène présenté par le CMH-I (l'antigène correspond plutôt à un virus, par exemple). Dans le cadre de ce mémoire, les cellules T CD8+ ne seront pas abordées [100]. Les lymphocytes T ne peuvent reconnaître un antigène seulement lorsque celui-ci est présenté via le CMH par une CPA. Par la suite, ces cellules T prolifèrent et se différencient en divers types de cellules T effectrices et mémoires [100]. Comme il a été mentionné précédemment, pour les lymphocytes Th, plusieurs sous-types de cellules Th effectrices existent : dont les Th1 et les Th2, qui influencent le développement de la réponse immunitaire de type 1 et 2, respectivement [100].

### 2.4.1. Les lymphocytes Th1

Comme déjà mentionné dans les sections précédentes, le développement des cellules Th1 débute avec la production d'IL-12 par les DCs. L'IL-12 agit directement sur les cellules T pour induire leur différenciation en cellules Th1. La sécrétion d'IFN- $\gamma$  (principale cytokine de type 1) par les cellules Th1 activées agit comme une boucle de rétroaction positive en stimulant la production de cytokines par les DCs. L'IFN- $\gamma$  possède l'habilité à inhiber la voie de différenciation des cellules Th2. Les cellules Th1 stimulent la phagocytose et la lyse des pathogènes par les phagocytes, en effet, l'IFN- $\gamma$  est un puissant activateur des macrophages. Cette cytokine, avec l'IL-2, stimule également la production d'isotypes d'anticorps de type 1 par les cellules B favorisant la phagocytose des pathogènes, dans la mesure où ces anticorps se lient directement aux récepteurs Fc des phagocytes et activent le complément. En raison de ces actions, les cellules Th1 sont efficaces dans l'immunité contre des pathogènes intracellulaires et extracellulaires [100].

#### 2.4.2. Les lymphocytes Th2

Les mécanismes impliqués dans la polarisation de la réponse Th2 sont moins bien connus que ceux de la réponse Th1. L'IL-4 est la principale cytokine Th2 sécrétée de façon autocrine par les lymphocytes Th et initie leur différenciation en cellules Th2 effectrices, mais les cellules impliquées dans la production initiale de cette cytokine sont encore inconnues [100]. Il a cependant été décrit que l'IL-6 produit par les CPAs joue un rôle dans le développement de la réponse Th2 [116]. La production d'IL-10 par les CPAs pourrait aussi induire indirectement la différenciation des cellules Th2, en inhibant la synthèse d'IL-12 et donc le développement d'une réponse de type 1 [117]. Une fois différenciés en lymphocytes Th2, d'autres cytokines sont sécrétées telles l'IL-5, IL-6, IL-13 et l'IL-4, et influencent l'activation des cellules B ainsi que la commutation isotypique des anticorps de type 2. Les anticorps produits jouent entre autres un rôle dans la réponse immunitaire des muqueuses ainsi que dans les allergies [100]. Ils sont donc moins protecteurs contre une bactérie extracellulaire et encapsulée [96].

#### 2.5. L'activation des lymphocytes B

Les lymphocytes B, arrivent à maturation dans la moelle osseuse, et lorsqu'ils la quittent, chacun exprime à sa surface une molécule d'anticorps membranaire (ou immunoglobine membranaire [mIg]) faisant partie du récepteur de la cellule B (ou BCR), capable de reconnaître un antigène spécifique. Lorsqu'une cellule B naïve rencontre un antigène pour la première fois grâce à son BCR, elle se divise rapidement. Les cellules qui résultent de cette division se différencient en cellules B mémoires et en plasmocytes. Les cellules B mémoires ont une longue durée de vie et continuent à exprimer le même anticorps membranaire que la cellule B naïve dont elles sont issues. Les plasmocytes produisent de nombreux anticorps sous forme sécrétés [100].

L'activation des lymphocytes B se fait selon deux voies différentes, à savoir la voie thymodépendante (TD) et la voie thymoindépendante (TI). L'activation des cellules B par la voie TD, nécessite un contact direct avec les lymphocytes Th et au contraire, ce contact direct n'est pas requis pour la voie TI.

#### 2.5.1. L'activation thymodépendante

L'activation des lymphocytes B par la voie TD nécessite la présence de lymphocytes Th. Les antigènes TD sont généralement des protéines ou peptides solubles. Ces antigènes reconnus par les récepteurs des cellules B, sont ainsi endocytés et associés au CMH-II, procurant aux lymphocytes B le statut de CPA. L'antigène apprêté au CMH-II est alors présenté aux lymphocytes Th préalablement différenciés et activés (tel que montré à la **Figure 9**), qui secréteront des cytokines Th1 ou Th2 qui à leur tour influenceront la commutation de classe des anticorps des lymphocytes B. De ce fait, différents isotypes ou sous-classes des Ig spécifiques à l'antigène seront produits [100, 118].

#### 2.5.2. L'activation thymoindépendante

Les mécanismes de l'activation par la voie TI sont moins bien connus que la précédente. En bref, comme son nom l'indique, cette activation se manifeste indépendamment des lymphocytes T. Les antigènes TI comportent des molécules de nature polysaccharidique, tel que la CPS de *S.suis*. Une caractéristique majeure qui les différencie des antigènes TD est leur incapacité à se complexer au CMH-II et par conséquent d'être incapables d'être présentés aux

lymphocytes Th. Par définition, les antigènes TI s'affirment ainsi comme étant moins immunogéniques que les antigènes TD. En absence d'une activation CMH-dépendante des lymphocytes B par les lymphocytes Th, la commutation isotypique des immunoglobulines sera limitée, voir absente. L'isotype des anticorps produits par les lymphocytes B est essentiellement l'IgM. De plus, ce phénomène est accompagné d'une faible réponse mémoire [100, 118].

### 2.5.3. La production d'anticorps

Les cellules B naïves n'expriment que l'Ig de type IgM (et IgD), tandis que les cellules B matures et mémoires expriment principalement les Ig de type IgG (et IgA, IgE). L'IgM peut se présenter sous deux formes : la forme monomérique lorsqu'il est exprimé sous forme membranaire des cellules B, ou la forme pentamérique lorsqu'il est sécrété par les plasmocytes. L'IgM est la première classe d'anticorps produit et possède une forte efficacité pour activer le complément [100]. L'IgA joue un rôle dans l'immunité des muqueuses et l'IgE est au sein des réponses allergiques [100]. L'IgG est la classe d'anticorps la plus abondante dans le sérum et possèdent un atout d'opsonisation [100]. Ils existent différentes sous-classes d'IgGs qui jouent des rôles distincts plus ou moins caractérisés selon les espèces (**Tableau VIII**). En effet, chez la souris, les sous-classes IgG2a, IgG2b, IgG2c et IgG3 sont caractérisées comme de type 1 [3]. Leur production est donc associée au développement d'une réponse immunitaire de type 1, découlant de la différenciation des lymphocytes Th en Th1 suite à la présentation de l'antigène par les CPAs (schématisé dans la **Figure 10** ici-bas). Ces anticorps jouent un rôle important dans la lyse bactérienne par le déclenchement de la cascade du complément à la surface du pathogène ou en favorisant l'opsonophagocytose de la bactérie. Ainsi, ce type d'anticorps est déterminant pour la protection contre les bactéries extracellulaires et encapsulées, telle que *S. suis* [3, 41]. Au contraire, l'IgG1 décrit comme un anticorps associé à la réponse immunitaire de type 2, et donc découlant de la différenciation des lymphocytes Th en Th2 suite à la présentation de l'antigène par les CPAs, est moins protecteur [3].

En revanche, pour le porc, le concept des IgGs type 1 et type 2 n'est pas complètement décrit. De récentes études ont démontré que les IgG2 porcins ont un potentiel plus opsonisant que les IgG1, et découlent d'une réponse immunitaire de type 1. De plus, une étude génétique suggère

que l'IgG3 porcine aurait un rôle important dans l'activation du complément, mais ceci reste à évaluer. Enfin, plusieurs autres sous-classes d'IgGs et leurs variantes alléliques (IgG1a/b, IgG2a/b, IgG3, IgG4a/b, IgG5a/b et IgG6a/b) ont été décrites chez le porc, mais leurs fonctions ne sont pas encore connues, notamment par le manque d'outils disponibles pour les étudier [3].

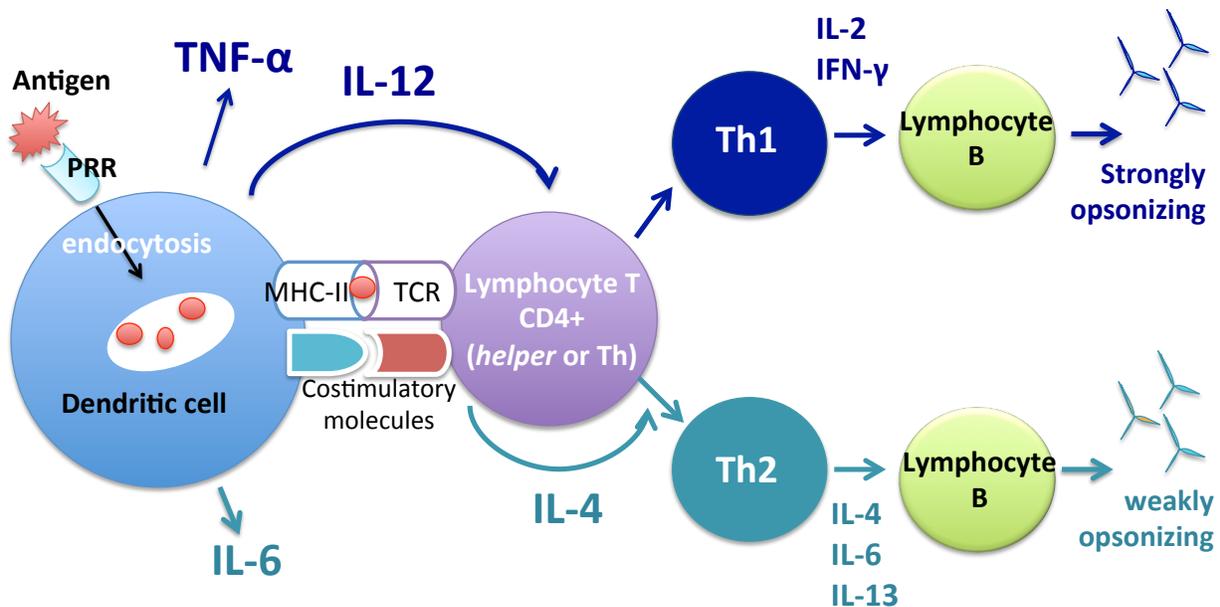
**Tableau VIII.** Les différentes sous-classes d'Ig ainsi que leur rôle dans la protection contre les pathogènes selon les espèces [119-121] .

<b>Souris</b>						
<b>Anticorps</b>	<b>IgM</b>	<b>IgG1</b>	<b>IgG2a</b>	<b>IgG2b</b>	<b>IgG2c</b>	<b>IgG3</b>
Opsonophagocytose	++	-	++	++	++	+++
Complément	+++	+/-	+++	+++	+++	+++
Réponse Th1/Th2	-	Th2	Th1			
<b>Porc</b>						
<b>Anticorps</b>	<b>IgM</b>	<b>IgG1</b>	<b>IgG2</b>	<b>IgG3</b>	<b>IgG4/5/6</b>	
Opsonophagocytose	++	+/-	+	+ (?)	?	
Complément	+++	+	++	+ (?)	?	
Réponse Th1/Th2	-	Th2	Th1	?	?	
<b>Humain</b>						
<b>Anticorps</b>	<b>IgM</b>	<b>IgG1</b>	<b>IgG3</b>	<b>IgG2</b>	<b>IgG4</b>	
Opsonophagocytose	+	+++	++	+/-	+	
Complément	+++	++	+++	+	-	
Réponse Th1/Th2	-	Th2	Th1	Th1	Th2	

IgM : Immunoglobuline M ; IgG : Immunoglobuline G ; Th1 : T helper 1 ; Th2 : T helper 2

Le schéma représenté dans la **Figure 10** ci-dessous résume le développement de la réponse immunitaire de type 1 versus de type 2, de la cellule dendritique à la production d'anticorps par les lymphocytes B.

## Type 1 immune response



## Type 2 immune response

**Figure 10.** Schéma récapitulatif et général du développement des réponses immunitaires de type 1 et de type 2.

Le pathogène/antigène, reconnu grâce aux PRRs par les DCs (ou les CPAs en général), est endocyté et présenté aux lymphocytes Th CD4+ naïfs via le CMH-II. Après la liaison du complexe CMH/antigène au TCR, et la liaison des molécules de co-stimulations, les lymphocytes Th s'activent et se différencient en différents types de cellules Th effectrices, soient les lymphocytes Th1 ou Th2. La différenciation en cellules Th1 débute par la sécrétion d'IL-12 et d'autres cytokines de type 1 par les DCs. Par la suite, les cellules Th1, une fois activées, sécrètent des cytokines spécifiques de la réponse immunitaire de type Th1 (IL-2 et IFN- $\gamma$ ) qui influencent directement la commutation isotypique des immunoglobulines initiée par les lymphocytes B. Ainsi, des sous-classes d'IgG (IgG2, IgG3) sont formées et sécrétées, jouant un rôle dans l'opsonisation des bactéries, témoignant le développement d'une réponse immunitaire de type 1.

La réponse immunitaire de type 2, quant à elle, débute par la sécrétion de cytokines de type 2 par les DCs (telles que l'IL-6) ainsi que l'auto sécrétion d'IL-4 par les lymphocytes Th CD4+. Ces derniers se différencient en lymphocytes Th2 effecteurs et sécrètent d'autres cytokines de type Th2 qui influenceront la commutation de classe vers des IgG1, ayant une capacité d'opsonisation plus faible.

DC : cellule dendritique ; PRR : « pattern recognition receptor » ; TNF : « Tumor necrosis factor » ; IL : Interleukine ; CMH : complexe majeur d'histocompatibilité ; TCR : récepteur des cellules T ; Th : cellule T helper ; Ig : Immunoglobuline.

### 3. Les adjuvants utilisés en médecine vétérinaire

Les adjuvants désignent toutes substances capables d'augmenter l'intensité de la réponse immune dirigée contre un antigène. Il en existe de nombreuses variétés, de natures et d'origines différentes. Deux types d'adjuvants se distinguent, ils peuvent être des immunostimulants ou des « véhicules ». Les immunostimulants activent directement les cellules immunes en se liant à des récepteurs, tels que les TLRs, des cellules immunes. Ainsi, ils influencent directement le développement la réponse immunitaire de type 1 ou de type 2. Les « véhicules » contiennent eux même l'antigène et déterminent la façon dont il sera présenté aux cellules immunes. Ils contiennent aussi une capacité immunostimulante, car ils sont constitués de corps étrangers [122]. La plupart du temps, les adjuvants sont indispensables au développement de la réponse immune lors de la vaccination. En effet, le pouvoir immunogène d'un vaccin non adjuvanté est souvent trop faible ; même s'il contient les épitopes protecteurs adéquats il manque un agent capable d'amplifier et d'orienter la réponse immune spécifique [122]. Par exemple les adjuvants sont indispensables dans la formulation des vaccins sous-unitaires. Malgré que ce genre de vaccin reste le plus sécuritaire, il est cependant moins immunogénique de par l'utilisation de protéines/peptides solubles comme antigène.

Le choix de l'adjuvant est crucial pour le développement d'un vaccin en médecine vétérinaire et humaine. En effet, ces substances influencent la magnitude et la qualité de la réponse adaptative en agissant directement ou indirectement sur la commutation isotypique des lymphocytes B, afin de garantir la meilleure protection contre le pathogène. Ils doivent être stables, sécuritaires et faciles à utiliser, et permettre une diminution de l'utilisation de l'antigène. Un adjuvant n'est pas universel pour la formulation d'un vaccin, il en existe de nombreux pouvant être utilisés en médecine vétérinaire. Ils agissent par différents mécanismes, et leur mode d'action pour déclencher la réponse immunitaire est parfois incomplètement connu [123, 124].

Les principales catégories d'adjuvants utilisés en médecine vétérinaire seront décrites ci-dessous.

### 3.1. Les constituants bactériens

Des adjuvants contenant des constituants bactériens ou des préparations de paroi bactériennes sont des adjuvants capables de mimer les signaux pro-inflammatoires reçus par le système immunitaire lors des interactions entre les PAMPs et les PRRs.

Certains exemples d'adjuvants à constituants bactériens seront décrits ci-dessous :

◆ L'adjuvant complet de Freund (ACF) est bien connu. Alors qu'il est aussi un adjuvant faisant partie de la catégorie des huiles, celui-ci est constitué d'une mycobactérie inactivée (*Mycobacterium tuberculosis*) en plus de son émulsion eau dans huile. L'ACF combine l'effet dépôt (expliqué dans la partie des adjuvants huileux) d'une émulsion eau dans huile et la capacité d'activer une réponse immunitaire spécifique par la présence de la mycobactérie inactivée. En effet, l'ACF cible les TLR2, TLR3 et TLR4 des cellules immunes et induit une forte réponse immunitaire [125]. Il a beaucoup été utilisé dans des essais de vaccination contre *S. suis* (comme vu dans la section 1.5). La majorité de ces essais vaccinaux se sont révélés efficaces, grâce au fort pouvoir immunogène de cet adjuvant. Or, le ACF est connu pour induire des effets secondaires considérables chez l'animal vacciné. En effet, il entraîne l'apparition d'abcès, de granulomes et de nécroses cutanées. C'est aussi un agent pyrogène et peut provoquer des polyarthrites et diverses lésions liées à des réactions auto-immunes. L'ACF peut être administré qu'une seule fois, des injections répétées peuvent provoquer une réaction anaphylactique fatale. Pour les rappels, il est recommandé d'utiliser l'adjuvant incomplet de Freund (IFA). L'ACF a été retiré du marché dans la majorité des pays de par ces forts effets secondaires engendrés, cependant une minorité de pays l'utilise encore, telle que la Chine [122].

◆ Des constituants de la paroi bactérienne sont aussi utilisés comme adjuvant, tel que le lipopolysaccharide (LPS) [122]. Le LPS est une endotoxine de la paroi des bactéries gram-négatives. C'est un puissant mitogène des lymphocytes B, mais aussi un activateur des cellules T [125]. Le LPS se lie spécifiquement sur le TLR4 des cellules immunes. Cependant le LPS engendre des effets toxiques marqués. Son usage est donc interrompu *in vivo*, mais il est utilisé

pour étudier les mécanismes immunitaires *in vitro* [122] . Une version détoxifiée, le MPLA (pour « monophosphoryl lipid A ») est maintenant disponible.

◆ Des ADN bactériens sont employés comme adjuvant, tels que les CpG oligodeoxynucleotides (CpG ODN) qui miment l'ADN bactérien. Ce sont d'ADN simples brins synthétiques contenant des motifs CpG améthylés. Ils se lient aux TLR9 des cellules et activent le système immunitaire. Ils améliorent la présentation de l'antigène et stimulent les réponses immunes cellulaires et humorales. Il existe 3 classes de CpG ODN basés sur leurs caractéristiques structurales et sur leurs activités au niveau des cellules immunes. Les CpG ODN de classe A induisent la production de IFN- $\alpha$  par l'activation des DCs plasmacytoïdes (pDC), mais sont généralement de faibles activateurs de la production des cytokines pro-inflammatoires. Alors que les CpG ODN de classe B, activent les cellules B et des autres cellules exprimant le TLR9 et induisent la production de cytokines pro-inflammatoires, mais n'activent que faiblement les pDC. Enfin les CpG ODN de classe C combinent l'activité des deux dernières classes. Les CpG sont utilisés en phase clinique pour la vaccination des humains contre la Malaria, l'hépatite B ainsi que le virus de l'influenza [126]. Chez le porc, les CpG ont été utilisés dans des essais de vaccination contre des virus, tels que le virus pseudorabies [127], le circovirus [128] ou encore contre le virus du syndrome respiratoire et reproducteur porcine (SRRP) [129].

◆ Des ARN bactériens, tel que l'acide polyinosinic-polycytidylic ou Poly I:C, sont aussi des adjuvants de la catégorie des constituants bactériens. Le poly I:C est un ARN double brin synthétique avec un motif moléculaire associé aux infections virales, car il est produit par de nombreux virus pendant leur réplication. Les doubles brins d'ARN sont reconnus par un récepteur intracellulaire des cellules immunitaires (DCs, lymphocytes B et T, cellules NK) : le récepteur TLR3 [130]. L'activation de ces cellules immunes induit une sécrétion d'IL-12 et d'IFNs de type I et augmente l'expression du CMH-II et des molécules de costimulation sur les CPAs [131]. Grâce à l'induction d'une forte production d'IFNs de type I, le poly I:C est souvent utilisé dans les essais de vaccination contre les virus, ou comme thérapie contre les cellules tumorales. En effet, le poly I:C est étudié en phase clinique chez des patients atteints des maladies à origine virale (tel que le virus de l'influenza) ainsi que chez des patients cancéreux

[130]. Quant à la vaccination chez l'espèce porcine, le Poly I:C a été utilisé contre les infections par le virus de l'influenza [132] et contre le SRRP [133].

### 3.2. Les adjuvants huileux

Les adjuvants huileux regroupent différents types d'émulsion. Une émulsion est un système où deux phases normalement non miscibles sont dispersées l'une dans l'autre et stabilisées par des agents tensioactifs. Deux sortes d'émulsions peuvent être utilisées comme adjuvant, à savoir les émulsions eau-dans-huile (w/o pour « water-in-oil ») et l'huile-dans-eau (o/w pour « oil-in-water »). La combinaison de ces deux émulsions peut aussi être retrouvée en vaccinologie (émulsion eau-dans-huile-dans-eau) [122]. Les huiles peuvent être de différentes origines, telles qu'animale, végétale ou minérale et peuvent influencer l'efficacité de l'adjuvant selon leur composition. En effet, l'huile animale est composée de squalène qui se décrit comme un lipide hydrocarboné naturellement produit par les organismes supérieurs. C'est un intermédiaire essentiel dans le métabolisme du cholestérol, des hormones stéroïdes et de la vitamine D chez l'homme [134]. Lorsque ces huiles animales font partie d'un vaccin, elles sont par conséquent plus tolérées par l'organisme [135]. D'ailleurs, deux adjuvants composés d'huile animale à base de squalène sont actuellement brevetés pour l'utilisation dans la vaccinologie humaine (l'adjuvant AS03, et l'adjuvant MF59) [136, 137]. Néanmoins, les huiles animales restent moins efficaces que les huiles minérales pour la composition de vaccins. En effet, ces dernières sont composées en majorité de MARCOL 52, ou encore appelée l'huile blanche qui est dérivée du pétrole [99]. Ce type d'huile n'est donc pas métabolisé par l'organisme et par conséquent, induit des effets indésirables au site d'injection, mais demeure efficace pour activer le système immunitaire [99].

Le mécanisme d'action des adjuvants huileux se déroule par la formation d'un dépôt au site d'injection. L'effet dépôt consiste à limiter une rapide élimination de l'antigène par l'hôte en empêchant sa dilution et sa dégradation. Grâce à un relâchement lent de l'antigène intact, ce type d'adjuvant permet une exposition lente et prolongée de l'antigène aux cellules immunitaires. Cette exposition prolongée induit une stimulation continue des cellules B, et résulte dans une production élevée d'anticorps par l'hôte [99]. En général, ces adjuvants sont trop toxiques pour

être utilisés comme vaccin prophylactique chez l'humain, bien qu'ils puissent convenir pour certaines conditions, telles que le cancer terminal où il y a une plus grande tolérance des effets secondaires. Les effets secondaires de cette catégorie d'adjuvant peuvent se décrire généralement par des réactions inflammatoires, des granulomes et des ulcères qui apparaissent au site d'injection [125].

### 3.2.1. L'émulsion eau-dans-huile (w/o)

L'émulsion w/o est représentée par des gouttes de solution aqueuse d'antigène hydrophile d'un diamètre de l'ordre du nanomètre, englobées dans une phase lipophile continue. Cette formulation permet la libération progressive de l'antigène au niveau du site d'injection et sa présentation sur une surface étendue tout en protégeant la dégradation de l'antigène. En outre, elle exerce un effet de « corps étranger » par lequel elle attire les cellules de l'immunité et provoque ainsi une réaction inflammatoire [122].

Quelques exemples d'adjuvants composés d'une émulsion w/o seront décrits ci-dessous :

◆ L'adjuvant incomplet de Freund (AIF) est un adjuvant communément utilisé en recherche, cependant il engendre de forts effets secondaires. Il est préparé à partir d'huiles non métabolisables (huile de paraffine et un émulsifiant). Il ne contient pas de *M. tuberculosis* comme retrouvé dans l'ACF, il est donc moins inflammatoire, mais provoque des lésions au site d'injection et est potentiellement cancérigène. L'AIF induit le développement d'une forte réponse immunitaire, mais est incapable de stimuler les types de réponses cellulaires efficaces contre les tumeurs et contre de nombreuses infections virales. L'intérêt croissant pour le bien-être des animaux de laboratoire a favorisé le développement d'adjuvants équivalents à l'AIF, mais ayant un niveau de toxicité acceptable [122].

◆ Les adjuvants de type TiterMax® sont des émulsions w/o composées d'un copolymère synthétique et du squalène. Le TiterMax® est un adjuvant beaucoup moins toxique que l'ACF et

l'AIF, mais garde le même taux de production d'anticorps démontré chez la souris et le hamster [99]. Cependant, le TiterMax® peut causer des dégâts tissulaires au niveau de son site d'injection. La version Gold (TiterMax Gold®) induit des taux d'anticorps particulièrement élevés et persistants. Le TiterMax Gold® est constitué d'une huile de squalène métabolisable, du sorbitan monooleate 80 comme émulsifiant, d'une séquence de copolymère (CRL8300) et de microparticules de silice. Ces adjuvants sont essentiellement utilisés pour la recherche en vaccinologie [99]. En effet, le TiterMax Gold® a été utilisé comme adjuvant dans une étude d'immunisation chez la souris avec un prototype de vaccin glycoconjugué composé de la CPS de *S. suis* sérotype 2 liée à la protéine TT. Cette formulation vaccinale a induit de hauts titres d'anticorps dirigés contre la CPS de *S. suis* [8].

◆ Le Stimune® (ou encore appelé Specol) est composé d'une huile minérale appelée MARCOL 52, ainsi que des émulsifiants tels que le Span 85 et le Tween 85. Le Stimune® induit une forte réponse anticorps comparable à celle obtenue avec l'ACF chez le lapin, la souris, le porc et des perruches. Cet adjuvant peut induire des effets secondaires tels que la fièvre, mais aussi des lésions au site d'injection [99]. Le Stimune® est souvent utilisé dans des essais de vaccination chez le porc, notamment contre *S. suis* avec des bactérines, or les résultats quant à la protection engendrée par ces formulations vaccinales sont mitigés comme vu dans la section 1.5 de cette revue [3]. Une étude a aussi utilisé cette huile dans la formulation d'un vaccin sous-unitaire composé du glycoconjugué (CPS de *S. suis* sérotype 2 lié à la TT) afin d'évaluer la réponse immunitaire initiée par ce vaccin chez le porc [8]. Les résultats ont démontré un effet protecteur de cette formulation, et donc le pouvoir adjuvant du Stimune®.

### 3.2.2. L'émulsion huile-dans-eau (o/w)

L'émulsion o/w est représentée par des préparations de copolymères de chaînes hydrophiles de polyoxyéthylène (POE) et de chaînes hydrophobes de polyoxypropylène (POP) incorporées dans une huile. Ce type de structure particulière favorise le captage de l'antigène par les CPAs. Lors de l'administration d'une émulsion o/w, la phase aqueuse se disperse rapidement et les sphérules d'huile libérées transportent l'antigène directement vers les ganglions via les

vaisseaux lymphatiques. Contrairement aux émulsions w/o, la dispersion rapide d'une émulsion o/w permet supposément d'éviter la formation de granulomes et d'abcès [122].

Quelques exemples d'adjuvants composés d'une émulsion o/w seront décrits ci-dessous :

◆ Les adjuvants de la série Montanide™ ISA, commercialisés par la compagnie SEPPIC (en France), sont utilisés en médecine vétérinaire. SEPPIC propose une série d'émulsions o/w ou w/o près à être utilisées sur plusieurs espèces d'animaux tels que les bovins, les ovins, les chevaux, les poissons, la volaille ainsi que le porc [138]. Parmi eux, l'adjuvant Montanide™ ISA 25VG est une émulsion o/w composée d'une huile minérale connue pour être efficace, mais induit des réactions locales au site d'injection [123]. Le Montanide ISA™ 25 VG est particulièrement utilisé pour vacciner les ovins et les porcs et est capable d'améliorer l'efficacité d'un vaccin via l'induction d'une forte réponse immunitaire à court terme [138]. Le Montanide ISA™ 25 VG a fait l'objet de formulation de bactérines contenant des cellules entières de *S. suis* afin de vacciner les porcs contre *S. suis* du sérotype 2. Suite à l'infection, la formulation vaccinale a révélé une diminution de la bactériémie et de l'apparition des signes cliniques (méningite, pneumonie) ainsi qu'une diminution de la mortalité associée à l'infection par *S. suis* [84]. L'adjuvant Montanide ISA™ 25 VG a aussi été testé dans un vaccin contre la maladie « foot-and-mouth » chez le porc [139]. D'après la compagnie SEPPIC [138], le Montanide™ 25VG peut induire des effets néfastes chez le porc, tel que l'induction d'une forte fièvre. Afin d'éliminer ces effets indésirables, d'autres adjuvants Montanide™ ont été commercialisés. Le Montanide™ ISA 35VG composé d'une huile métabolisable (sans trace d'huile minérale) ainsi que du mannitole et de l'acide oléique comme émulsifiants, est recommandé pour la vaccination des chevaux et des porcs. Ou encore le Montanide ISA™ 15A VG composé d'un faible ratio d'huile minérale ainsi que du mannitole et de l'acide oléique comme émulsifiants, où celui-ci est recommandé pour les porcs et les petits ruminants.

◆ L'adjuvant Emulsigen® est composé d'une huile minérale. Il contient des micro-gouttelettes d'huiles dispersées de façon uniforme qui assurent la stabilité de l'émulsion et réduit la viscosité. Il induit une réponse immunitaire forte et rapide [140]. Cet adjuvant a fait l'objet de nombreux essais de vaccination contre *S. suis* chez le porc, notamment en combinaison avec des bactérines

du sérotype 2 et sérotype 9 (donnant des résultats contradictoires), ou encore dans une formulation d'un vaccin sous-unitaire contre *S. suis* chez le porc [3].

### 3.3. Les saponines

Les saponines sont des glycosides naturels de stéroïdes ou triterpéniques qui, en plus d'être utilisés dans divers secteurs industriels comme détergents ou émulsifiants, présentent de nombreuses activités biologiques et pharmacologiques différentes dont notamment l'activation du système immunitaire des mammifères. Des extraits de saponines bruts à partir de l'écorce de *Quillaja saponaria molina* (un arbre d'Amérique du Sud) ont été premièrement utilisés comme adjuvant, cependant ces extraits hétérogènes et aux effets peu prévisibles ont aujourd'hui fait place à des préparations standardisées, telles que le Quil A® et ses dérivées (comme le QS-21). Leur efficacité a été évaluée dans de nombreux essais cliniques. Leur capacité à stimuler à la fois la réponse immunitaire humorale et cellulaire, rend ces adjuvants idéaux pour une utilisation dans les vaccins sous-unitaires dirigés contre des antigènes exogènes, contre les pathogènes intracellulaires, ainsi que des vaccins thérapeutiques contre le cancer. Cependant, des effets indésirables peuvent survenir tels qu'une toxicité élevée ou une activité hémolytique. En effet, les saponines interagissent avec le cholestérol des membranes cellulaires et forment des pores au sein de ces dernières. De par ces effets toxiques, les saponines sont restreintes aux usages dans la vaccinologie animale [9, 141].

Le mécanisme d'action des saponines sur la stimulation du système immunitaire n'est pas clairement compris, mais de nombreuses explications ont été avancées. Il est probable que les saponines interagissent avec les CPAs pour induire la production de cytokines. L'incorporation des saponines dans les membranes cellulaires ou les endosomes des cellules immunitaires exposerait ainsi l'antigène aux protéases cytosoliques. Comme évoqué précédemment, les saponines forment des pores à travers les membranes cellulaires en s'intercalant entre le cholestérol, et ainsi les antigènes auraient directement accès à la voie endogène de la présentation des antigènes aux lymphocytes T CD8+ [142].

◆ L'adjuvant Quil A® a été conçu en 1978 par Dalsgaard, à partir de mélange enrichi de saponine extraite de l'arbre *Quillaja saponaria molina* [141]. Le Quil A® induit à la fois une réponse immunitaire humorale et cellulaire, et produit des isotypes d'Ig variés. Cet adjuvant est largement utilisé en médecine vétérinaire, notamment contre la maladie « foot-and-mouth », ainsi que dans la recherche vaccinale contre *S. suis* chez le porc et la souris [7, 41].

◆ Les *immunostimulating complexes* (ISCOMs) sont des dérivées des saponines. Il s'agit de structures vésiculaires d'environ 35 nm de diamètre ayant l'aspect d'une cage et facilement préparées en mélangeant le Quil A® avec du cholestérol et de la phosphatidylcholine. Le Quil A® et le cholestérol forment la structure du complexe, et la phosphatidylcholine étant moins rigide permet l'incorporation d'un antigène amphipathique grâce au domaine hydrophobe. Les ISCOMs induisent une réponse humorale avec la production d'anticorps variés et ciblent les CPAs en stimulant la présentation des antigènes par le CMH-I aux lymphocytes T CD8+. Ce phénomène s'explique probablement par la capacité des saponines à interagir avec le cholestérol des membranes cellulaires et induire des pores, ce qui permet à l'antigène d'être introduit directement dans la voie endogène de présentation telle qu'évoquée précédemment [122, 141].

### 3.4. Les adjuvants minéraux

Les composants à base d'aluminium, particulièrement l'aluminium phosphate et l'aluminium hydroxyde (généralement nommés 'Alum') sont communément utilisés dans les préparations vaccinales pour la médecine humaine et vétérinaire. Les vaccins composés d'aluminium sont sécuritaires et efficaces, et sont utilisés depuis plus de 60 ans [99]. Néanmoins, ils manifestent certains désavantages. En effet, les antigènes adjuvantés à l'Alum sont rapidement éliminés après l'injection, et la production d'anticorps reste modérée (un pic de production d'anticorps à 3-4 semaines suivit d'un déclin rapide), et par conséquent, des rappels sont nécessaires [99]. Ainsi, l'intérêt de l'Alum réside essentiellement dans sa sécurité [122].

Au contraire des autres catégories d'adjuvants, le mode d'action de l'Alum a largement été étudié. Il se présente sous forme de précipités insolubles de type gel sur lesquels se lit

l'antigène par des forces électrostatiques et fournit un effet dépôt à court terme. L'antigène est concentré localement une fois injecté et est présenté aux cellules immunitaires sous forme d'agrégats multimoléculaires, ce qui favorise le recrutement des cellules immunes et le captage par les CPAs [122, 143, 144]. *In vitro*, des études démontrent que les DCs et cellules B captent et phagocytent l'antigène plus rapidement lorsqu'il est adsorbé sur un gel d'Alum comparativement à un antigène seul. De plus, les sels d'aluminium augmentent l'expression des molécules de co-stimulation par les DCs *in vitro* [145].

Pour ce qui est des voies d'activation de l'Alum, celui-ci activerait les voies des inflammasomes. L'inflammasome est un complexe protéique oligomérique impliqué dans l'immunité innée. Il est constitué de plusieurs protéines qui s'assemblent à la suite de la reconnaissance de divers signaux inflammatoires par des récepteurs spécifiques tels que le « NOD-like receptor protein 3 » (NLRP3). L'inflammasome, une fois assemblé, favorise la production des cytokines pro-inflammatoire. L'Alum serait une cible du NLRP3 et activerait l'assemblage de l'inflammasome dont cette activité procurerait son pouvoir adjuvant [143, 144].

Il existe plusieurs préparations d'adjuvants composés d'Alum et utilisés dans des formulations des vaccins pour la médecine humaine, tels que l'aluminium potassium sulfate  $[\text{AlK}(\text{SO}_4)_2]$ , l'aluminium hydroxide  $[\text{Al}(\text{OH})_3]$  appelé Alhydrogel® et l'aluminium phosphate  $[\text{Al}(\text{PO}_4)_3]$  [145]. L'Alhydrogel®, a été élu comme la préparation standard international pour les gels d'aluminium hydroxyde. L'Alhydrogel® est présent dans de multiples formulations de vaccins commerciaux [146]. L'Alum a aussi fait l'objet de plusieurs études de vaccination contre *S. suis* à la fois chez le porc et chez la souris [3].

### **III. Article scientifique**

**Porcine dendritic cells as an *in vitro* model to assess the immunological behaviour of *Streptococcus suis* subunit vaccine formulations and the polarizing effect of adjuvants**

Léa Martelet<sup>a</sup>, Sonia Lacouture<sup>b</sup>, Guillaume Goyette-Desjardins<sup>a</sup>, Guy Beauchamp<sup>c</sup>, Charles Surprenant<sup>d</sup>, Marcelo Gottschalk<sup>b</sup> and Mariela Segura<sup>a\*</sup>.

Laboratory of Immunology<sup>a</sup> and Laboratory of *Streptococcus suis*<sup>b</sup> of the Swine and Poultry Infectious Diseases Research Centre (CRIPA), Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada.

Biostatistics Office, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada<sup>c</sup>.

F. Ménard, 251 Route 235, Ange Gardien, Québec, Canada<sup>d</sup>

\* Correspondence: Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec, J2S 2M2, Canada. Tel:+1 450 773-8521 ext. 0080. Fax: +1 450 778-8108. E-mail: mariela.segura@umontreal.ca

---

Manuscrit soumis au journal « *Pathogens* ».

**Détails sur le rôle de la candidate dans la conception de l'article :**

Je suis la première auteure de l'article. J'ai participé activement au design expérimental, aux expériences, à l'analyse des résultats et à l'écriture de l'article.

## Abstract

In the present study, an *in vitro* porcine bone marrow-derived dendritic cell (DC) culture was developed as a model for evaluating immune polarization induced by different adjuvants when administered with immunogenic antigens that have the potential to become vaccine candidates if appropriately formulated. The swine pathogen *Streptococcus suis* was chosen as a prototype to evaluate previously characterized and potential *S. suis* vaccine candidates in combination with several adjuvants (Poly I:C, Quil A®, Alhydrogel®, TiterMax Gold® and Stimune®). The toll-like receptor ligand Poly I:C and the saponin Quil A® were shown to polarize swine DC cytokines towards a type 1 phenotype, characterized by a preferential production of IL-12 and TNF- $\alpha$ . The water-in-oil adjuvants TiterMax Gold® and Stimune® favoured a type 2 profile as suggested by a marked release of IL-6 upon DC stimulation. On the other hand, Alhydrogel® induced a type 1/type 2 mixed cytokine profile. The presence of diverse vaccine antigens differently modified the magnitude of the adjuvant effect, but overall the polarizing effect (type 1 vs. type 2) was preserved. This study provides for the first time specific information on swine DC immune activation by the adjuvants Quil A®, Alhydrogel®, TiterMax Gold® and Stimune®. Although further *in vivo* pig immunization studies would be required to better characterize the induced responses, the herein proposed *in vitro* model is a promising approach that helps assessing behaviour of the vaccine formulation rapidly at the pre-screening stage and will certainly reduce numbers of animals used while advancing vaccinology science.

## Introduction

*Streptococcus suis* is an encapsulated bacterium and an important cause of disease in swine, including meningitis, septicemia with sudden death, endocarditis and arthritis. In addition to the important economic losses to the swine industry, *S. suis* is also an emerging zoonotic pathogen [1, 2]. *S. suis* was originally classified into 35 serotypes based on the capsular polysaccharide (CPS) antigenicity, although the current taxonomical situation has been recently revised [3]. Nevertheless, serotype 2 remains the most virulent and frequent capsular type, worldwide isolated from both swine and humans [4]. A high genetic and phenotypic diversity of *S. suis* strains within serotype 2 is reported according to geographical distribution [4]. Pigs are affected generally between 5 and 10 weeks of age, when passive immunity provided by colostrum decreases [5, 6]. The pathogenesis of *S. suis* infection is not fully understood. In swine, the main port of entry for *S. suis* is the upper respiratory tract [7]. Subsequently, this pathogen can overthrow the immune system, through an arsenal of virulence factors, including the CPS [8], to cause acute septicemia that may lead to septic shock or different clinical outcomes depending on the colonized organ via mechanisms that are only partially elucidated to date [9].

So far, bacterins (either commercial or, more commonly, autogenous vaccines) have been used in the field to prevent *S. suis* disease with controversial results, and demonstrating only homologous protection [10]. Other strategies, such as live-attenuated or sub-unit vaccines, have been experimentally tested. The use of live avirulent strains gave inconsistent results and may present some safety concerns (zoonosis) [10]. More recently, research has focused on *S. suis* surface proteins as potential sub-unit vaccine candidates. One candidate is enolase, a *S. suis* 52-kDa surface protein that it is expressed by *S. suis* of all serotypes and is involved in adhesion to extracellular matrix components. Furthermore, enolase is a highly conserved protein, and anti-enolase antibodies have been detected in convalescent pig sera [11]. Nevertheless, immunization studies showed that protection conferred by enolase seems to depend on the adjuvant used in the vaccine formulation [12-14]. Similarly, it was recently reported that generation of protective antibodies after immunization with *S. suis* CPS as antigen was restricted to CPS conjugation to an immunogenic carrier protein and the use of emulsifying adjuvants [15]. CPS is a promising vaccine candidate because it is the antigen at the base of serotyping and thus can confers universal protection against all strains within the same serotype [10].

The development of the immune response starts with activation of different types of cells involved in the innate immunity including antigen presenting cells (APCs), such as dendritic cells (DCs). DCs are powerful APCs and strongly influence the outcome of the ensuing immunological events. After the capture of antigens, DCs undergo a maturation process and release several cytokines playing a key role in the development of the adaptive immune response. Indeed, mature DCs migrate to adjacent lymphoid organs where they activate T cells. The action of different cytokine pathways drives differentiation of T cells into distinct subtypes, such as Th1 and Th2, which ultimately influence the class of humoral immune responses elicited by B cells. For example, IL-12 and TNF- $\alpha$  are associated with the production of Th1 cells and type 1 IgG subclasses (IgG2a, IgG2b, IgG2c and IgG3, in mice), whereas IL-6 and other Th2 cytokines contribute to type 2 IgG subclass (IgG1) production [16-18]. Indeed, IL-6 promotes IL-4-induced Th2 differentiation and inhibits IL-12-induced Th1 differentiation [19]. Different IgG subclasses fulfill distinct biological functions, and thus their relative production is an important consideration when evaluating protection by a vaccine candidate [20, 21]. For example, in mice, a dominant type 1 antibody response is associated with opsonophagocytosis and clearance of extracellular encapsulated bacteria, like *S. suis* [10, 22, 23]. In pigs, the concept of type 1/type 2 IgG subclasses is not completely documented. Crawley *et al.* [24] determined that porcine Th1 cytokines, IFN- $\gamma$  and IL-12, induce an IgG2 profile in pigs and that porcine IgG2 activates complement more efficiently than IgG1. In this regard, recent studies suggested that swine IgG2 antibodies are more capable of opsonization than IgG1 antibodies [10, 25].

Adjuvants can dramatically influence the vaccine-induced antibody response including bias to type 1 or type 2 responses, which may have a significant effect on the protective efficacy of a vaccine [26, 27]. For instance, *S. suis* protein candidates may behave as protective [14, 22] or non-protective [12, 28] immunogens at least in part depending on the adjuvant. Compared to human medicine, a wider range of adjuvants has been successfully used in commercial vaccines for animals and several new technologies are currently in preclinical development (reviewed in [29, 30]). These adjuvants include traditional mineral salt-based adjuvants, oil-in-water/water-in-oil emulsions and saponins. In addition, pathogen-associated molecular patterns, such as Toll like receptor (TLR) ligands, are known immunomodulators that are increasingly recognized as critical components of many modern vaccines. However, the potential of these adjuvants (either traditional or modern ones) to drive the desired type of adaptive immune response when

combined to an immunogenic vaccine candidate is generally unknown or poorly characterized in veterinary medicine. Very frequently, the choice of adjuvants is based on theoretical assumptions of their expected type 1 or type 2 polarizing properties, or on their previous use in vaccine formulations in the veterinary or swine field.

Consequently, in the present study, an *in vitro* porcine bone marrow-derived dendritic cell (bmDC) culture was used as a model for evaluating immune polarization induced by different adjuvants when administrated with immunogens that have the potential to become vaccine candidates if appropriately formulated. We hypothesize that this *in vitro* model can reduce the number of animals used in pre-clinical trials by providing fundamental immunological knowledge on selected vaccine formulations (from several possible ones) that would deserve further analysis in animal trials. To develop this *in vitro* system, different *S. suis* antigens (enolase, CPS and its conjugated form) were used to evaluate whether the *in vitro* bmDC culture can differentiate the immunogenic potential of the antigen in combination with different polarizing adjuvants.

## **Materials and methods**

### **Purification of *S. suis* enolase**

Cloning and purification of enolase were performed as previously described [11]. Briefly, the gene coding for enolase was amplified by PCR and was cloned into pET-32a vector (Novagen, Madison, WI). The plasmid pET-32a-Enolase was introduced into *E. coli* BL21DE3 for IPTG-inducible expression of recombinant enolase. The protein was purified by His-Bind® Resin chromatography (EMD Millipore Corp, Billerica, MA) through the His-tagged fusion according to the manufacturer's protocol. Protein-containing fractions were determined by NanoDrop® ND-1000 (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA). The purity of enolase fractions was verified by Western blotting using optimally diluted monospecific rabbit anti-enolase IgG and peroxidase-conjugated goat anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch, Baltimore, PA), as previously described [11]. Final protein concentration was measured by Pierce™ BCA Protein Assay kit (Thermo-Fisher Scientific).

### **Production and purification of *S. suis* CPS and its conjugate**

*S. suis* serotype 2 CPS was produced and purified as previously described [31, 32]. Preparation of CPS and tetanus toxoid protein (TT), covalent coupling of CPS to TT and characterization of the obtained glycoconjugate was performed as previously described [15]. Briefly, purified CPS was depolymerized by ultrasonic irradiation to a  $M_w$  of 115 kDa, then 10% of the capsular sialic acids (Neu5Ac) were mildly oxidized by treating with sodium periodate in order to introduce functional aldehydes for subsequent conjugation to TT, used as the carrier protein. The TT monomer was purified by gel filtration chromatography before conjugation. The glycoconjugate was produced using a molar mixture of 2 oxidized CPS chains : 1 TT which was conjugated by reductive amination for 48 h. The conjugation was stopped by the addition of sodium borohydride to reduce the remaining free aldehydes for 1 h. The resulting conjugate was desalted by extensive dialysis against water and lyophilized. To obtain a representative control of unconjugated CPS for this study, a sample of the same oxidized CPS used for conjugation was

reduced, desalted and lyophilized in the same manner as the conjugate. Purified TT was also included as control.

### **Production of porcine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (pGM-CSF)**

CHO-K1/pGM-CSF stable cell line was established in our laboratory and was derived from the CHO-K1 cell line (ATCC<sup>®</sup> CCL-61<sup>™</sup>, Manassas, VA). Briefly, target gene of pGM-CSF was synthesized and then cloned into a mammalian expression vector to make the expression construct. CHO-K1 cells were transfected with plasmid encoding pGM-CSF and stable clones were obtained by selection using geneticin (G418, Gibco, Invitrogen, Thermo-Fisher Scientific). A number of positive clones were selected for further evaluation after culturing for 10 passages. Based on Western blot analysis with monoclonal anti-porcine GM-CSF antibody (MAB711; R&D systems, Mineapolis, MN) clones 10, 25 and 30 were selected for final use. For pGM-CSF production, CHO-K1/pGM-CSF cells were suspended at  $5 \times 10^5$  cellules/ml in DMEM F12 supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-Glutamine and 600 µg/ml of geneticin. All reagents were from Gibco. Cells were initially cultured in T25 flasks and then sub-cultured in T75 flasks (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator for approximately two days until confluence. For sub-culturing, cells were washed with a 2% of EDTA-PBS solution and detached with 0.25% of trypsin for 1 min. For final pGM-CSF production, cells were cultured in T75 flasks in complete medium without geneticin for five days. Finally, supernatants were recovered and centrifuged twice at 830 g for 10 min at room temperature. The supernatant was recovered, aliquoted and stored at -80°C.

### **Animals**

Bone marrow cells were obtained from 6-8 week-old piglets. The animals originated from a herd free of major important diseases such as porcine reproductive and respiratory syndrome, enzootic pneumonia due to *Mycoplasma hyopneumoniae* and clinical disease related to porcine circovirus. The herd did not have any episode of acute disease related to *S. suis* when the samples were taken. All experiments involving animals were conducted in accordance 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 by the Animal Welfare Committee of the University of Montreal.

### **Isolation of porcine bone marrow cells**

Bone marrow was aseptically removed from the femurs of ten different animals and separately processed using endotoxin-free solutions and materials. Briefly, after removal of muscle tissue, femurs were sliced and stirred in 1 L of PBS for 2 h at room temperature. The PBS suspension containing released bone marrow cells was recovered, filtered through gauzes and centrifuged at 250 g for 10 min at 4°C. After red blood cell lysis (eBioScience, San Diego, CA), cells were washed, filtered through a 40 µm- cell strainer (BD Falcon<sup>TM</sup>, Bedford, MA), and resuspended at approximately  $1-3 \times 10^7$  cells/ml in a cryopreservation solution containing 95% of FBS and 5% of dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) and stored in liquid nitrogen until use.

### **Generation of porcine bone marrow-derived dendritic cells (bmDCs)**

Bone marrow cells were thawed and resuspended in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES, 100 U/ml penicillin-streptomycin, and 1 µg/ml gentamycin. All reagents were from Gibco. Complete medium was complemented with either 1/50 dilution of pGM-CSF supernatant or with 100 ng/ml commercial porcine recombinant (r)GM-CSF (R&D system), as previously described [33]. Then,  $2.5 \times 10^6$  cells/well were cultured in 6 well-tissue culture plates (Falcon®, Corning, Tewksbury, MA) for 8 days at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator and were fed on days 3 and 6 with fresh complete medium. On day 8, cells were harvested, washed, and used as immature DCs for the studies. DC phenotype and purity was confirmed by FACS as described below.

## **DC phenotype analysis by FACS**

Obtained porcine bmDCs were phenotypically characterized by the following markers: MHC-I, MHC-II, CD4a, CD16, CD14, CD11R1, SWC3 and CD1, as previously described [33, 34]. Commercially available monoclonal antibodies from AbD Serotec (Kidlington, Oxford, United Kingdom) were used to detect swine MHC-I (clone JM1E3), MHC-II (clone 2E9/13), CD16 (clone G7), CD4a (MIL17). Monoclonal antibody against swine CD11R1 (clone MIL4) and CD14 (clone MIL2) were from Bio-Rad (Kidlington, Oxford, United Kingdom). Monoclonal antibody against swine CD1 (clone 76-7-4) was from Abcam Inc (Cambridge, MA). A hybridoma specific for SCW3 was used (clone 74.22-15A; ATCC HB-142.1). Antibodies against MHC-I, MHC-II, CD16, CD1 and CD4a were conjugated to FITC. A PE-conjugated goat anti-mouse IgG (Leinco Technologies Inc, St Louis, MO) was used for labelling CD11R1, CD14 and SCW3. The staining and FACS analysis were performed as previously described for swine bmDCs [33] using a FACS BD Accuri C6 Cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA).

## ***In vitro* bmDC stimulation assay**

Bone marrow DCs were resuspended at  $10^6$  cells/ml in complete medium and plated into 24 well-culture plate (Falcon®). Then different activators were added. Four different antigens were used: enolase at 50 µg/ml (the concentration was chosen based on a preliminary dose response study, see **Supplemental Figure S1**); CPS at 25 µg/ml; TT at 25 µg/ml; CPS-TT conjugate at 25 µg/ml (these concentrations were chosen based on [15]). Several categories of adjuvants were evaluated: the TLR-ligand polyinosinic-polycytidylic acid (Poly I:C; Novusbio, Oakville, ON, Canada), was added at 50 µg/ml; the saponin Quil A® (Brenntag Biosector, Frederikssund, Denmark), was added at 5 µg/ml; Alhydrogel 2%® (Brenntag Biosector), composed of aluminum hydroxide, was added at 50 µg/ml; the water-in-oil emulsion TiterMax Gold® (Cytrx Corporation, Norcross, GA) emulsified 1:1 (v/v) with antigens and the water-in-oil emulsion Stimune® (Prionics, Lelystad, Netherlands) emulsified 5:4 (v/v) with antigens were added at 100 µl/well to culture plates. Concentrations of different adjuvants were chosen upon a preliminary selection based on the literature [12, 15, 22, 35-40] and finally established by a dose response study of toxicity levels and cytokine production (described below). The preparation of adjuvants-

antigens mixtures followed manufacturer's recommendations. To avoid any influence of possible endotoxin contamination during cell stimulation assays, polymyxin B sulfate (Sigma) at 20 µg/ml was added to the cultures. At 24 h of incubation, supernatants were collected for cytokine quantification by ELISA, as described below.

### **Cytokine quantification by ELISA**

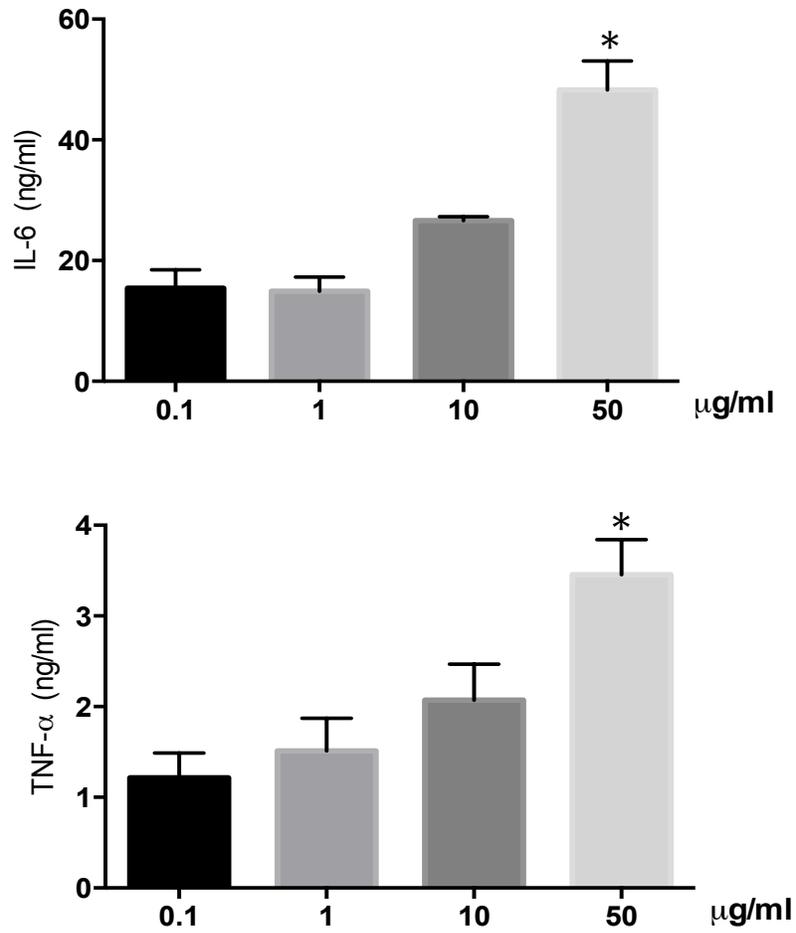
Levels of IL-12p40, TNF- $\alpha$  and IL-6 in cell culture supernatants were measured by sandwich ELISA using pair-matched antibodies from R&D Systems or Invitrogen according to the manufacturer's recommendations. Twofold dilutions of recombinant porcine cytokines were used to generate the standard 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.

### **Cell toxicity test**

Cell toxicity induced by different adjuvants was evaluated by measuring release of lactate dehydrogenase enzyme (LDH) with the CytoTox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, Madison, WI) as previously described [41].

### **Statistical analysis**

Data were transformed using the logarithm base 10 to normalize distributions. A linear mixed model was used to compare the various treatments. The random factor was the animal and the fixed factor was treatment. The model also included uneven variances for the various treatments. A priori contrasts were performed to compare pairs of means adjusting the alpha level for each comparison using the Benjamini-Hochberg sequential adjustment procedure. The nominal alpha level was set at 0.05 throughout. Statistical analyses were carried out with SAS v.9.4 (Cary, N.C.). This method was applied for analysis of data displayed in Figures 1 and 2 (n = 10). All other data were analyzed for significance using Student's unpaired t-test, SigmaPlot (version 11.0). A *P* value < 0.05 was used as a threshold for significance.



**Supplemental Figure S1. Dose-response to select optimal enolase concentration for in vitro bmDC studies.** Swine bmDCs derived from 2 different animals were incubated with different concentrations of purified enolase. Cytokine levels in cell culture supernatants were measured by ELISA and data expressed as ng/ml.

## Results

### Characterization of bmDCs differentiated by *in house*-prepared pGM-CSF

Expression of cell surface markers by porcine bmDCs was assessed by FACS after 8 days of culture with the *in house*-produced pGM-CSF supernatant in comparison to commercial swine rGM-CSF (**Table I**). Cells were shown to be MHC-I<sup>+</sup>, MHC-II<sup>+</sup>, SWC3<sup>+</sup>, CD1<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD11R1<sup>-</sup> and CD4a<sup>low/-</sup>, as previously described [33, 42]. Dose-response studies showed that final 1/50 dilution of pGM-CSF supernatant was optimal for the generation of bmDCs *in vitro* (data not shown). No significant differences were observed in bmDC phenotype obtained by culturing in presence of *in house*-prepared pGM-CSF compared to that obtained when using commercial rGM-CSF (**Table I**). These results suggest that the use of a CHO-K1/pGM-CSF stable cell line to generate the growth factor is an efficient and low-cost alternative to use of commercial rGM-CSF, especially when large numbers of bmDCs are required. Indeed, the total yield of differentiated bmDCs per animal was of approximately  $1 \times 10^8$  bmDCs.

**Table I.** Surface phenotype of bmDCs after 8 days differentiation using either pGM-CSF supernatant or commercial rGM-CSF.

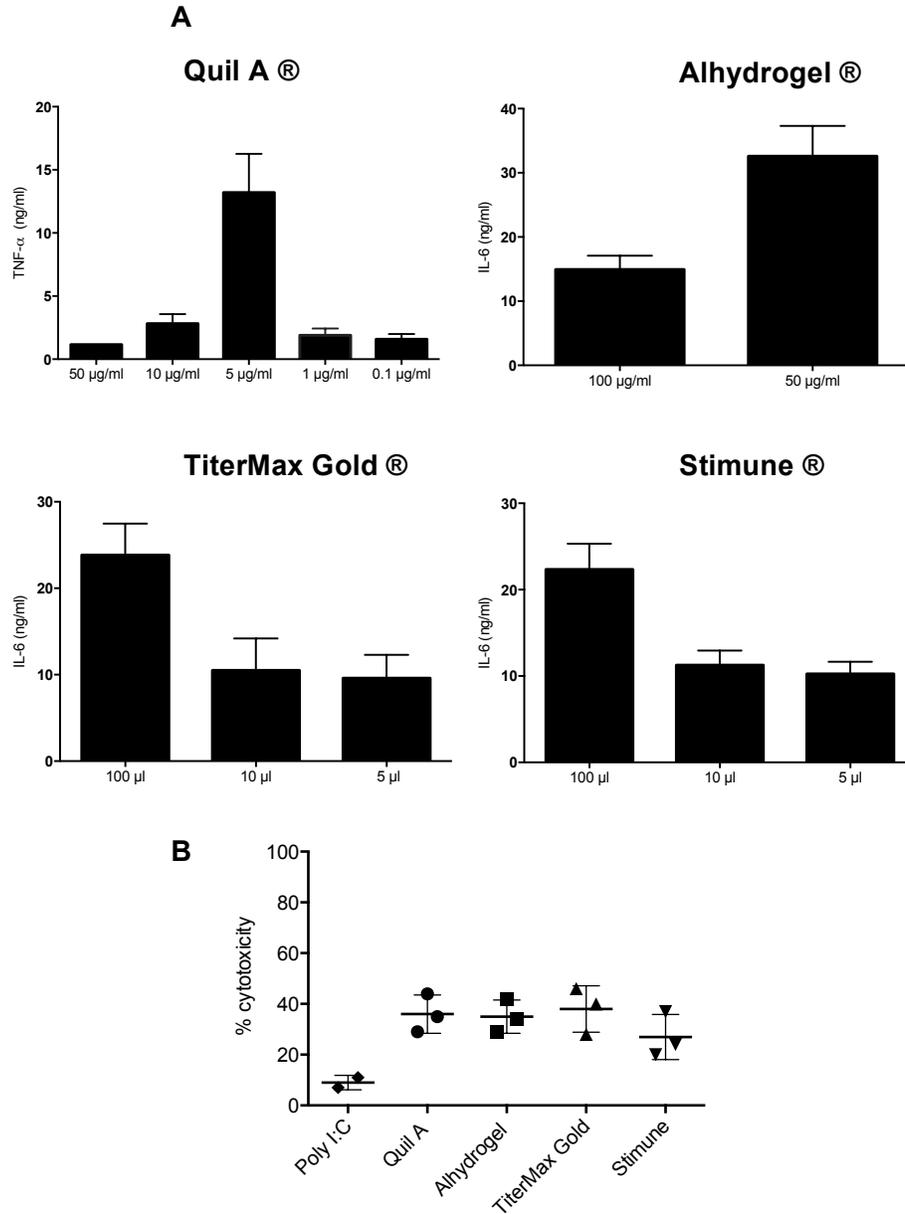
Marker	pGM-CSF supernatant (% positive cells) <sup>a</sup>	rGM-CSF commercial (% positive cells) <sup>a</sup>
MHC-I	89 ± 6	90 ± 7
MHC-II	85 ± 6	86 ± 9
SCW3	88 ± 4	86 ± 5
CD1	69 ± 3	67 ± 5
CD16	89 ± 2	93 ± 2
CD14	79 ± 2	84 ± 3
CD4a	14 ± 2	9 ± 5
CD11R1	4 ± 1	2 ± 1

<sup>a</sup> Mean ± SEM of four independent experiments using the supernatants of three CHO-K1/pGM-CSF stable cell line clones or from three independent experiments using commercial swine rGM-CSF.

## Dose response and cytotoxicity of selected adjuvants

When using adjuvants to activate immune cells in a closed system, as it is the case of a culture well, the main challenge is to find the optimal concentration that will preserve the adjuvant properties but with the least possible toxic effect towards cells. To this aim, bmDCs were activated with different concentrations of the following adjuvants: Poly I:C (a synthetic double stranded RNA that activates multiple elements of the host defense, mainly through recognition by TLR3 [43]); Quil A® (a saponin belonging to the group of glycosides commonly found in plants that have been tested and commercialized for use in animals [29]); and Alhydrogel® (an aluminium-based adjuvant, generically referred to as ‘alum’, already described in 1926 and currently the most widely used in humans and animals [44]). In addition, different added volumes of the emulsifying adjuvants TiterMax Gold® and Stimune® were evaluated. TiterMax Gold® is a water-in-oil adjuvant consisting of squalene as metabolizable oil, sorbitan monooleate 80 as an emulsifier, CRL8300 block copolymer and microparticulate silica as stabilizers. TiterMax Gold® was developed as a superior alternative to Freund’s adjuvant providing comparable titers with fewer injections and less undesired reactivity in mice [45]. Stimune® (also known as Specol) is a water-in-oil adjuvant composed of purified and defined mineral oil (Marcol 52) with Span 85 and Tween 85 as emulsifiers [46].

Cell toxicity and cytokine production were assessed in parallel. The concentration of Poly I:C (50 µg/ml) was chosen according to Mussa *et al.* [35], and induced very low cell toxicity (**Supplemental Figure S2B**). In spite of low to moderate toxicity, the highest production of cytokines was obtained with 5 µg/ml of Quil A®, 50 µg/ml of Alhydrogel®, and 100 µl/well of TiterMax Gold® and Stimune® emulsions (**Supplemental Figure S2A and B**). Induction of some level of toxicity is an adjuvant feature also observed *in vivo* [46, 47] that might also contribute to the activation of immune cells at the site of the injection. Regardless of this effect in our *in vitro* culture system, a clear enhancement and polarization of DC activation is observed when combining the adjuvants with an antigen (see below), suggesting that culture conditions were adequately standardized.



**Supplemental Figure S2. Dose-response and toxicity trials to select optimal adjuvant dose for in vitro bmDC studies.**

(A) BmDCs derived from 3 different animals were incubated with different concentrations of adjuvants and cytokine levels in cell culture supernatants were measured by ELISA (data expressed as ng/ml). The adjuvant Poly I:C alone failed to induce significant levels of cytokine production by bmDCs and it was thus not included in Panel A. Representative cytokines were chosen (upon the type 1/type 2 profiles) for other adjuvants. (B) Cytotoxicity was evaluated by the lactate dehydrogenase (LDH) enzyme test after bmDC activation with adjuvant concentrations which gave the highest production of cytokine in (A), that is: Quil A®: 5 µg/ml; Alhydrogel®: 50 µg/ml; TiterMax Gold®: 100µl/well of emulsion; and Stimune®: 100 µl/well of emulsion. Poly I:C was used at 50 µg/ml. Data of individuals are presented including mean ± SEM (n = 3).

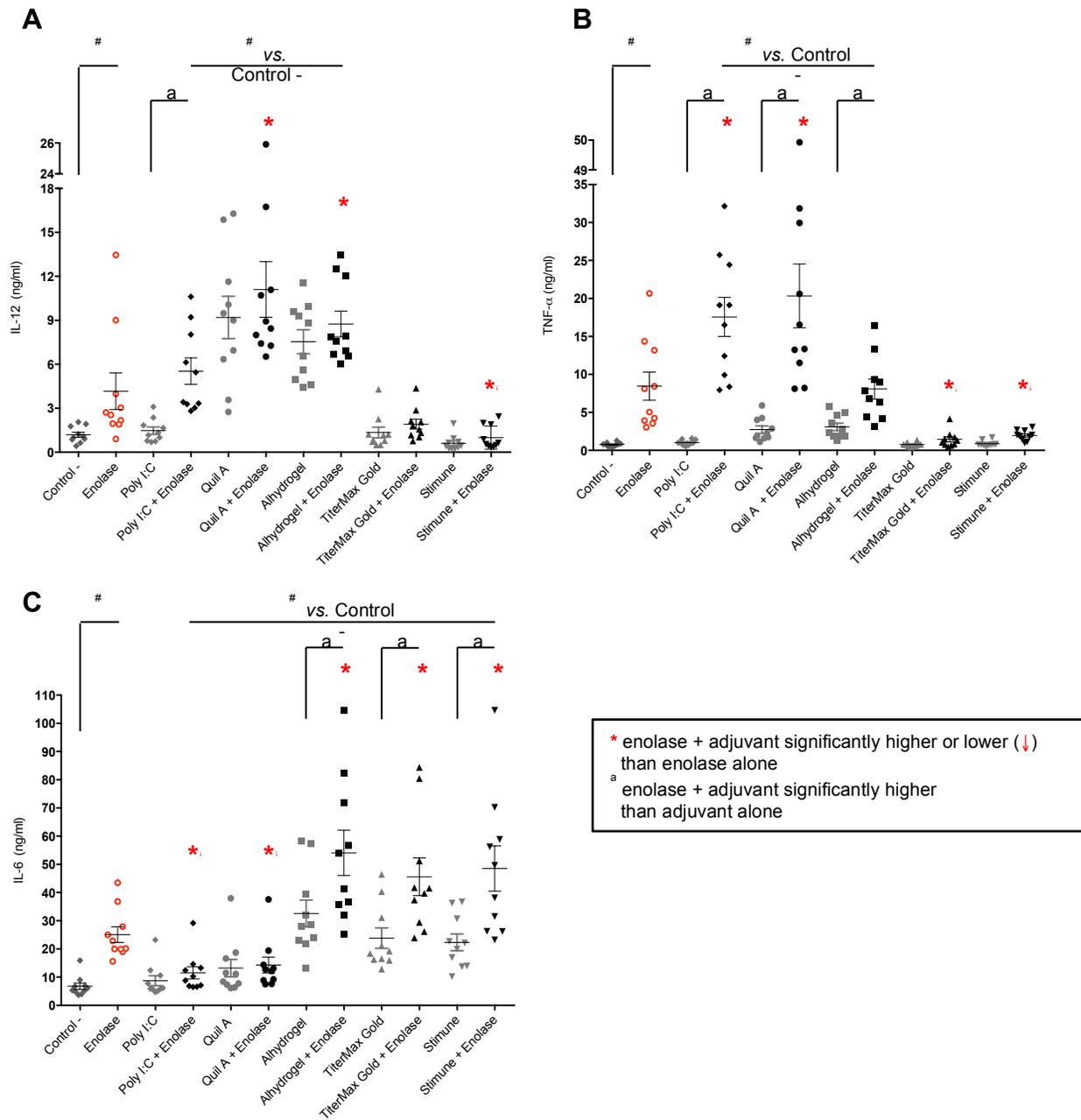
## Adjuvants intensify the bmDC activation potential of a protein antigen

To determine the ability of adjuvants to increase the activation of bmDCs induced by the vaccine candidate enolase, each adjuvant alone or in combination with enolase (at the selected doses) was incubated with bmDCs during 24 h, then the production of type 1 or type 2 signature cytokines (namely IL-12, TNF- $\alpha$  and IL-6) was measured. As shown in **Figure 1**, enolase alone induced significant levels of the three evaluated cytokines when compared to non-activated cells (used as negative control). The adjuvant Poly I:C alone failed to induce significant levels of cytokine production by bmDCs. Yet, when combined with enolase a synergistic effect on TNF- $\alpha$  and, to a lesser extent, on IL-12 production is observed (**Figure 1A-B**); whereas levels of IL-6 were reduced (**Figure 1C**). The adjuvant Quil A® alone induced high levels of IL-12 production by bmDCs, which was not further increased by the presence of enolase. Nevertheless, a significant synergistic effect is observed between enolase and Quil A® for TNF- $\alpha$  production (**Figure 1A-B**). Similarly to Poly I:C, enolase-induced IL-6 production is reduced in the presence of Quil A® (**Figure 1C**).

The adjuvant Alhydrogel® alone induced high levels of IL-12 production by bmDCs, which was not further increased by the presence of enolase. On the other hand, this adjuvant induced low levels of TNF- $\alpha$  production and did not modify those induced by enolase (**Figure 1A-B**). In contrast to Poly I:C and Quil A® adjuvants, Alhydrogel® induced high levels of IL-6 production and synergistically enhanced this cytokine release by enolase-activated bmDCs (**Figure 1C**).

The emulsifying adjuvants TiterMax Gold® and Stimune® alone failed to induce IL-12 and TNF- $\alpha$  release by bmDCs. Moreover, they markedly reduced the production of these two cytokines by enolase-activated bmDCs (**Figure 1A-B**). Nevertheless, and similarly to Alhydrogel®, emulsifying adjuvants induced high levels of IL-6 production and showed a synergistic effect on this cytokine release by enolase-activated bmDCs (**Figure 1C**).

These results suggest that adjuvants, in combination with enolase, intensify bmDC activation, although different cytokine patterns are generated.



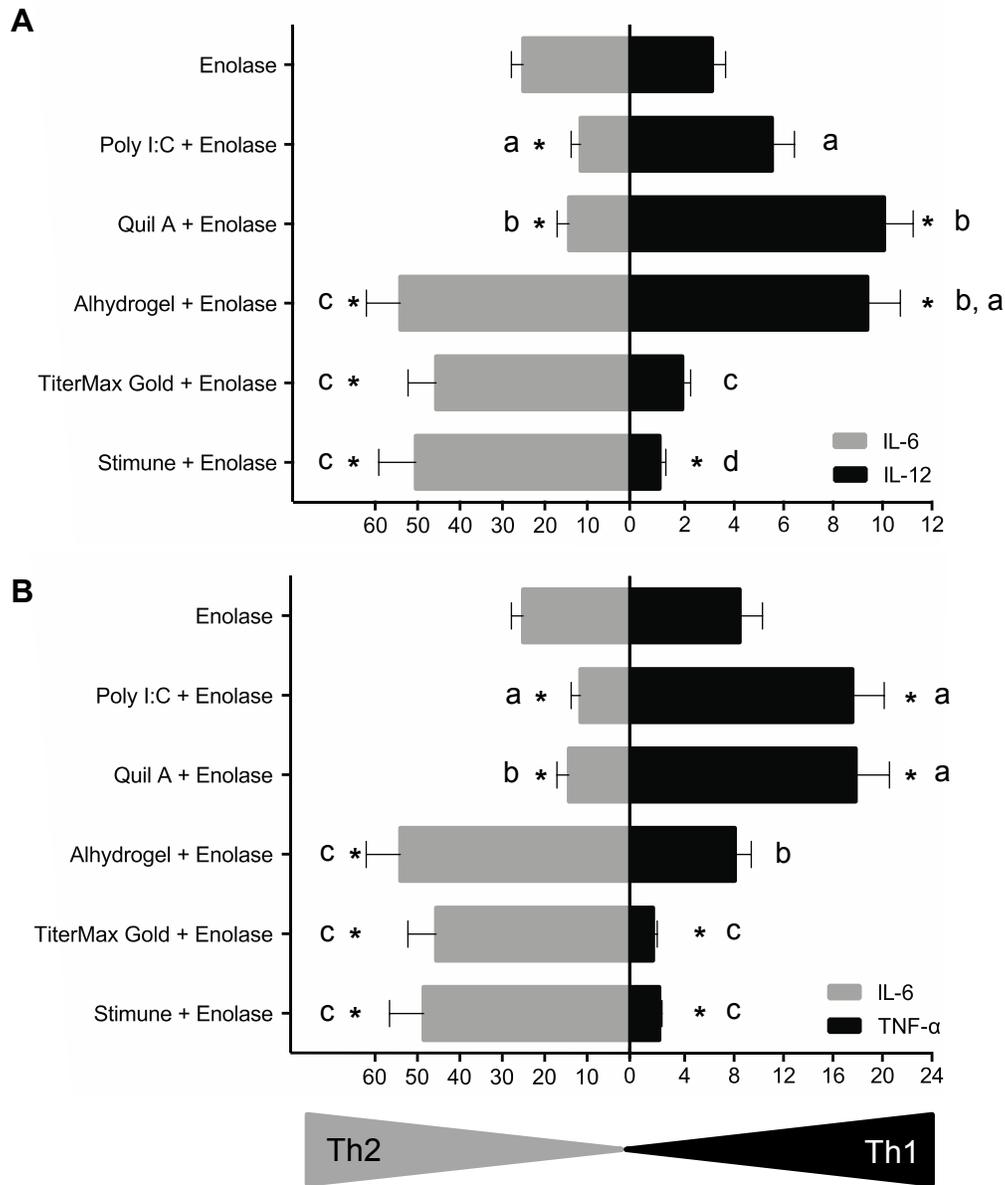
**Figure 1. Cytokine production by bmDCs is differentially modified by enolase in combination with different adjuvants.**

BmDCs derived from 10 different animals were incubated with enolase (50  $\mu$ g/ml – final concentration for all conditions), alone or in combination with the adjuvants Poly I:C (50  $\mu$ g/ml), Quil A® (5  $\mu$ g/ml), Alhydrogel® (50  $\mu$ g/ml), TiterMax Gold® (100  $\mu$ l/well of adjuvant-antigen emulsion) or Stimune® (100 $\mu$ l/well of adjuvant-antigen emulsion). Adjuvants alone were also evaluated. Cells incubated with medium alone served as negative controls (-). Cytokine levels in supernatants were evaluated by ELISA. Data of individuals are presented including mean  $\pm$  SEM in ng/ml (n = 10). <sup>#</sup>  $P < 0.0001-0.0005$ , denotes values that are significantly higher than control (-). \*  $P < 0.0001$ , denotes values obtained with enolase in combination with each adjuvant that are significantly higher or lower than enolase alone. <sup>a</sup>  $P < 0.0001-0.001$ , denotes values obtained with enolase in combination with each adjuvant that are significantly higher than the respective adjuvant alone.

## **BmDCs can distinguish type 1 vs. type 2 adjuvants in combination with enolase**

As different patterns of cytokines were observed depending on the adjuvant used in combination with enolase, a type 1 (IL-12 or TNF- $\alpha$ ) vs. type 2 (IL-6) profile was tentatively established and statistically analyzed. Results of this analysis are displayed in **Figure 2** by either using IL-12/IL-6 or TNF- $\alpha$ /IL-6 comparative expression. Independently of the cytokine combination used for the analyses, enolase alone induced a mixed type1/type 2 cytokine pattern. Poly I:C and Quil A®, biased this response towards a type 1 phenotype by reducing IL-6 production and favoring IL-12 and TNF- $\alpha$  production by bmDCs. Alhydrogel® amplified enolase-induced IL-6 production, although TNF- $\alpha$  levels were maintained and a strong induction of IL-12 release was also observed, altogether suggesting a mixed type1/type2 profile. In contrast, the emulsifying adjuvants TiterMax Gold® and Stimune® significantly diminished enolase-induced production of IL-12 and/or TNF- $\alpha$ ; and favored IL-6 production when compared to enolase alone. These latter observations suggest a type 2 bias of bmDC response to enolase with the two emulsifying adjuvants tested.

As shown by the letters in **Figure 2**, an inter-adjuvant statistical analysis showed that Quil A® and Alhydrogel® have the highest capacity to favor IL-12 production by porcine bmDCs. Quil A® also has the highest capacity to influence TNF- $\alpha$  production, a shared feature with Poly I:C. On the other hand, Alhydrogel®, TiterMax Gold® and Stimune® were equally powerful inducers of IL-6.

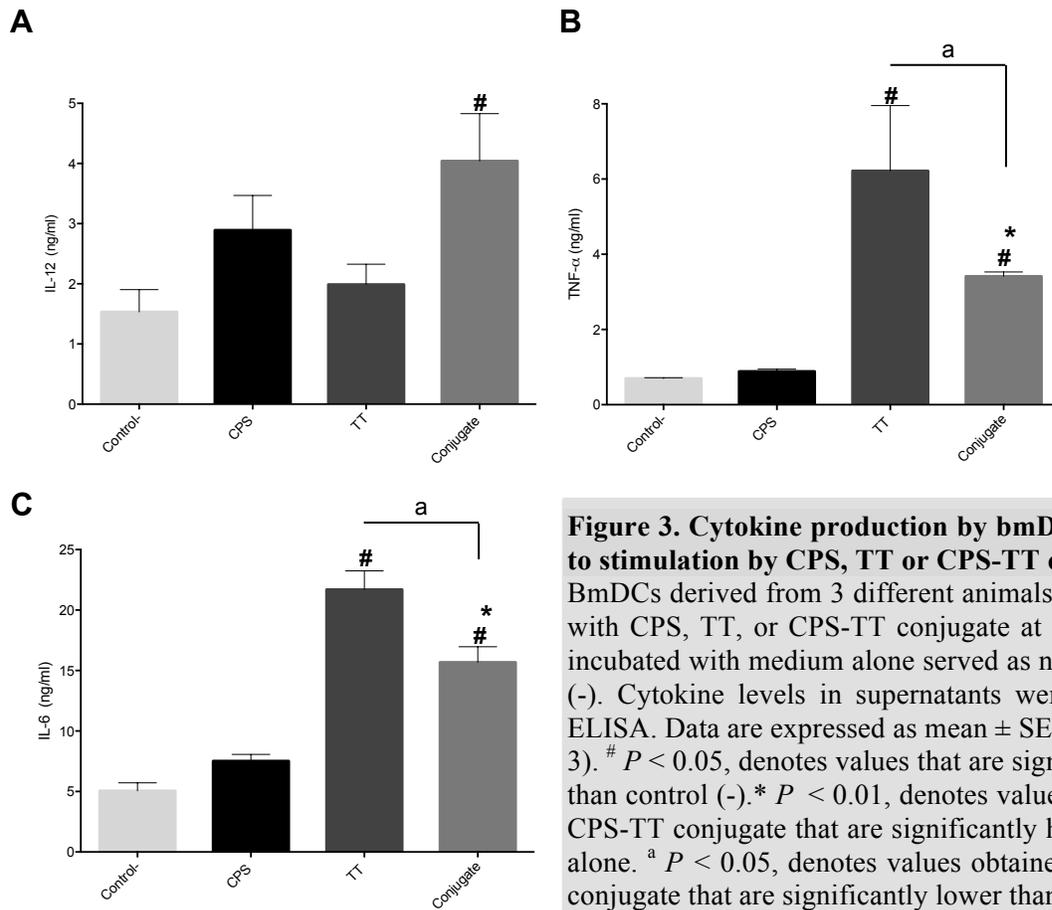


**Figure 2. Type 1/type 2 cytokine profiles of bmDCs stimulated with enolase in combination with different adjuvants.**

Data obtained in Figure 1 using bmDCs derived from 10 different animals and incubated with enolase (50 µg/ml – final concentration for all conditions), alone or in combination with Poly I:C (50 µg/ml), Quil A® (5 µg/ml), Alhydrogel® (50 µg/ml), TiterMax Gold® (100 µl/well of adjuvant-antigen emulsion) or Stimune® (100µl/well of adjuvant-antigen emulsion) were analyzed using a linear mixed model to determine the polarizing effect of adjuvants. Data are expressed as mean ± SEM in ng/ml (n = 10) \*  $P < 0.0001$ , denotes values obtained with enolase in combination with each adjuvant that are significantly higher or lower than enolase alone. Letters indicate differences between adjuvants in their capacity to induce the different cytokines ( $P < 0.0001-0.0005$ ).

### BmDC cytokine response is differentially modulated upon the chemical nature of antigens

To determine the ability of bmDCs to discriminate the immunogenic potential of antigens with diverse chemical nature (polysaccharide, protein or polysaccharide-protein), the effects of CPS, TT or a CPS-TT conjugate were evaluated. As expected [32] and due to its polysaccharide nature, CPS alone failed to induce significant levels of cytokine release by porcine bmDCs (**Figure 3**). The protein TT induced high levels of TNF- $\alpha$  and IL-6, but non-significant levels of IL-12. The CPS-TT conjugate slightly increased IL-12 production when compared to non-stimulated control cells. Compared to CPS alone or control cells, the conjugate also induced higher levels of TNF- $\alpha$  and IL-6. However, levels of these two cytokines were lower than those induced by TT alone, suggesting that the CPS modifies TT activity when the two components are conjugated together.



**Figure 3. Cytokine production by bmDCs in response to stimulation by CPS, TT or CPS-TT conjugate.**

BmDCs derived from 3 different animals were incubated with CPS, TT, or CPS-TT conjugate at 25  $\mu$ g/ml. Cells incubated with medium alone served as negative controls (-). Cytokine levels in supernatants were evaluated by ELISA. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM in ng/ml ( $n = 3$ ). <sup>#</sup>  $P < 0.05$ , denotes values that are significantly higher than control (-). \*  $P < 0.01$ , denotes values obtained with CPS-TT conjugate that are significantly higher than CPS alone. <sup>a</sup>  $P < 0.05$ , denotes values obtained with CPS-TT conjugate that are significantly lower than TT alone.

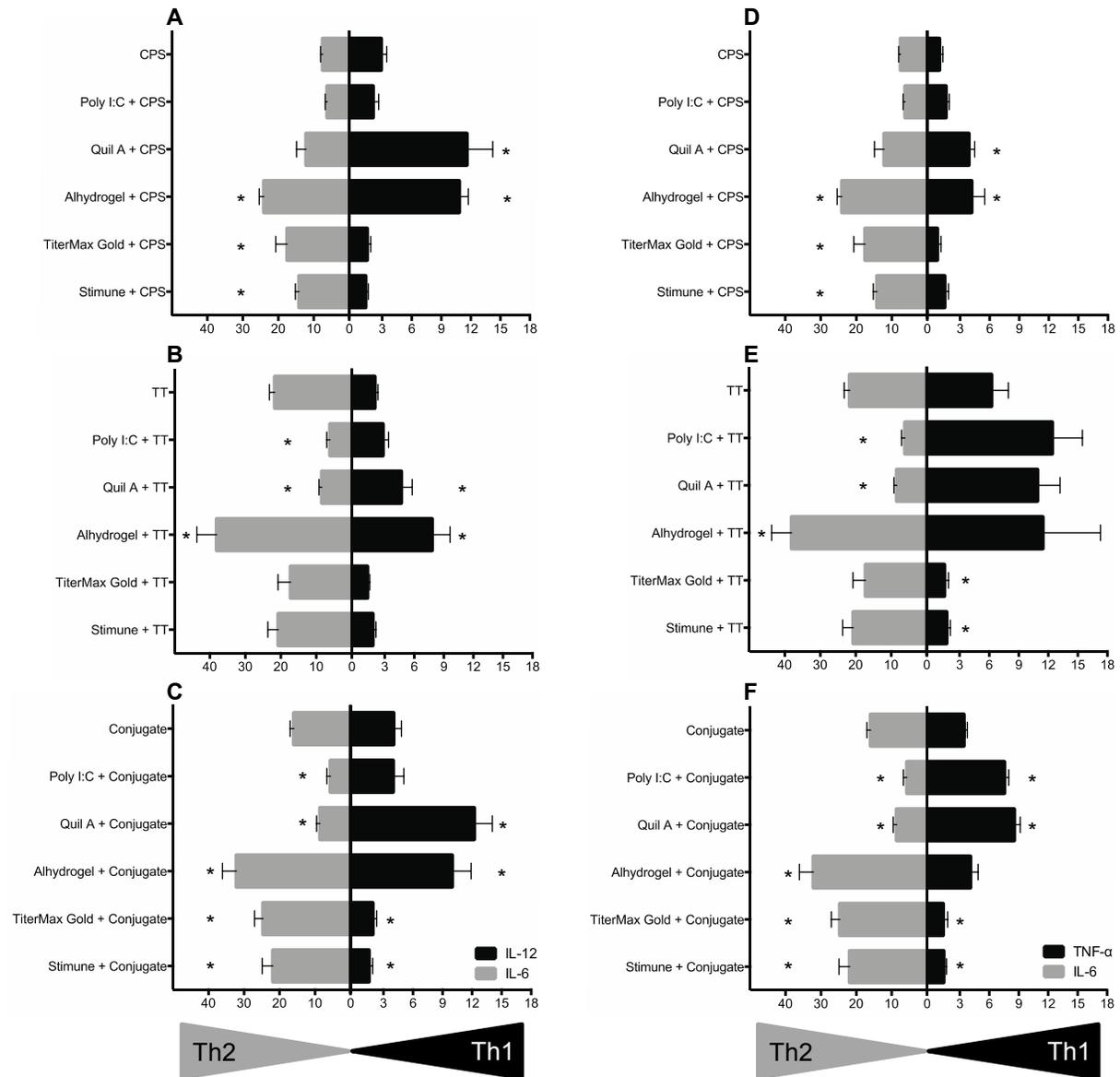
## **BmDC response to type 1 vs. type 2 adjuvants is partially modulated by the chemical nature of the antigen**

In previous experiments, type 1 or type 2 profiles were observed with different adjuvants in combination with enolase. To determine if the capacity of bmDCs to distinguish the polarizing effect of adjuvants depends on the chemical nature of the antigen or the identity of the antigen, type 1 (IL-12 or TNF- $\alpha$ ) vs. type 2 (IL-6) profiles were analyzed using bmDCs activated with CPS, TT, or CPS-TT conjugate in combination with different adjuvants.

As shown in **Figure 4**, in contrast to the results using a protein antigen, Poly I:C failed to overcome CPS unresponsiveness and to polarize the immune response of this polysaccharide antigen. In the case of Quil A<sup>®</sup>, no clear polarizing effect on CPS capacity to activate bmDCs was observed, and IL-12 and TNF- $\alpha$  production by bmDCs seemed to be mainly related to the intrinsic capacity of this adjuvant to induce the release of these cytokines (**Figures 1 and 4**). Similarly, the mixed type1/type2 profile induced by Alhydrogel<sup>®</sup> and the type 2 cytokine profile induced by the two emulsifying adjuvants were not modified/amplified in the presence of CPS (**Figures 1 and 4**).

On the other hand, a bias towards a type 1 phenotype was observed when either TT or CPS-TT conjugate were combined with Poly I:C or Quil A<sup>®</sup>, as previously observed with enolase (**Figure 2**); with a clear suppression of IL-6 production by bmDCs. Nevertheless, the capacity of these adjuvants to enhance TNF- $\alpha$  and/or IL-12 production by TT-stimulated bmDCs was limited when compared to the effect observed in combination with enolase. Furthermore, Quil A<sup>®</sup>-intrinsic capacity to induce production of IL-12 was partially impaired in the presence of TT ( $P < 0.05$ ), but not in the presence of the CPS-TT conjugate (**Figure 4**). A similar effect on Alhydrogel<sup>®</sup>-induced IL-12 production was observed when combined with TT, although a mixed type1/type2 response was still obtained when using Alhydrogel<sup>®</sup> + TT or Alhydrogel<sup>®</sup> + CPS-TT conjugate formulations (**Figure 4**). Finally, in spite of a clear suppressive effect on TNF- $\alpha$  production, the emulsifying adjuvants TiterMax Gold<sup>®</sup> and Stimune<sup>®</sup> failed to provide a type 2 (IL-6) adjuvating effect when formulated with TT, compared to that induced by TT alone. On the other hand, these adjuvants when emulsified with the CPS-TT conjugate promote a bias to a type 2 response; with moderate, but significant, increase in IL-6 production (**Figure 4**). These results

suggest that the amplitude of the adjuvant effect might depend on the chemical nature of the antigen.



**Figure 4. Type 1/type 2 cytokine profiles of bmDCs stimulated with CPS, TT or CPS-TT conjugate in combination with different adjuvants.**

BmDCs (from 3 different animals) were incubated with CPS, TT, or CPS-TT conjugate (25 µg/ml – final concentration for all conditions), alone or in combination with the adjuvants Poly I:C (50 µg/ml), Quil A® (5 µg/ml), Alhydrogel® (50 µg/ml), TiterMax Gold® (100 µl/well of adjuvant-antigen emulsion) or Stimune® (100 µl/well of adjuvant-antigen emulsion). Cytokine levels were evaluated by ELISA. Data are expressed as mean ± SEM in ng/ml (n = 3). \*  $P < 0.05$ , denotes values obtained with CPS, TT or conjugate in combination with each adjuvant that are significantly higher or lower than the antigen alone.

## Discussion

The present work developed a model of porcine bmDC *in vitro* culture for analyzing subunit vaccine candidates with previously reported immunogenic potential in combination with various adjuvants for the control of *S. suis* infections. The use of this model provided fundamental knowledge on the polarizing effect of the adjuvant and thus the expected benefits if included in a vaccine formulation. The generated information would potentially contribute to reducing the number of animals used in pre-clinical trials. Furthermore, this study provides for the first time specific information on **swine** DC immune activation by the adjuvants Quil A®, Alhydrogel®, TiterMax Gold® and Stimune®. This information is highly significant as species-specific responses might be obtained for a given adjuvant, as described below.

In our porcine bmDC *in vitro* culture system, Poly I:C and Quil A® behaves as type 1 polarizing adjuvants. Quil A® alone induces the release of high levels of IL-12 by swine bmDC and, consequently, biases cell activation towards a type 1 profile when combined with an antigen *in vitro*. On the other hand, Poly I:C lacks intrinsic capacity to induce the release of cytokines (at least those evaluated in this study) but it is able to polarize the cytokine profile induced by the antigen. Similarly, it has been reported that this TLR-ligand possesses weak or no stimulatory ability by itself [35, 48], but enhances the release of IL-12 by porcine bmDCs stimulated by the bacterial pathogen *Haemophilus parasuis* [35]. In contrast to swine DCs, human monocyte-derived DCs, purified human CD11c<sup>+</sup> myeloid DCs, or murine bmDCs produce significant levels of IL-12p40/p70 after Poly I:C stimulation [49-51]. In addition, mouse origin DCs also respond with significant levels of TNF- $\alpha$  or IL-6 release after stimulation with this TLR ligand [51-53]. It is unclear whether inter-species differences are also expected in Quil A® capacity to modulate DC activation *in vitro* as no studies are available with human or mouse origin DCs.

Several vaccination trials in swine, including one against *S. suis*, reported the used of Quil A® as adjuvant [22, 54, 55]. In a field swine immunization study, Quil A® induced a biased response towards IgG2 directed against *Taenia solium* antigens [54]. Swine immunization with recombinant *S. suis* Sao protein formulated with Quil A® conferred protection against *S. suis*

infection which was correlated with a predominant IgG2 response [22]. Thus, studies suggest that Quil A® behaves as a type 1 adjuvant in swine, and our *in vitro* data supports this concept. Albeit not completely characterized, when used as adjuvant in swine anti-viral vaccines [56-58], Poly I:C was suggested to induce a type 1 protective response; results with porcine bmDCs confirm this hypothesis, at least when combined with protein antigens.

In mouse immunization models, Poly I:C was also shown to mainly induce a type 1 response against a target viral antigen [59] but a IgG1/IgG2a-balanced response when combined with a protein from *Bacillus anthracis* [60]. The latter result might reflect Poly I:C capacity to induce IL-6 production by mouse cells. Similarly, either a type 1 or a mixed type1/type 2 response is generally reported in mouse models when immunizing with Quil A® in combination with several antigens [22, 61-63]. Interestingly, *S. suis* enolase formulated with Quil A® triggers a strong antibody response in mice, although a balanced type 1/type2 profile was observed [12]. As immunization with enolase + Quil A® failed to protect mice against a *S. suis* challenge, it would be interesting to evaluate if this formulation has a better protective effect in swine, whereas a more marked bias to a type 1 response would be expected.

The cellular and molecular pathways involved in ‘alum’ mechanism of action have been extensively studied [44, 64]. A significant consideration in the selection of alum as an adjuvant, is that alum is universally considered to preferentially support a Th2 immune response, mainly based on mouse models [44, 64, 65]. Immunization of mice with different *S. suis* immunogenic proteins with alum also suggests a favoured induction of a type 2 antibody response [10]. Fewer studies have analyzed alum-polarizing effects in swine. Although an IgG2 response is also observed in pigs vaccinated with alum-adjuvanted vaccines, a higher IgG1/IgG2 ratio is observed, suggesting a predominant Th2 immune response [66, 67]. *In vitro*, swine DCs responded to alum with a mixed type1/type2 cytokine profile. It has been proposed that alum mainly stimulates a Th2 immune response without affecting the Th1 response [67]. Using different immunization protocols, a study showed that type 1 and type 2 components were present in all protocols and it was the balance between the opposing cytokines that determined the final outcome of the humoral response *in vivo* [68]. Thus, the alum polarizing effect remains to be fully characterized in swine models, and more particularly for *S. suis* antigens.

Using the *in vitro* culture of porcine bmDCs we showed that the water-in-oil adjuvants TiterMax Gold® and Stimune® polarize the immune response towards a type 2 phenotype. Stimune® has been largely used in veterinary medicine, including swine vaccination trials against *S. suis* [10, 15, 69, 70]. However, the polarizing effect of this adjuvant after swine immunization has been poorly addressed [10]. A recently reported pig vaccination trial with the *S. suis* CPS-TT conjugate prototype adjuvanted in Stimune® showed a preferential IgG1 isotype switch [15]; confirming our *in vitro* observations with swine DCs. Studies in mice also showed that Stimune® preferentially polarizes the humoral response towards the IgG1 class when combined with either a peptide antigen [40] or a glycoconjugate vaccine [71]. As indicated above, Stimune® is a Marcol 52-based emulsion; and when this mineral oil is used as adjuvant in combination with different *S. suis* immunogenic proteins, it has also been shown to induce a Th2-biased antibody response in mice [10]. In contrast, TiterMax Gold® is a squalene-based adjuvant which has been reported to induce either mixed Th1/Th2 or Th2-polarized humoral responses in mice [15, 72, 73]. Squalene based oil-in-water emulsions (MF59 and AS03) licensed for human use also stimulate a mixed Th1/Th2 cell phenotype [26]. Data on the adjuvant effect of squalene-based emulsions in swine (*in vitro* or *in vivo*) are scarce; however, a study suggested that an AS03-based vaccine might induce a Th2 response in swine [74], supporting our hypothesis that TiterMax Gold® polarize swine DC responses towards a type 2 phenotype. Further studies in swine with these types of emulsions will provide more information on their adjuvant effect.

In a vaccine formulation, not only the adjuvant but also the antigen has the potential to modulate DC functions and the overall adaptive immune response generated by the vaccine. In this study, the polarizing effect of the adjuvants was similar when combined with two different proteins or with a glycoconjugate. However, the magnitude of the response varies, highlighting the need to carefully evaluate the intrinsic properties of the antigen when choosing the adjuvant to be incorporated in the vaccine formulation. Similarly to our *in vitro* results with DCs, mouse immunization studies suggested that the effects of the adjuvants might be antigen-dependent [64, 73]. Finally, we demonstrated *in vitro* that different adjuvants were unable to overcome the poor immunogenicity of purified *S. suis* serotype 2 CPS, a finding that was confirmed in mouse immunization studies [15].

Our data also showed that the overall DC activation might be the result of a simple additive effect or a synergistic effect between the antigen and the adjuvant, or an effect induced by the adjuvant component alone. In addition, when a bias is imposed by the adjuvant, there may be a suppressive effect over a cytokine with consequent enhancement of another one. Within a vaccine formulation, the combination of all these features will dictate the final capacity of the vaccine formulation to modulate DC functions. Signaling pathways induced by adjuvants and involved in the different responses observed are complex and out of the scope of our work; nevertheless our data and those reported in the literature highlight the risk in directly transferring the results observed in other systems (either mouse or human) to swine systems.

The present work suggests that swine bmDCs are able to discriminate the polarizing effect of adjuvants in combination with different antigens, according to the cytokine profile observed. This *in vitro* model was also able to distinguish (with respect to the profile and/or magnitude of the cytokine response) the intrinsic activating capacity of antigens with diverse chemical natures. Although results still remain to be validated *in vivo*, using swine immunizations, this model represents a valuable tool to examine the immunogenic potential of vaccine candidates while also screening for adjuvants favoring the desired immune response. In addition to the importance of the basic immunological knowledge generated by this *in vitro* test, by pre-screening formulations for likelihood of success *in vivo*, this model has the potential to promote the ‘Three Rs’ (“Replacement, Reduction and Refinements”) guiding principle for more ethical use of animals. As recently stated by Perrie *et al.* [75], an adjuvant or vaccine formulation that fails to stimulate DC activation *in vitro* is not likely to be successful *in vivo*. Dissecting the interaction of antigens and adjuvants *in vitro* with professional APCs (such as DCs) is a simple but promising approach that helps to assess the behaviour of a vaccine formulation rapidly. Ultimately, animal testing of leading formulation(s) will be essential [75]. In conclusion, use of *in vitro* methods as a replacement for animal models at the pre-screening stages will certainly reduce numbers of animals used while advancing the vaccinology science. This approach can be used to test other *S. suis* vaccine candidates and accelerate the design of promising sub-unit vaccine against this pathogen.

## **Acknowledgments**

This publication was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada grant to MS (# 342150). Partial support was also obtained from the Swine and Poultry Infectious Diseases Research Centre ('CRIPA'). LM and GGD are recipients of fellowships from CRIPA; GGD is also recipient of a NSERC PhD Award.

## References

1. Gottschalk, M., et al., *Streptococcus suis: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen?* Future Microbiol, 2010. **5**(3): p. 371-91.
2. Segura, M., *Streptococcus suis: an emerging human threat.* J Infect Dis, 2009. **199**(1): p. 4-6.
3. Okura, M., et al., *Current Taxonomical Situation of Streptococcus suis.* Pathogens, 2016. **5**(3).
4. Guillaume Goyette-Desjardins, J.-P.A., Jianguo Xu, Mariela Segura and Marcelo Gottschalk, *Streptococcus suis, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent—an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing.* Emerging Microbes and Infections, 2014.
5. Gottschalk, M., *Diseases of swine, Streptococcosis.* 10th ed. 2012.
6. Baums, C.G., et al., *Immunogenicity of an autogenous Streptococcus suis bacterin in preparturient sows and their piglets in relation to protection after weaning.* Clin Vaccine Immunol, 2010. **17**(10): p. 1589-97.
7. Segura, M., et al., *Initial steps of the pathogenesis of the infection caused by Streptococcus suis: fighting against non-specific defenses.* FEBS Lett, 2016.
8. Fittipaldi, N., et al., *Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent Streptococcus suis.* Future Microbiol, 2012. **7**(2): p. 259-79.
9. Gottschalk, M. and M. Segura, *The pathogenesis of the meningitis caused by Streptococcus suis: the unresolved questions.* Vet Microbiol, 2000. **76**(3): p. 259-72.
10. Segura, M., *Streptococcus suis vaccines: candidate antigens and progress.* Expert Rev Vaccines, 2015. **14**(12): p. 1587-608.
11. Esgleas, M., et al., *Isolation and characterization of alpha-enolase, a novel fibronectin-binding protein from Streptococcus suis.* Microbiology, 2008. **154**(Pt 9): p. 2668-79.
12. Esgleas, M., et al., *Immunization with SsEno fails to protect mice against challenge with Streptococcus suis serotype 2.* FEMS Microbiol Lett, 2009. **294**(1): p. 82-8.
13. Zhang, A., et al., *Identification and characterization of a novel protective antigen, Enolase of Streptococcus suis serotype 2.* Vaccine, 2009. **27**(9): p. 1348-53.
14. Feng, Y., et al., *Streptococcus suis enolase functions as a protective antigen displayed on the bacterial cell surface.* J Infect Dis, 2009. **200**(10): p. 1583-92.
15. Goyette-Desjardins, G., et al., *Protection against Streptococcus suis Serotype 2 Infection Using a Capsular Polysaccharide Glycoconjugate Vaccine.* Infect Immun, 2016. **84**(7): p. 2059-75.
16. Trinchieri, G., *Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity.* Annu Rev Immunol, 1995. **13**: p. 251-76.
17. Shibuya, K., et al., *IL-1 alpha and TNF-alpha are required for IL-12-induced development of Th1 cells producing high levels of IFN-gamma in BALB/c but not C57BL/6 mice.* J Immunol, 1998. **160**(4): p. 1708-16.
18. Mihara, M., et al., *IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions.* Clin Sci (Lond), 2012. **122**(4): p. 143-59.

19. Diehl, S. and M. Rincon, *The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation*. Mol Immunol, 2002. **39**(9): p. 531-6.
20. Vidarsson, G., G. Dekkers, and T. Rispens, *IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 520.
21. Guilliams, M., et al., *The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(2): p. 94-108.
22. Li, Y., et al., *Immunization with recombinant Sao protein confers protection against Streptococcus suis infection*. Clin Vaccine Immunol, 2007. **14**(8): p. 937-43.
23. Michaelsen, T.E., et al., *The four mouse IgG isotypes differ extensively in bactericidal and opsonophagocytic activity when reacting with the P1.16 epitope on the outer membrane PorA protein of Neisseria meningitidis*. Scand J Immunol, 2004. **59**(1): p. 34-9.
24. Crawley, A., C. Raymond, and B.N. Wilkie, *Control of immunoglobulin isotype production by porcine B-cells cultured with cytokines*. Vet Immunol Immunopathol, 2003. **91**(2): p. 141-54.
25. Crawley, A. and B.N. Wilkie, *Porcine Ig isotypes: function and molecular characteristics*. Vaccine, 2003. **21**(21-22): p. 2911-22.
26. Coffman, R.L., A. Sher, and R.A. Seder, *Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work*. Immunity, 2010. **33**(4): p. 492-503.
27. Petrovsky, N. and J.C. Aguilar, *Vaccine adjuvants: current state and future trends*. Immunol Cell Biol, 2004. **82**(5): p. 488-96.
28. Li, Y., et al., *Identification of a surface protein of Streptococcus suis and evaluation of its immunogenic and protective capacity in pigs*. Infect Immun, 2006. **74**(1): p. 305-12.
29. Gerdt, V., *Adjuvants for veterinary vaccines--types and modes of action*. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 2015. **128**(11-12): p. 456-63.
30. Heegaard, P.M., Y. Fang, and G. Jungersen, *Novel Adjuvants and Immunomodulators for Veterinary Vaccines*. Methods Mol Biol, 2016. **1349**: p. 63-82.
31. Van Calsteren, M.R., et al., *Structure determination of Streptococcus suis serotype 2 capsular polysaccharide*. Biochem Cell Biol, 2010. **88**(3): p. 513-25.
32. Calzas, C., et al., *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, 2013. **81**(9): p. 3106-18.
33. Lecours, M.P., et al., *Characterization of porcine dendritic cell response to Streptococcus suis*. Vet Res, 2011. **42**: p. 72.
34. Summerfield, A. and K.C. McCullough, *The porcine dendritic cell family*. Dev Comp Immunol, 2009. **33**(3): p. 299-309.
35. Mussa, T., et al., *Differential interactions of virulent and non-virulent H. parasuis strains with naive or swine influenza virus pre-infected dendritic cells*. Vet Res, 2012. **43**: p. 80.
36. Morefield, G.L., et al., *Role of aluminum-containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells in vitro*. Vaccine, 2005. **23**(13): p. 1588-95.
37. Ghimire, T.R., et al., *Alum increases antigen uptake, reduces antigen degradation and sustains antigen presentation by DCs in vitro*. Immunol Lett, 2012. **147**(1-2): p. 55-62.
38. Cribbs, D.H., et al., *Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with beta-amyloid*. Int Immunol, 2003. **15**(4): p. 505-14.
39. Leenaars, P.P., et al., *Assessment of side effects induced by injection of different adjuvant/antigen combinations in rabbits and mice*. Lab Anim, 1998. **32**(4): p. 387-406.

40. Leenaars, M., et al., *Immune responses and side effects of five different oil-based adjuvants in mice*. Vet Immunol Immunopathol, 1998. **61**(2-4): p. 291-304.
41. Lecours, M.P., et al., *Critical role for Streptococcus suis cell wall modifications and suilysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells*. J Infect Dis, 2011. **204**(6): p. 919-29.
42. Carrasco, C.P., et al., *Porcine dendritic cells generated in vitro: morphological, phenotypic and functional properties*. Immunology, 2001. **104**(2): p. 175-84.
43. Martins, K.A., S. Bavari, and A.M. Salazar, *Vaccine adjuvant uses of poly-IC and derivatives*. Expert Rev Vaccines, 2015. **14**(3): p. 447-59.
44. Marrack, P., A.S. McKee, and M.W. Munks, *Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(4): p. 287-93.
45. Bennett, B., et al., *A comparison of commercially available adjuvants for use in research*. J Immunol Methods, 1992. **153**(1-2): p. 31-40.
46. Stills, H.F., Jr., *Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants*. ILAR J, 2005. **46**(3): p. 280-93.
47. Heegaard, P.M., et al., *Adjuvants and delivery systems in veterinary vaccinology: current state and future developments*. Arch Virol, 2011. **156**(2): p. 183-202.
48. Peng, Y.T., et al., *Modulations of phenotype and cytokine expression of porcine bone marrow-derived dendritic cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. Vet Microbiol, 2009. **136**(3-4): p. 359-65.
49. Verdijk, R.M., et al., *Polyriboinosinic polyribocytidylic acid (poly(I:C)) induces stable maturation of functionally active human dendritic cells*. J Immunol, 1999. **163**(1): p. 57-61.
50. Lore, K., et al., *Toll-like receptor ligands modulate dendritic cells to augment cytomegalovirus- and HIV-1-specific T cell responses*. J Immunol, 2003. **171**(8): p. 4320-8.
51. Alexopoulou, L., et al., *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3*. Nature, 2001. **413**(6857): p. 732-8.
52. Lundberg, A.M., et al., *Key differences in TLR3/poly I:C signaling and cytokine induction by human primary cells: a phenomenon absent from murine cell systems*. Blood, 2007. **110**(9): p. 3245-52.
53. Jeon, Y.T., et al., *Modulation of dendritic cell activation and subsequent Th1 cell polarization by lidocaine*. PLoS One, 2015. **10**(10): p. e0139845.
54. Jayashi, C.M., et al., *Characterisation of antibody responses in pigs induced by recombinant oncosphere antigens from Taenia solium*. Vaccine, 2012. **30**(52): p. 7475-80.
55. Willson, P.J., A. Rossi-Campos, and A.A. Potter, *Tissue reaction and immunity in swine immunized with Actinobacillus pleuropneumoniae vaccines*. Can J Vet Res, 1995. **59**(4): p. 299-305.
56. Thomas, M., et al., *Poly I:C adjuvanted inactivated swine influenza vaccine induces heterologous protective immunity in pigs*. Vaccine, 2015. **33**(4): p. 542-8.
57. Zhang, L., et al., *Toll-like receptor ligands enhance the protective effects of vaccination against porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine*. Vet Microbiol, 2013. **164**(3-4): p. 253-60.
58. Cao, Y., et al., *Poly(I:C) combined with multi-epitope protein vaccine completely protects against virulent foot-and-mouth disease virus challenge in pigs*. Antiviral Res, 2013. **97**(2): p. 145-53.

59. Hu, Y., et al., *Synergy of TLR3 and 7 ligands significantly enhances function of DCs to present inactivated PRRSV antigen through TRIF/MyD88-NF-kappaB signaling pathway*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 23977.
60. Sloat, B.R. and Z. Cui, *Nasal immunization with anthrax protective antigen protein adjuvanted with polyribonucleosinic-polyribocytidylic acid induced strong mucosal and systemic immunities*. *Pharm Res*, 2006. **23**(6): p. 1217-26.
61. Clause, M., et al., *Evaluation of the efficacy of outer membrane protein 31 vaccine formulations for protection against Brucella canis in BALB/c mice*. *Clin Vaccine Immunol*, 2014. **21**(12): p. 1689-94.
62. Xiao, C., Z.I. Rajput, and S. Hu, *Improvement of a commercial foot-and-mouth disease vaccine by supplement of Quil A*. *Vaccine*, 2007. **25**(25): p. 4795-800.
63. Jansen, C., et al., *Immunogenicity of in vitro folded outer membrane protein PorA of Neisseria meningitidis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2000. **27**(3): p. 227-33.
64. Ghimire, T.R., *The mechanisms of action of vaccines containing aluminum adjuvants: an in vitro vs in vivo paradigm*. Springerplus, 2015. **4**: p. 181.
65. Oleszycka, E. and E.C. Lavelle, *Immunomodulatory properties of the vaccine adjuvant alum*. *Curr Opin Immunol*, 2014. **28**: p. 1-5.
66. Rivera, E., A. Daggfeldt, and S. Hu, *Ginseng extract in aluminium hydroxide adjuvanted vaccines improves the antibody response of pigs to porcine parvovirus and Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2003. **91**(1): p. 19-27.
67. Linghua, Z., T. Xingshan, and Z. Fengzhen, *The efficacy of CpG oligodinucleotides, in combination with conventional adjuvants, as immunological adjuvants to swine streptococcal septicemia vaccine in piglets in vivo*. *Int Immunopharmacol*, 2006. **6**(8): p. 1267-76.
68. Comoy, E.E., A. Capron, and G. Thyphronitis, *In vivo induction of type 1 and 2 immune responses against protein antigens*. *Int Immunol*, 1997. **9**(4): p. 523-31.
69. Wisselink, H.J., et al., *Protection of pigs against challenge with virulent Streptococcus suis serotype 2 strains by a muramidase-released protein and extracellular factor vaccine*. *Vet Rec*, 2001. **148**(15): p. 473-7.
70. Wisselink, H.J., et al., *Assessment of protective efficacy of live and killed vaccines based on a non-encapsulated mutant of Streptococcus suis serotype 2*. *Vet Microbiol*, 2002. **84**(1-2): p. 155-68.
71. Campodonico, V.L., et al., *Efficacy of a conjugate vaccine containing polymannuronic acid and flagellin against experimental Pseudomonas aeruginosa lung infection in mice*. *Infect Immun*, 2011. **79**(8): p. 3455-64.
72. Weeratna, R.D., et al., *CpG DNA induces stronger immune responses with less toxicity than other adjuvants*. *Vaccine*, 2000. **18**(17): p. 1755-62.
73. Berhanu, A., et al., *Vaccination of BALB/c mice with Escherichia coli-expressed vaccinia virus proteins A27L, B5R, and D8L protects mice from lethal vaccinia virus challenge*. *J Virol*, 2008. **82**(7): p. 3517-29.
74. De Vleeschauwer, A.R., et al., *Efficacy of an AS03A-adjuvanted split H5N1 influenza vaccine against an antigenically distinct low pathogenic H5N1 virus in pigs*. *Vaccine*, 2012. **30**(37): p. 5557-63.
75. Perrie, Y., et al., *Designing liposomal adjuvants for the next generation of vaccines*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016. **99**(Pt A): p. 85-96.

## **IV. Discussion générale**

## 1. L'activation des DCs porcines par les adjuvants

Pour développer ce modèle *in vitro*, une présélection d'adjuvants a été réalisée selon leur usage fréquent en médecine porcine et/ou vétérinaire, mais aussi en fonction d'études de vaccination antérieures contre *S. suis* sur des modèles murins et/ou porcins.

Cette présente étude dévoile pour la première fois des informations sur les profils d'activation *in vitro* des bmDCs porcines stimulées par les adjuvants choisis, tels que le Quil A®, l'Alhydrogel®, le TiterMax Gold® et le Stimune®, ainsi que des informations plus approfondies sur l'activation des bmDCs par le Poly I:C. Au cours de ce projet de recherche, d'autres adjuvants ont été testés dont trois adjuvants de la série Montanide™ (ISA 25VG, 15A et 35VG) composés d'une émulsion huile-dans-eau, dont leurs usages sont recommandés chez le porc selon la compagnie SEPPIC. Or, leur utilisation n'a pas pu être poursuivie en raison de leur toxicité trop élevée occasionnée *in vitro* sur les bmDCs. *In vivo*, les adjuvants sont généralement en équilibre précaire entre leur efficacité et la toxicité qu'ils peuvent procurer [147]. *In vitro*, travailler sur des cellules immunitaires dans un système clos redouble de vigilance pour éviter d'engendrer un effet toxique sur les cellules, tout en gardant les propriétés de l'adjuvant. Ici, malgré une dose réponse utilisant différents volumes d'émulsions de ces trois huiles (dont la préparation a été suivie selon les recommandations de la compagnie), aucun pouvoir activateur n'a pu être détecté, se traduisant par un haut pourcentage de mort cellulaire supposément dû à la composition de ces adjuvants.

### 1.1. Le Poly I:C

Le Poly I:C est un ARN double brin synthétique se liant aux TLR3 des cellules immunitaires comme décrit dans la partie 3.1 de la revue de littérature [130]. La capacité du Poly I:C à activer les bmDCs porcines a auparavant été décrit dans de précédentes études *in vitro*. À l'image de nos résultats, plusieurs publications ont démontré que la production de cytokines était limitée suite à la stimulation des bmDCs par le Poly I:C seul [148, 149], si ce n'est qu'une faible production d'IL-12p40 identifiée par une étude [148]. En revanche, en présence de *Haemophilus parasuis*, le Poly I:C a permis d'améliorer l'activation des bmDCs porcines tel qu'observé par une augmentation de la sécrétion d'IL-12p40 [149].

L'activité de ce ligand de TLR a aussi été étudiée sur des DCs humaines dérivées des monocytes (MoDC). De façon similaire à nos résultats, la production de cytokines telles que TNF- $\alpha$  et IL-6 par les MoDCs était infime lorsque celles-ci étaient stimulées par le Poly I:C seul [150], alors que deux autres études ont démontré la sécrétion de niveaux significatifs d'IL-12p40/p70 par les mêmes cellules [151, 152]. L'incapacité du Poly I:C à induire le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 par les DCs activées, semble être spécifiques aux DCs d'origines porcines et humaines, car suite à la stimulation des bmDCs murines par ce ligand de TLR, une production de ces deux cytokines a été démontrée [150, 153, 154].

L'effet du Poly I:C a aussi été étudié *in vivo* sur des modèles murins et porcins. Chez la souris, suite à une immunisation contre un antigène viral (provenant du virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin [PRRSV]) utilisant le Poly I:C comme adjuvant, de haut niveau d'IL-12 et d'IFN- $\gamma$  ont été détectés dans les sérums du groupe immunisé, témoignant du développement d'une réponse immunitaire de type 1 [155]. Une seconde immunisation utilisant le Poly I:C combiné à une protéine de *Bacillus anthracis* a induit un ratio IgG1/IgG2a équilibré suggérant le développement d'une réponse immunitaire mixte [156]. Cette dernière observation peut refléter les faits observés *in vitro* et décrits dans le paragraphe précédent, indiquant la sécrétion d'IL-6 par les DCs murines en réponse à la stimulation du Poly I:C. Rappelons que l'IL-6 est une cytokine jouant un rôle dans le développement de la réponse immunitaire de type 2 caractérisée par une commutation de classe des immunoglobulines vers l'IgG1.

Chez le porc la polarisation Th1 ou Th2 du Poly I:C est cependant moins bien caractérisée malgré son usage fréquent en vaccination antivirale [132, 157, 158]. En effet, ce ligand de TLR a été utilisé dans des essais d'immunisations contre le virus influenza [132], le PRRSV [157], et la maladie « foot-and-mouth disease (FMDV) » [158]. Au cours de ces études, les isotypes induits n'ont pas été identifiés, mais une expérimentation *ex-vivo* témoigne la polarisation vers une réponse Th1 représentée par une forte production d'IFN- $\gamma$  suite à la stimulation des cellules mononuclées périphériques du sang par le vaccin [158].

Selon les données exposées dans la littérature, le Poly I:C est suggéré comme adjuvant induisant une réponse immunitaire de type 1. Nos résultats *in vitro* sur les bmDCs porcines confirment ces observations. En effet le Poly I:C, en combinaison avec les différents antigènes, polarise la réponse immunitaire vers un profil de type 1 caractérisé par une diminution d'IL-6 et

une augmentation ou un maintien du profil type 1 (IL-12 et TNF- $\alpha$ ) par rapport aux antigènes seuls. Or, du fait que les isotypes des anticorps induits par une formulation vaccinale contenant le Poly I:C ne sont pas caractérisés *in vivo* chez le porc, la polarisation de cet adjuvant et son efficacité contre *S. suis* devront être déterminés plus précisément par des études vaccinales complémentaires.

## 1.2. Le Quil A®

Le Quil A® est un adjuvant de la catégorie des saponines comme décrit plus en détail dans la partie 3.3 de la revue de littérature de ce mémoire. Alors que cet adjuvant est fréquemment utilisé en vaccinologie porcine, dont contre *S. suis* [41, 159, 160], l'activation et la polarisation type 1 ou type 2 induites par le Quil A® n'ont jamais été abordées *in vitro* sur des DCs porcines. Il s'avère qu'une seule étude a analysé la capacité stimulatrice du Quil A® sur des DCs humaines ou murines [161], or l'effet polarisant *in vitro* de ce dernier reste pour le moins inconnu.

Chez le porc, les études d'immunisation utilisant cette saponine comme adjuvant suggèrent une polarisation vers une réponse immunitaire de type 1. En effet, selon une expérimentation, une majorité d'IgG2 dirigés contre des antigènes recombinants de *Taenia solium* sont détectés suite à une vaccination contre ce pathogène [159]. De façon similaire, une immunisation par une protéine recombinante de *S. suis* (Sao) combinée au Quil A® a permis d'induire une protection contre *S. suis* en corrélation avec une réponse humorale composée majoritairement d'IgG2 [41].

Cette saponine a également fait l'objet de plusieurs expériences sur des modèles murins, dont de nombreuses études ont caractérisé les sous-classes des anticorps découlant des vaccinations. Chez les souris immunisées par la protéine Sao de *S. suis* combinée au Quil A®, les quatre sous-classes d'IgG ont été détectées, avec une dominance de l'IgG2a, suivit d'IgG1, IgG2b et IgG3 [41]. L'ajout de cette saponine à une protéine de la membrane externe de *Neisseria meningitidis* a considérablement amélioré l'immunogénicité du vaccin chez la souris avec une commutation isotypique des immunoglobulines vers IgG2a [162]. D'après ces observations, le Quil A® serait à l'origine d'une réponse immunitaire de type 1 dans le modèle murin, cependant d'autres études témoignent le développement d'une réponse immunitaire mixte

suite aux immunisations utilisant cette saponine. Par exemple, l'énolase de *S. suis* adjuvantée au Quil A® a engendré une forte réponse anticorps chez la souris avec de niveaux similaires des sous-classes des IgG de type 1 et de type 2 [7]. Également, la caractérisation isotypique suite à des immunisations avec un antigène de *Brucella canis* [163] ou de l'ovalbumine [164] tous deux combinés au Quil A® a révélé un profil immunitaire mixte.

D'après les données relevées dans la littérature, nous pouvons suggérer que le profil immunitaire induit par le Quil A® peut dépendre de l'espèce. En effet, nous observons que cette saponine se comporte comme un adjuvant de type 1 chez le porc, alors qu'une réponse plutôt mixte est constatée chez la souris. Selon nos résultats, cet adjuvant induit *in vitro* un profil de type 1, déduit par la production de l'IL-12 et une suppression d'IL-6, et ces données supportent les faits rapportés *in vivo* chez le porc.

### 1.3. L'alhydrogel®

Les adjuvants à base d'aluminium (généralement appelés « Alum ») sont actuellement les plus utilisés en médecine humaine et animale, comme décrits dans la partie 3.4 de la revue de littérature de ce mémoire [145]. L'Alum est universellement connu comme étant spécifique à une réponse immunitaire de type 2. En effet, cette notion a été établie par des observations principalement sur des modèles murins [144, 145, 165]. D'ailleurs, chez la souris, plusieurs essais d'immunisation avec des protéines immunogéniques de *S. suis* combinées à l'Alum ont suggéré l'induction d'une réponse immunitaire de type 2 dominante [3].

En dépit de son usage fréquent en vaccinologie porcine, aucune étude portée sur des immunisations contre *S. suis* n'a analysé les isotypes induits par l'Alum. Ce n'est seulement que des essais de vaccination contre d'autres pathogènes qui rapportent la commutation isotypique générée par cet adjuvant, mais ceux-ci demeurent rares. Par exemple, des études avec des vaccins commerciaux contre le parvovirus et l'*Erysipelothrix rhusiopathiae* ont révélé la présence d'IgG2 mais avec un ratio IgG2/IgG1 inférieure à un [166] ; conséquemment ces observations évoquent le développement d'une réponse immune de type 2. De façon similaire, un vaccin composé d'une bactérie (*Streptococcus* sp.) entière adjuvanté d'Alum a montré une production dominante d'IgG1 chez le porc [167].

Cependant, selon nos résultats *in vitro*, les bmDCs porcines ont répondu à l'Alum par un profil immunitaire mixte type 1/type 2. L'ampleur du profil type 2 caractérisé par l'IL-6 est effectivement similaire à celui de l'IL-12, observé sur nos **Figures 2, 4 et 11**. La corrélation entre les cytokines de type 1 et de type 2 avec le développement des sous-classes IgG1 et IgG2a a été analysée par Comoy *et al* [168], à la suite de différentes immunisations utilisant des combinaisons d'adjuvants et antigènes variées (dont l'adjuvant Alum). Nous savons que, selon des études faites chez la souris, la production de cytokines de type 2 (telles que l'IL-4 et IL-6) stimule le développement d'IgG1, alors que les cytokines de type 1 (telles que IFN- $\gamma$  et IL-12) sont responsables de la génération d'IgG2a. Selon l'étude Comoy *et al* [168], des niveaux d'IL-4, mais aussi d'IFN- $\gamma$  étaient significativement élevés suite à la stimulation des ganglions lymphatiques des souris immunisées par l'Alum. *In vivo*, suite aux vaccinations utilisant cet adjuvant, une détection d'IL-12 ainsi que d'IL-4 sont mesurées, sans l'observation d'IFN- $\gamma$  [168]. Par conséquent, il a été proposé que l'Alum stimule principalement une réponse immunitaire de type 2 sans pour autant affecter le développement de la réponse immunitaire de type 1, observé par la présence d'IL-12 *in vivo* et d'IFN- $\gamma$  *in vitro* [167, 168], ainsi la balance entre les cytokines de type 1 et de type 2 se manifestant *in vivo* déterminerait le résultat final de la réponse humorale [168].

Ainsi, la polarisation de la réponse immunitaire induite par l'Alum reste à être déterminée plus précisément *in vivo* chez le porc. Le profil cytokinique mixte que nous observons dans cette présente étude pourrait refléter une réponse humorale de type 2 chez le porc, qui résulterait d'une balance induite *in vivo* entre les cytokines de type 1 et de type 2. Enfin, nous constatons que l'ampleur de la sécrétion du TNF- $\alpha$  par les bmDCs n'est pas aussi imposante que celle de l'IL-12. Le TNF- $\alpha$  a été décrit chez la souris, comme cofacteur à l'IL-12 pour induire une réponse immunitaire de type 1 optimale [12]. Cette dernière analyse corrèlerait avec la présence d'une balance qui se manifesterait *in vivo* entre les composants de type 1 et de type 2 responsable du devenir de la réponse humorale finale.

#### 1.4. Le TiterMax Gold®

Le TiterMax Gold® est composé d'une émulsion eau-dans-huile constituée d'une huile métabolisable (le squalène), ainsi que d'autres composants décrits dans la partie 3.2.1 de la revue de littérature. Cet adjuvant huileux est considéré comme une alternative à l'utilisation de l'adjuvant de Freund, fournissant des titres d'anticorps comparables tout en procurant moins d'effets indésirables chez la souris [169]. Récemment, le TiterMax Gold® a été utilisé dans un essai vaccinal contre *S. suis* chez la souris et a montré le développement d'une réponse anticorps mixte [8]. Pourtant, d'autres études d'immunisation utilisant cette émulsion avec différents antigènes cibles ont rapporté une réponse humorale de type 2 dans le modèle murin [170, 171].

Chez l'humain, d'autres types d'adjuvants plus sécuritaires à base de squalène (tels que le MF59 et AS03) sont autorisés pour la vaccinologie et révèlent de fortes réponses immunitaires avec un phénotype cellulaire mixte Th1/Th2 [131]. Les données sur l'effet des adjuvants comprenant des émulsions à base de squalène chez le porc (*in vitro* ou *in vivo*) sont rares, excepté une étude qui démontre le développement d'une réponse humorale de type 2 suite à une vaccination utilisant le AS03 comme adjuvant [172].

Dans cette présente étude, nous avons démontré que TiterMax Gold® polarise la réponse des DCs porcines vers un phénotype immunitaire de type 2. D'autres études chez le porc avec ce type d'émulsion fourniront de plus amples informations sur son effet polarisant.

#### 1.5. Le Stimune®

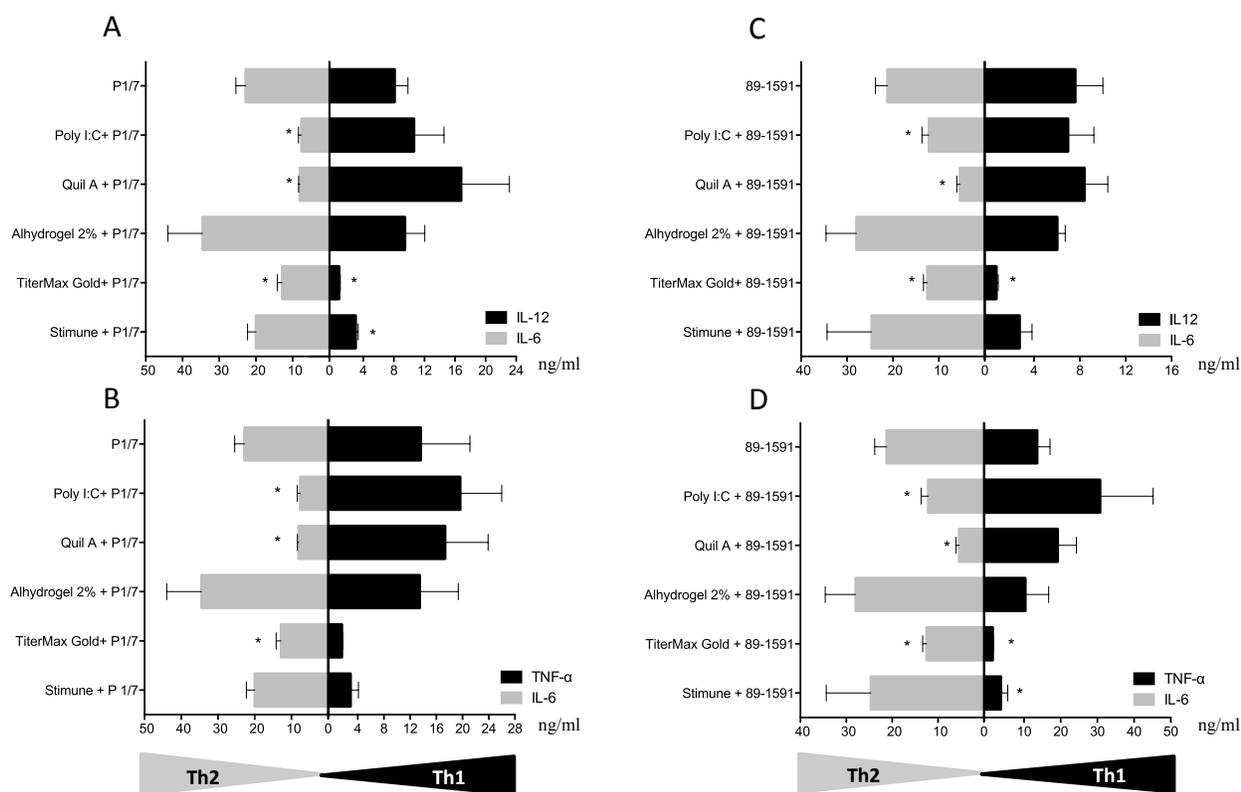
Le Stimune® (également connu sous le nom Specol) est un adjuvant de type eau-dans-huile composée d'une huile minérale purifiée (MARCOL 52) [99] tel que décrit dans la revue de littérature à la partie 3.2.1. Le Stimune® a été largement utilisé en médecine vétérinaire, y compris dans des essais de vaccination chez le porc contre *S. suis* [3, 8, 85, 173]. Cependant, la polarisation de la réponse immunitaire induite par cet adjuvant n'a pas été rigoureusement étudiée chez le porc [3] et sa capacité à moduler l'activation *in vitro* des DCs porcines n'a jamais été explorée jusqu'à présent. Une étude récente a démontré le développement d'une réponse humorale de type 2 à la suite d'une immunisation utilisant un glycoconjugué CPS-TT adjuvanté

au Stimune® chez le porc [8]. Des études chez la souris ont également montré que le Stimune® induit une commutation de classe vers l'isotype IgG1, lorsqu'il est combiné soit avec un antigène peptidique [174] ou avec un vaccin glycoconjugué [175]. De plus, plusieurs immunisations contre *S. suis* chez la souris utilisant différents antigènes peptidiques combinés à l'huile minérale MARCOL 52 (huile que compose l'adjuvant Stimune®), résultent en une réponse immunitaire de type 2 dominante [3].

Les données relevées dans la littérature s'accorderaient avec le profil de type 2 que nous observons *in vitro* sur les bmDCs porcines en réponse à leur stimulation par le Stimune®, et suggèreraient le développement d'une réponse humorale de type 2 *in vivo*.

## 2. L'effet de l'antigène sur la polarisation de l'adjuvant

Dans une formulation vaccinale, non seulement l'adjuvant, mais aussi l'antigène est susceptible de moduler la réponse immunitaire générée par le vaccin. Pour développer ce modèle, différents antigènes potentiels ont été sélectionnés dont leur immunogénicité a été antérieurement établie chez la souris et/ou le porc tels que l'énolase, le conjugué CPS-TT et ses dérivées (CPS et TT). De plus, deux autres formulations de vaccins ont été testés durant cette étude, soit deux bactérines faites à partir des souches de référence de *S. suis* du sérotype 2 : la souche européenne P1/7 décrite comme étant fortement virulente et la souche nord-américaine 89-1591 rapportant une virulence intermédiaire. En effet, les bactérines sont les seuls types de vaccin contre *S. suis* à être utilisés sur le terrain de nos jours [3], et étant donné la variabilité des souches au sein d'un même sérotype il serait intéressant de comparer l'effet de ces deux bactérines provenant de différentes origines géographiques sur les bmDCs porcines *in vitro*. Les profils type 1/type 2 représentés par la sécrétion des cytokines suite à l'activation des bmDCs porcines par les formulations composées de ces deux bactérines mélangées aux différents adjuvants sont représentés sur la **Figure 11** ci-dessous.



**Figure 11.** Profils des cytokines induites par les adjuvants en combinaison avec des bactéries de *S. suis* sérotype 2 faites à partir des souches P1/7 ou 89-1591.

Les DCs porcines ont été activées pendant 24 h avec  $10^9$  CFU/ml de chacune des deux bactéries préparées à partir de la souche européenne (P1/7) ou nord-américaine (89-1591) tuées avec du formaldéhyde, avec ou sans adjuvants : Poly I:C (50  $\mu$ g/ml), Quil A® (5  $\mu$ g/ml), Alhydrogel® (50  $\mu$ g/ml), TiterMax Gold® (100  $\mu$ l/puits de l'émulsion antigène+adjuvant) et le Stimune® (100  $\mu$ l/puits de l'émulsion antigène+adjuvant). Le surnageant a été récupéré pour évaluer le niveau de cytokines par ELISA (mesuré en ng/ml). Les données sont exprimées par la moyenne  $\pm$  SEM venant de cultures de DCs dérivées de 3 porcs différents. \*,  $P < 0,05$  : dont la production de cytokines (ng/ml) obtenue avec les bactéries mélangées aux adjuvants est moins élevée que la production de cytokines induite par les bactéries seules.

D'après nos résultats, nous constatons que l'ampleur de réponse cytokinique varie selon la nature de l'antigène, mais la polarisation type 1/type 2 initiée par chacun des adjuvants est toujours observée de façon similaire indépendamment de la nature de l'antigène présent. Différentes expérimentations ont effectivement démontré que certains antigènes peuvent

influencer la polarisation de la réponse immune. Par exemple dans une étude, des immunisations ont été effectuées avec 4 différentes protéines d'*E. coli* en combinaison avec le même adjuvant, notamment le TiterMax Gold®, et ont démontré que selon l'antigène présent le ratio IgG1/IgG2a augmente ou diminue, et par conséquent une réponse immunitaire se polarise soit vers le type 1 ou le type 2 suivant le type d'antigène [171]. De façon similaire, plusieurs autres études suggèrent que différentes catégories d'antigènes peuvent influencer la polarisation induite par un même adjuvant [8, 169, 170]. En outre, la protéine TT est particulièrement connue pour induire une réponse immunitaire de type 2 selon plusieurs études faites chez la souris [176-178]. Ceci est en accord avec nos résultats. En effet, la production d'IL-6 domine sur l'IL-12 suite à la stimulation des bmDCs par la TT seule comme observé dans les **Figure 3 et 4**. De façon intéressante, lorsque la TT est en combinaison avec les adjuvants considérés de type 1 (Quil A® et Poly I:C), l'ampleur de la réponse type 1 est faible (**Figure 4**) par rapport à ce qui est observé avec d'autres antigènes, comme l'énolase (**Figure 2**).

Tel que décrit dans la revue de littérature, la CPS n'est que faiblement immunogénique dû à sa nature polysaccharidique, et ceci a précédemment été démontré *in vitro* sur des bmDCs murines [67], et soutient nos résultats obtenus à la **Figure 3**. D'après la **Figure 4**, nous avons aussi démontré *in vitro* que les différents adjuvants ne pouvaient pas surmonter la faible immunogénicité de la CPS purifiée de *S. suis* du sérotype 2, de plus cette constatation a été confirmée dans des études de vaccination chez la souris avec ce composant purifié [8, 179]. En effet, combiner la CPS à un adjuvant ne permet pas d'induire des anticorps spécifiques contre cet antigène, car celle-ci est un antigène T-indépendant (tel que décrit dans la revue de littérature).

À propos de la **Figure 11**, nous constatons que les adjuvants, malgré le profil type1/type2 toujours observé, sont incapables d'augmenter l'ampleur de la production de cytokines par rapport aux bactéries seules. Ce qui pourrait sous-entendre que les adjuvants testés n'augmenteraient pas l'immunogénicité des bactéries. Ceci pourrait expliquer au moins en partie, les résultats contradictoires observés avec les bactéries sur le terrain [3], tel que décrit dans la revue de littérature de ce mémoire. Nos résultats obtenus *in vitro* sur les bmDCs porcines pourraient refléter les nombreux échecs de vaccination par les bactéries, et soutiendraient le développement des vaccins sous-unitaires en dépit des vaccins composés de bactéries entières.

Ceci met en évidence la nécessité d'évaluer soigneusement les propriétés intrinsèques de l'antigène à incorporer dans la formulation de vaccin. En effet, la polarisation des adjuvants peut véritablement être antigène-dépendant, et ceci peut compromettre l'efficacité du vaccin. Le modèle *in vitro* développé dans cette étude pourrait présager l'immunogénicité des antigènes ainsi que leur effet sur la polarisation de la réponse immune selon l'adjuvant incorporé dans la formulation.

### 3. Déficit technique du modèle et autres perspectives d'étude

Ce modèle *in vitro* développé au cours de ce projet de maîtrise relève quelques limites, et notamment la toxicité induite sur les cellules *in vitro* par les adjuvants qui est difficilement contrôlable (**Figure S2B**). En effet, les concentrations ou volumes utilisés pour chaque adjuvant, déterminés par des doses réponses (**Figure S2A**), ont procuré en moyenne 30% de toxicité sur les DCs, mais avec l'induction d'une forte production de cytokine (**Figure S2A et B**). De ce fait, il serait intéressant de déterminer en perspective d'étude si l'effet toxique des adjuvants peut être responsable de l'activation des bmDCs *in vitro* et ainsi être confondu avec l'effet de l'adjuvant lui-même.

D'autres cytokines jouant un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire inflammatoire ou humorale en lien avec les différents types de réponse Th pourraient aussi être mesurés par ELISA ou par expression de gènes dans une seconde perspective d'étude, afin de compléter le profil cytokinique. De plus, la détection des chimiokines secrétées par les DCs suite à leur activation par les formulations de vaccins composés d'adjuvants et d'antigènes pourrait nous informer sur le pouvoir attractif de ces différents adjuvants sur les cellules immunitaires.

### 4. L'application de ce modèle d'étude *in vitro* dans le cas de la recherche d'un vaccin contre *S. suis*

Pour le développement des vaccins en médecine vétérinaire, le choix des adjuvants est vaste. Ils sont généralement sélectionnés selon leur polarisation type 1 ou type 2 de la réponse immune en se basant souvent sur des hypothèses théoriques, ou selon leurs utilisations antérieures dans des essais de vaccination chez le porc ou la souris. En l'occurrence, la recherche

d'un vaccin contre *S. suis* débute généralement chez la souris pour un premier dépistage des formulations vaccinales potentielles, pour ensuite être testées chez l'hôte naturel, soit le porc dans ce cas-ci. Cependant, comme sous-entendu dans les paragraphes précédents, un même vaccin composé d'un même adjuvant peut induire des réponses immunitaires différentes selon l'espèce. Ces faits sont notamment observés dans la recherche vaccinale contre *S. suis*. Par exemple, le Quil A® en combinaison avec la protéine Sao ou l'énolase de *S. suis* [7, 41], induit chez la souris une réponse immune préférentiellement mixte, alors que chez le porc une réponse immunitaire de type 1 est observée [41]. Toutefois, il est remarqué qu'en dépit des nombreuses tentatives de vaccination contre *S. suis*, très peu d'études caractérisent les isotypes induits suite aux immunisations, et ce particulièrement chez le porc [3]. C'est le cas notamment de l'Alum et du Stimune®, deux adjuvants souvent utilisés dans les essais de vaccination contre *S. suis*. Par conséquent, une corrélation entre les isotypes et la protection contre *S. suis* initiés par un vaccin est difficilement établie. Ainsi, le choix d'un adjuvant se base essentiellement sur leur efficacité préalablement fondée dans les modèles murins. Or, une comparaison directe entre l'effet protecteur d'un même vaccin chez le porc par rapport à la souris indique en général, une protection plus faible dans le modèle porcin, qui pourrait corrélérer avec les polarisations des réponses immunitaires induites par la vaccination, variant selon les espèces [3].

Grâce à cette présente étude, des informations préliminaires sur la polarisation des adjuvants sur un modèle porcin *in vitro* ont été générées. D'un point de vue global, nous apercevons que nos résultats reflètent (quand disponibles) les polarisations des adjuvants obtenus *in vivo* chez le porc lors des immunisations. La DC, étant une puissante CPA et jouant un rôle critique dans le développement des réponses immunitaires adaptatives, représente un outil adapté pour être employé dans l'étude du comportement de différentes formulations de vaccins. D'une façon simple et rapide, ce modèle *in vitro* pourrait notamment servir comme dépistage intermédiaire entre la souris et le porc et permettrait de sélectionner seulement les formulations vaccinales induisant une activation des DCs ainsi que la polarisation immunitaire recherchée dans le cas de *S. suis* (en l'occurrence une réponse immunitaire de type 1 favorisant le développement d'anticorps opsonisants nécessaire pour éliminer *S. suis* par opsonophagocytose). Il sera évidemment crucial de déterminer si les formulations choisies induisent le profil immunitaire désiré et une protection face à l'infection.

## **V. Conclusions et perspectives**

Ce projet de maîtrise démontre que les DCs porcines seraient un outil précieux dans l'évaluation et le dépistage *in vitro* des candidats vaccinaux et adjuvants dans le cas de la recherche d'un vaccin contre *S. suis*.

En effet, nous avons démontré que les DCs porcines étaient capables de :

- ◆ Discriminer la polarisation induite par des adjuvants (type 1/type 2 ou mixte) en combinaison avec différents antigènes, selon le profil cytokinique observé. Par conséquent, ceci permettrait de sélectionner l'adjuvant favorisant la réponse immunitaire désirée.
- ◆ Distinguer (en termes des profils type 1/type 2, et/ou de l'ampleur de la réponse des cytokines) la capacité d'activation intrinsèque des antigènes de différentes natures, ainsi que leur potentiel immunogénique.

Comme récemment rapporté par Perrie *et al.* [180], une formulation vaccinale incapable d'activer des DCs *in vitro*, sous-entendrait son inefficacité *in vivo*. Comme cela a déjà été mentionné, les DCs sont de véritables chefs d'orchestre de la réponse immunitaire. De ce fait, disséquer *in vitro* l'interaction des antigènes et des adjuvants sur ces cellules est une approche prometteuse qui aiderait à évaluer rapidement et simplement le comportement immunologique d'une formulation vaccinale.

**En perspective**, les résultats obtenus durant cette étude devront évidemment être validés *in vivo* chez l'hôte principal. Les isotypes des anticorps seront mesurés suite aux immunisations afin de déterminer le type et l'amplitude de la réponse immunitaire enclenchée. Une fois confirmé, ce système *in vitro* délivrera des connaissances immunologiques de base sur les différentes formulations vaccinales testées, permettra d'effectuer un dépistage et réduira le nombre d'animaux utilisés en recherche préclinique. Par conséquent, ce modèle *in vitro* répond et respecte la règle d'éthique sur l'utilisation des animaux : la règle des Trois R (« Remplacement, Réduction et Raffinement »).

Au long terme, la culture *in vitro* de DCs porcines facilitera la découverte d'un vaccin sous-unitaire contre *S. suis*.

## **VI. Bibliographie**

1. Gottschalk, M., et al., *Streptococcus suis: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen?* Future Microbiol, 2010. **5**(3): p. 371-91.
2. Segura, M., *Streptococcus suis: an emerging human threat.* J Infect Dis, 2009. **199**(1): p. 4-6.
3. Segura, M., *Streptococcus suis vaccines: candidate antigens and progress.* Expert Rev Vaccines, 2015. **14**(12): p. 1587-608.
4. Athey, T.B., et al., *Complex Population Structure and Virulence Differences among Serotype 2 Streptococcus suis Strains Belonging to Sequence Type 28.* PLoS One, 2015. **10**(9): p. e0137760.
5. Auger, J.P., et al., *Virulence Studies of Different Sequence Types and Geographical Origins of Streptococcus suis Serotype 2 in a Mouse Model of Infection.* Pathogens, 2016. **5**(3).
6. Esgleas, M., et al., *Isolation and characterization of alpha-enolase, a novel fibronectin-binding protein from Streptococcus suis.* Microbiology, 2008. **154**(Pt 9): p. 2668-79.
7. Esgleas, M., et al., *Immunization with SsEno fails to protect mice against challenge with Streptococcus suis serotype 2.* FEMS Microbiol Lett, 2009. **294**(1): p. 82-8.
8. Goyette-Desjardins, G., et al., *Protection against Streptococcus suis Serotype 2 Infection Using a Capsular Polysaccharide Glycoconjugate Vaccine.* Infect Immun, 2016. **84**(7): p. 2059-75.
9. Gerdt, V., *Adjuvants for veterinary vaccines--types and modes of action.* Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 2015. **128**(11-12): p. 456-63.
10. Heegaard, P.M., Y. Fang, and G. Jungersen, *Novel Adjuvants and Immunomodulators for Veterinary Vaccines.* Methods Mol Biol, 2016. **1349**: p. 63-82.
11. Trinchieri, G., *Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity.* Annu Rev Immunol, 1995. **13**: p. 251-76.
12. Shibuya, K., et al., *IL-1 alpha and TNF-alpha are required for IL-12-induced development of Th1 cells producing high levels of IFN-gamma in BALB/c but not C57BL/6 mice.* J Immunol, 1998. **160**(4): p. 1708-16.
13. Mihara, M., et al., *IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions.* Clin Sci (Lond), 2012. **122**(4): p. 143-59.
14. Diehl, S. and M. Rincon, *The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation.* Mol Immunol, 2002. **39**(9): p. 531-6.
15. Crawley, A. and B.N. Wilkie, *Porcine Ig isotypes: function and molecular characteristics.* Vaccine, 2003. **21**(21-22): p. 2911-22.
16. Higgins, R. and M. Gottschalk, *An update on Streptococcus suis identification.* J Vet Diagn Invest, 1990. **2**(3): p. 249-52.
17. Vanier, G., et al., *Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by Streptococcus suis serotype 2.* Infect Immun, 2004. **72**(3): p. 1441-9.
18. Goyette-Desjardins, G., et al., *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, 2014. **3**(6): p. e45.
19. Jansen EJ, V.D.C., *Meningoencephalitis bij varkens door streptococce* T. Tijdschr Diergeneeskd 1951. **76**: p. 453-455.

20. Demoor, C.E., *Septicaemic Infections in Pigs, Caused by Haemolytic Streptococci of New Lancefield Groups Designated R, S, and T*. Antonie Van Leeuwenhoek, 1963. **29**: p. 272-80.
21. Elliott, S.D., M. McCarty, and R.C. Lancefield, *Teichoic acids of group D streptococci with special reference to strains from pig meningitis (Streptococcus suis)*. J Exp Med, 1977. **145**(3): p. 490-9.
22. Gottschalk, M., *Streptococcosis*, in *Disease of swine*, J. Zimmerman, L. Karriker, and A. Ramirez, Editors. 2012: Hoboken, NJ, USA: Wiley-Blackwell. p. 841.
23. R, H. and G. M, *Streptococcal diseases*. . In: Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ (eds.) *Diseases of swine*. Ames, IA: Iowa State University Press,, 2006: p. 769\_783.
24. Hill, J.E., et al., *Biochemical analysis, cpn60 and 16S rDNA sequence data indicate that Streptococcus suis serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are Streptococcus orisratti*. Vet Microbiol, 2005. **107**(1-2): p. 63-9.
25. Okura, M., et al., *Current Taxonomical Situation of Streptococcus suis*. Pathogens, 2016. **5**(3).
26. Guillaume Goyette-Desjardins, J.-P.A., Jianguo Xu, Mariela Segura and Marcelo Gottschalk, *Streptococcus suis, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent—an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing*. Emerging Microbes and Infections, 2014.
27. Mittal, K.R., R. Higgins, and S. Lariviere, *Identification and serotyping of Haemophilus pleuropneumoniae by coagglutination test*. J Clin Microbiol, 1983. **18**(6): p. 1351-4.
28. King, S.J., et al., *Development of a multilocus sequence typing scheme for the pig pathogen Streptococcus suis: identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(10): p. 3671-80.
29. Lachance, C., et al., *Exacerbated type II interferon response drives hypervirulence and toxic shock by an emergent epidemic strain of Streptococcus suis*. Infect Immun, 2013. **81**(6): p. 1928-39.
30. Takamatsu, D., et al., *Streptococcus suis in humans, Thailand*. Emerg Infect Dis, 2008. **14**(1): p. 181-3.
31. Gottschalk, M. and M. Segura, *The pathogenesis of the meningitis caused by Streptococcus suis: the unresolved questions*. Vet Microbiol, 2000. **76**(3): p. 259-72.
32. Fittipaldi, N., et al., *Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent Streptococcus suis*. Future Microbiol, 2012. **7**(2): p. 259-79.
33. Segura, M., et al., *Initial steps of the pathogenesis of the infection caused by Streptococcus suis: fighting against non-specific defenses*. FEBS Lett, 2016.
34. Dominguez-Punaro Mde, L., et al., *Comparison of the susceptibilities of C57BL/6 and A/J mouse strains to Streptococcus suis serotype 2 infection*. Infect Immun, 2008. **76**(9): p. 3901-10.
35. Segura, M., *Fisher scientific award lecture - the capsular polysaccharides of Group B Streptococcus and Streptococcus suis differently modulate bacterial interactions with dendritic cells*. Can J Microbiol, 2012. **58**(3): p. 249-60.
36. Chabot-Roy, G., et al., *Phagocytosis and killing of Streptococcus suis by porcine neutrophils*. Microb Pathog, 2006. **41**(1): p. 21-32.

37. Gottschalk, M.G., S. Lacouture, and J.D. Dubreuil, *Characterization of Streptococcus suis capsular type 2 haemolysin*. Microbiology, 1995. **141 ( Pt 1)**: p. 189-95.
38. Brassard, J., M. Gottschalk, and S. Quessy, *Cloning and purification of the Streptococcus suis serotype 2 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its involvement as an adhesin*. Vet Microbiol, 2004. **102**: p. 87-94.
39. Bonifait, L. and D. Grenier, *The SspA subtilisin-like protease of Streptococcus suis triggers a pro-inflammatory response in macrophages through a non-proteolytic mechanism*. BMC Microbiol, 2011. **11**: p. 47.
40. Roy, D., et al., *The protective protein Sao (surface antigen one) is not a critical virulence factor for Streptococcus suis serotype 2*. Microb Pathog, 2014. **67-68**: p. 31-5.
41. Li, Y., et al., *Immunization with recombinant Sao protein confers protection against Streptococcus suis infection*. Clin Vaccine Immunol, 2007. **14(8)**: p. 937-43.
42. Zhang, A., et al., *IgA1 protease contributes to the virulence of Streptococcus suis*. Vet Microbiol, 2011. **148(2-4)**: p. 436-9.
43. Zhang, A., et al., *Identification of a surface protective antigen, HP0197 of Streptococcus suis serotype 2*. Vaccine, 2009. **27(38)**: p. 5209-13.
44. Ge, J., et al., *Inactivation of dipeptidyl peptidase IV attenuates the virulence of Streptococcus suis serotype 2 that causes streptococcal toxic shock syndrome*. Curr Microbiol, 2009. **59(3)**: p. 248-55.
45. Tan, C., et al., *Cloning, expression and characterization of a cell wall surface protein, 6-phosphogluconate-dehydrogenase, of Streptococcus suis serotype 2*. Vet Microbiol, 2008. **130(3-4)**: p. 363-70.
46. Si, Y., et al., *Contribution of glutamine synthetase to the virulence of Streptococcus suis serotype 2*. Vet Microbiol, 2009. **139(1-2)**: p. 80-8.
47. Vaillancourt, K., et al., *Identification and characterization of a new cell surface protein possessing factor H-binding activity in the swine pathogen and zoonotic agent Streptococcus suis*. J Med Microbiol, 2013. **62(Pt 7)**: p. 1073-80.
48. Pian, Y., et al., *Fhb, a novel factor H-binding surface protein, contributes to the antiphagocytic ability and virulence of Streptococcus suis*. Infect Immun, 2012. **80(7)**: p. 2402-13.
49. Roy, D., et al., *Recruitment of Factor H to the Streptococcus suis Cell Surface is Multifactorial*. Pathogens, 2016. **5(3)**.
50. Ferrando, M.L., et al., *ApuA, a multifunctional alpha-glucan-degrading enzyme of Streptococcus suis, mediates adhesion to porcine epithelium and mucus*. Microbiology, 2010. **156(Pt 9)**: p. 2818-28.
51. Li, Q., et al., *Identification of Novel Laminin- and Fibronectin-binding Proteins by Far-Western Blot: Capturing the Adhesins of Streptococcus suis Type 2*. Front Cell Infect Microbiol, 2015. **5**: p. 82.
52. Zhang, H., et al., *The identification of six novel proteins with fibronectin or collagen type I binding activity from Streptococcus suis serotype 2*. J Microbiol, 2014. **52(11)**: p. 963-9.
53. Pian, Y., et al., *Proteomics identification of novel fibrinogen-binding proteins of Streptococcus suis contributing to antiphagocytosis*. Front Cell Infect Microbiol, 2015. **5**: p. 19.

54. Ju, C.X., H.W. Gu, and C.P. Lu, *Characterization and functional analysis of atl, a novel gene encoding autolysin in Streptococcus suis*. J Bacteriol, 2012. **194**(6): p. 1464-73.
55. Yu, Y., et al., *SBP2 plays an important role in the virulence changes of different artificial mutants of Streptococcus suis*. Mol Biosyst, 2016. **12**(6): p. 1948-62.
56. Li, M., et al., *The type II histidine triad protein HtpsC is a novel adhesion with the involvement of Streptococcus suis virulence*. Virulence, 2015. **6**(6): p. 631-41.
57. Zhang, Y.M., et al., *Prevalent distribution and conservation of Streptococcus suis Lmb protein and its protective capacity against the Chinese highly virulent strain infection*. Microbiol Res, 2014. **169**(5-6): p. 395-401.
58. Zhang, H., et al., *Identification of a novel collagen type capital I, Ukrainian-binding protein from Streptococcus suis serotype 2*. Vet J, 2013. **197**(2): p. 406-14.
59. Li, W., et al., *A novel fibronectin-binding protein of Streptococcus suis serotype 2 contributes to epithelial cell invasion and in vivo dissemination*. Vet Microbiol, 2013. **162**(1): p. 186-94.
60. Van Calsteren, M.R., et al., *Structure determination of Streptococcus suis serotype 2 capsular polysaccharide*. Biochem Cell Biol, 2010. **88**(3): p. 513-25.
61. Van Calsteren, M.R., et al., *Structure determination of Streptococcus suis serotype 14 capsular polysaccharide*. Biochem Cell Biol, 2013. **91**(2): p. 49-58.
62. Van Calsteren, M.R. and G. Goyette-Desjardins, *Explaining the Serological Characteristics of Streptococcus suis Serotypes 1 and 1/2 from Their Capsular Polysaccharide Structure and Biosynthesis*. 2016. **291**(16): p. 8387-98.
63. Vinogradov, E., et al., *Structure determination of Streptococcus suis serotype 9 capsular polysaccharide and assignment of functions of the cps locus genes involved in its biosynthesis*. Carbohydr Res, 2016. **433**: p. 25-30.
64. Houde, M., et al., *Streptococcus suis capsular polysaccharide inhibits phagocytosis through destabilization of lipid microdomains and prevents lactosylceramide-dependent recognition*. Infect Immun, 2012. **80**(2): p. 506-17.
65. Charland, N., et al., *Streptococcus suis serotype 2 mutants deficient in capsular expression*. Microbiology, 1998. **144 ( Pt 2)**: p. 325-32.
66. Avci, F.Y. and D.L. Kasper, *How bacterial carbohydrates influence the adaptive immune system*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 107-30.
67. Calzas, C., et al., *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, 2013. **81**(9): p. 3106-18.
68. Onishi, H., et al., *Prevalence of Streptococcus suis genotypes in isolates from porcine endocarditis in East Japan*. J Vet Med Sci, 2012. **74**(12): p. 1681-4.
69. Lakkitjaroen, N., et al., *Loss of capsule among Streptococcus suis isolates from porcine endocarditis and its biological significance*. J Med Microbiol, 2011. **60**(Pt 11): p. 1669-76.
70. Jing, H.B., et al., *Proteome analysis of Streptococcus suis serotype 2*. Proteomics, 2008. **8**(2): p. 333-49.
71. Osaki, M., et al., *Characterization of Streptococcus suis genes encoding proteins homologous to sortase of gram-positive bacteria*. J Bacteriol, 2002. **184**(4): p. 971-82.
72. Lahteenmaki, K., S. Edelman, and T.K. Korhonen, *Bacterial metastasis: the host plasminogen system in bacterial invasion*. Trends Microbiol, 2005. **13**(2): p. 79-85.

73. Ceremuga, I., et al., *Enolase-like protein present on the outer membrane of Pseudomonas aeruginosa binds plasminogen*. Folia Microbiol (Praha), 2014. **59**(5): p. 391-7.
74. Rubel, C., et al., *Fibrinogen promotes neutrophil activation and delays apoptosis*. J Immunol, 2001. **166**(3): p. 2002-10.
75. Sun, Y., et al., *Enolase of Streptococcus Suis Serotype 2 Enhances Blood-Brain Barrier Permeability by Inducing IL-8 Release*. Inflammation, 2016. **39**(2): p. 718-26.
76. Y, F., et al., *Streptococcus suis enolase functions as a protective antigen displayed on the bacterial cell surface*. J Infect Dis, 2009. **200**(10): p. 1583-92.
77. Zhang, A., et al., *Identification and characterization of a novel protective antigen, Enolase of Streptococcus suis serotype 2*. Vaccine, 2009. **27**(9): p. 1348-53.
78. Lapointe, L., et al., *Antibody response to an autogenous vaccine and serologic profile for Streptococcus suis capsular type 1/2*. Can J Vet Res, 2002. **66**(1): p. 8-14.
79. Ripley, P., *Vaccines against streptococcal meningitis*. Pig veterinary society proceedings 1983. **10**: p. 25-39.
80. Baums, C., et al., *Immunogenicity of an Autogenous Streptococcus suis Bacterin in Preparturient Sows and Their Piglets in Relation to Protection after Weaning*. Clin Vaccine Immunol, 2010: p. 1589-97.
81. Haesebrouck, F., et al., *Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect?* Vet Microbiol, 2004. **100**(3-4): p. 255-68.
82. Holt, M.E., M.R. Enright, and T.J. Alexander, *Immunisation of pigs with killed cultures of Streptococcus suis type 2*. Res Vet Sci, 1990. **48**(1): p. 23-7.
83. Holt, M.E., M.R. Enright, and T.J. Alexander, *Protective effect of sera raised against different fractions of Streptococcus suis type 2*. J Comp Pathol, 1990. **103**(1): p. 85-94.
84. Pallares, F.J., et al., *Evaluation of a ceftiofur-washed whole cell Streptococcus suis bacterin in pigs*. Can J Vet Res, 2004. **68**(3): p. 236-40.
85. Wisselink, H.J., et al., *Assessment of protective efficacy of live and killed vaccines based on a non-encapsulated mutant of Streptococcus suis serotype 2*. Vet Microbiol, 2002. **84**(1-2): p. 155-68.
86. Baums, C.G., et al., *Streptococcus suis bacterin and subunit vaccine immunogenicities and protective efficacies against serotypes 2 and 9*. Clin Vaccine Immunol, 2009. **16**(2): p. 200-8.
87. Gottschalk, M., *Diseases of swine, Streptococcosis*. 10th ed. 2012.
88. Kebede, M., M.M. Chengappa, and J.G. Stuart, *Isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of Streptococcus suis: efficacy trial of the mutant vaccine in mice*. Vet Microbiol, 1990. **22**(2-3): p. 249-57.
89. Fittipaldi, N., et al., *Potential use of an unencapsulated and aromatic amino acid-auxotrophic Streptococcus suis mutant as a live attenuated vaccine in swine*. Vaccine, 2007. **25**(18): p. 3524-35.
90. Hu, J., et al., *Construction, characterization and evaluation of the protective efficacy of the Streptococcus suis double mutant strain DeltaSsPep/DeltaSsPspC as a live vaccine candidate in mice*. Microbiol Res, 2015. **170**: p. 87-94.
91. Kock, C., et al., *Intranasal immunization with a live Streptococcus suis isogenic of mutant elicited suilysin-neutralization titers but failed to induce opsonizing antibodies and protection*. Vet Immunol Immunopathol, 2009. **132**(2-4): p. 135-45.

92. Quesy, S., J.D. Dubreuil, and R. Higgins, *Immunization of mice against Streptococcus suis serotype 2 infections using a live avirulent strain*. Can J Vet Res, 1994. **58**(4): p. 299-301.
93. Yao, X., et al., *Isolation and characterization of a native avirulent strain of Streptococcus suis serotype 2: a perspective for vaccine development*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 9835.
94. Busque, P., et al., *Immunization of pigs against Streptococcus suis serotype 2 infection using a live avirulent strain*. Can J Vet Res, 1997. **61**(4): p. 275-9.
95. Baums, C.G. and P. Valentin-Weigand, *Surface-associated and secreted factors of Streptococcus suis in epidemiology, pathogenesis and vaccine development*. Anim Health Res Rev, 2009. **10**(1): p. 65-83.
96. Calzas, C., et al., *Antibody response specific to the capsular polysaccharide is impaired in Streptococcus suis serotype 2-infected animals*. Infect Immun, 2015. **83**(1): p. 441-53.
97. Goyette-Desjardins, G., et al., *Protection Against Streptococcus suis Serotype 2 Infection Using a Capsular Polysaccharide Glycoconjugate Vaccine*. Infect Immun, 2016.
98. Feng, Y., et al., *Streptococcus suis enolase functions as a protective antigen displayed on the bacterial cell surface*. J Infect Dis, 2009. **200**(10): p. 1583-92.
99. Stills, H.F., Jr., *Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants*. ILAR J, 2005. **46**(3): p. 280-93.
100. J.Kindt., T., R.A. Goldsby., and B. A.Osborne, *Immunologie. Le cours de Janis Kuby avec questions de révision*. 6<sup>o</sup> édition ed. 2008.
101. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution*. J Exp Med, 1973. **137**(5): p. 1142-62.
102. Anthony L. DeFranco, M.R., Richard M. Locksley, *La réponse immunitaire dans les maladies infectieuses et inflammatoires*. De Boeck Université ed. 2007, Great Britain: New Science Press.
103. Summerfield, A. and K.C. McCullough, *The porcine dendritic cell family*. Dev Comp Immunol, 2009. **33**(3): p. 299-309.
104. Piriou-Guzylack, L. and H. Salmon, *Membrane markers of the immune cells in swine: an update*. Vet Res, 2008. **39**(6): p. 54.
105. Summerfield, A., G. Auray, and M. Ricklin, *Comparative dendritic cell biology of veterinary mammals*. Annu Rev Anim Biosci, 2015. **3**: p. 533-57.
106. Bode, C., et al., *CpG DNA as a vaccine adjuvant*. Expert Rev Vaccines, 2011. **10**(4): p. 499-511.
107. Auray, G., et al., *Porcine neonatal blood dendritic cells, but not monocytes, are more responsive to TLRs stimulation than their adult counterparts*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e59629.
108. Guzylack-Piriou, L., et al., *Type-A CpG oligonucleotides activate exclusively porcine natural interferon-producing cells to secrete interferon-alpha, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-12*. Immunology, 2004. **112**(1): p. 28-37.
109. Lecours, M.P., et al., *Characterization of porcine dendritic cell response to Streptococcus suis*. Vet Res, 2011. **42**: p. 72.

110. Lecours, M.P., et al., *Immune receptors involved in Streptococcus suis recognition by dendritic cells*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e44746.
111. Mair, K.H., et al., *The porcine innate immune system: an update*. Dev Comp Immunol, 2014. **45**(2): p. 321-43.
112. Pilon, C., et al., *CD40 engagement strongly induces CD25 expression on porcine dendritic cells and polarizes the T cell immune response toward Th1*. Mol Immunol, 2009. **46**(3): p. 437-47.
113. Vu Manh, T.P., et al., *Investigating Evolutionary Conservation of Dendritic Cell Subset Identity and Functions*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 260.
114. Lipscomb, M.F. and B.J. Masten, *Dendritic cells: immune regulators in health and disease*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 97-130.
115. Raymond, C.R. and B.N. Wilkie, *Toll-like receptor, MHC II, B7 and cytokine expression by porcine monocytes and monocyte-derived dendritic cells in response to microbial pathogen-associated molecular patterns*. Vet Immunol Immunopathol, 2005. **107**(3-4): p. 235-47.
116. Scheller, J., et al., *The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(5): p. 878-88.
117. Koch, F., et al., *High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 741-6.
118. Mond, J.J., A. Lees, and C.M. Snapper, *T cell-independent antigens type 2*. Annu Rev Immunol, 1995. **13**: p. 655-92.
119. Michaelsen, T.E., et al., *The four mouse IgG isotypes differ extensively in bactericidal and opsonophagocytic activity when reacting with the P1.16 epitope on the outer membrane PorA protein of Neisseria meningitidis*. Scand J Immunol, 2004. **59**(1): p. 34-9.
120. Butler, J.E., et al., *Porcine IgG: structure, genetics, and evolution*. Immunogenetics, 2009. **61**(3): p. 209-30.
121. Goh, Y.S., et al., *Human IgG isotypes and activating Fcγ receptors in the interaction of Salmonella enterica serovar Typhimurium with phagocytic cells*. Immunology, 2011. **133**(1): p. 74-83.
122. S., V., et al., *Choix d'un adjuvant lors d'essais de vaccination*. Ann Med Vet. Vol. 147. 2003. 393-401.
123. Aucouturier, J., L. Dupuis, and V. Ganne, *Adjuvants designed for veterinary and human vaccines*. Vaccine, 2001. **19**(17-19): p. 2666-72.
124. Gomez-Gascon, L., et al., *A new recombinant SsnA protein combined with aluminum hydroxide protects mouse against Streptococcus suis*. Vaccine, 2014. **32**(51): p. 6992-9.
125. Petrovsky, N. and J.C. Aguilar, *Vaccine adjuvants: current state and future trends*. Immunol Cell Biol, 2004. **82**(5): p. 488-96.
126. Scheiermann, J. and D.M. Klinman, *Clinical evaluation of CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases and cancer*. Vaccine, 2014. **32**(48): p. 6377-89.
127. Ming, F., et al., *Immunization of aged pigs with attenuated pseudorabies virus vaccine combined with CpG oligodeoxynucleotide restores defective Th1 immune responses*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e65536.

128. Li, J., et al., *Improvement of the Immunogenicity of Porcine Circovirus Type 2 DNA Vaccine by Recombinant ORF2 Gene and CpG Motifs*. *Viral Immunol*, 2015. **28**(5): p. 290-6.
129. Ouyang, K., et al., *Comparative analysis of routes of immunization of a live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine in a heterologous virus challenge study*. *Vet Res*, 2016. **47**: p. 45.
130. Martins, K.A., S. Bavari, and A.M. Salazar, *Vaccine adjuvant uses of poly-IC and derivatives*. *Expert Rev Vaccines*, 2015. **14**(3): p. 447-59.
131. Coffman, R.L., A. Sher, and R.A. Seder, *Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work*. *Immunity*, 2010. **33**(4): p. 492-503.
132. Thomas, M., et al., *Poly I:C adjuvanted inactivated swine influenza vaccine induces heterologous protective immunity in pigs*. *Vaccine*, 2015. **33**(4): p. 542-8.
133. Zhang, L., et al., *Poly(I:C) inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in MARC-145 cells via activation of IFIT3*. *Antiviral Res*, 2013. **99**(3): p. 197-206.
134. Muzalevskaia, E.N., et al., [*Squalene: Physiological and Pharmacological Properties*]. *Eksp Klin Farmakol*, 2015. **78**(6): p. 30-6.
135. Kalvodova, L., *Squalene-based oil-in-water emulsion adjuvants perturb metabolism of neutral lipids and enhance lipid droplet formation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **393**(3): p. 350-5.
136. Black, S., *Safety and effectiveness of MF-59 adjuvanted influenza vaccines in children and adults*. *Vaccine*, 2015. **33 Suppl 2**: p. B3-5.
137. Garcon, N., D.W. Vaughn, and A.M. Didierlaurent, *Development and evaluation of AS03, an Adjuvant System containing alpha-tocopherol and squalene in an oil-in-water emulsion*. *Expert Rev Vaccines*, 2012. **11**(3): p. 349-66.
138. <http://www.sepic.com>. [cited 2016 10 Juin 2016].
139. Barnett, P.V., et al., *International bank for foot-and-mouth disease vaccine: assessment of Montanide ISA 25 and ISA 206, two commercially available oil adjuvants*. *Vaccine*, 1996. **14**(13): p. 1187-98.
140. Petrovsky, N., *Comparative Safety of Vaccine Adjuvants: A Summary of Current Evidence and Future Needs*. *Drug Saf*, 2015. **38**(11): p. 1059-74.
141. Sun, H.X., Y. Xie, and Y.P. Ye, *Advances in saponin-based adjuvants*. *Vaccine*, 2009. **27**(12): p. 1787-96.
142. Rajput, Z.I., et al., *Adjuvant effects of saponins on animal immune responses*. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2007. **8**(3): p. 153-61.
143. Tritto, E., F. Mosca, and E. De Gregorio, *Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants*. *Vaccine*, 2009. **27**(25-26): p. 3331-4.
144. Ghimire, T.R., *The mechanisms of action of vaccines containing aluminum adjuvants: an in vitro vs in vivo paradigm*. Springerplus, 2015. **4**: p. 181.
145. Marrack, P., A.S. McKee, and M.W. Munks, *Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(4): p. 287-93.
146. <http://www.invivogen.com>. [cited 2016 10 Juin 2016].
147. Wilson-Welder, J.H., et al., *Vaccine adjuvants: current challenges and future approaches*. *J Pharm Sci*, 2009. **98**(4): p. 1278-316.

148. Peng, Y.T., et al., *Modulations of phenotype and cytokine expression of porcine bone marrow-derived dendritic cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. *Vet Microbiol*, 2009. **136**(3-4): p. 359-65.
149. Mussa, T., et al., *Differential interactions of virulent and non-virulent H. parasuis strains with naive or swine influenza virus pre-infected dendritic cells*. *Vet Res*, 2012. **43**: p. 80.
150. Lundberg, A.M., et al., *Key differences in TLR3/poly I:C signaling and cytokine induction by human primary cells: a phenomenon absent from murine cell systems*. *Blood*, 2007. **110**(9): p. 3245-52.
151. Verdijk, R.M., et al., *Polyriboinosinic polyribocytidylic acid (poly(I:C)) induces stable maturation of functionally active human dendritic cells*. *J Immunol*, 1999. **163**(1): p. 57-61.
152. Lore, K., et al., *Toll-like receptor ligands modulate dendritic cells to augment cytomegalovirus- and HIV-1-specific T cell responses*. *J Immunol*, 2003. **171**(8): p. 4320-8.
153. Alexopoulou, L., et al., *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3*. *Nature*, 2001. **413**(6857): p. 732-8.
154. Jeon, Y.T., et al., *Modulation of Dendritic Cell Activation and Subsequent Th1 Cell Polarization by Lidocaine*. *PLoS One*, 2015. **10**(10): p. e0139845.
155. Hu, Y., et al., *Synergy of TLR3 and 7 ligands significantly enhances function of DCs to present inactivated PRRSV antigen through TRIF/MyD88-NF-kappaB signaling pathway*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 23977.
156. Sloat, B.R. and Z. Cui, *Nasal immunization with anthrax protective antigen protein adjuvanted with polyriboinosinic-polyribocytidylic acid induced strong mucosal and systemic immunities*. *Pharm Res*, 2006. **23**(6): p. 1217-26.
157. Zhang, L., et al., *Toll-like receptor ligands enhance the protective effects of vaccination against porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine*. *Vet Microbiol*, 2013. **164**(3-4): p. 253-60.
158. Cao, Y., et al., *Poly(I:C) combined with multi-epitope protein vaccine completely protects against virulent foot-and-mouth disease virus challenge in pigs*. *Antiviral Res*, 2013. **97**(2): p. 145-53.
159. Jayashi, C.M., et al., *Characterisation of antibody responses in pigs induced by recombinant oncosphere antigens from Taenia solium*. *Vaccine*, 2012. **30**(52): p. 7475-80.
160. Willson, P.J., A. Rossi-Campos, and A.A. Potter, *Tissue reaction and immunity in swine immunized with Actinobacillus pleuropneumoniae vaccines*. *Can J Vet Res*, 1995. **59**(4): p. 299-305.
161. White, K., et al., *Immunogenicity of liposomes containing lipid core peptides and the adjuvant Quil A*. *Pharm Res*, 2006. **23**(7): p. 1473-81.
162. Jansen, C., et al., *Immunogenicity of in vitro folded outer membrane protein PorA of Neisseria meningitidis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2000. **27**(3): p. 227-33.
163. Clause, M., et al., *Evaluation of the efficacy of outer membrane protein 31 vaccine formulations for protection against Brucella canis in BALB/c mice*. *Clin Vaccine Immunol*, 2014. **21**(12): p. 1689-94.
164. Xiao, C., Z.I. Rajput, and S. Hu, *Improvement of a commercial foot-and-mouth disease vaccine by supplement of Quil A*. *Vaccine*, 2007. **25**(25): p. 4795-800.

165. Oleszycka, E. and E.C. Lavelle, *Immunomodulatory properties of the vaccine adjuvant alum*. *Curr Opin Immunol*, 2014. **28**: p. 1-5.
166. Rivera, E., A. Daggfeldt, and S. Hu, *Ginseng extract in aluminium hydroxide adjuvanted vaccines improves the antibody response of pigs to porcine parvovirus and Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2003. **91**(1): p. 19-27.
167. Linghua, Z., T. Xingshan, and Z. Fengzhen, *The efficacy of CpG oligodinucleotides, in combination with conventional adjuvants, as immunological adjuvants to swine streptococcic septicemia vaccine in piglets in vivo*. *Int Immunopharmacol*, 2006. **6**(8): p. 1267-76.
168. Comoy, E.E., A. Capron, and G. Thyphronitis, *In vivo induction of type 1 and 2 immune responses against protein antigens*. *Int Immunol*, 1997. **9**(4): p. 523-31.
169. Bennett, B., et al., *A comparison of commercially available adjuvants for use in research*. *J Immunol Methods*, 1992. **153**(1-2): p. 31-40.
170. Weeratna, R.D., et al., *CpG DNA induces stronger immune responses with less toxicity than other adjuvants*. *Vaccine*, 2000. **18**(17): p. 1755-62.
171. Berhanu, A., et al., *Vaccination of BALB/c mice with Escherichia coli-expressed vaccinia virus proteins A27L, B5R, and D8L protects mice from lethal vaccinia virus challenge*. *J Virol*, 2008. **82**(7): p. 3517-29.
172. De Vleeschauwer, A.R., et al., *Efficacy of an AS03A-adjuvanted split H5N1 influenza vaccine against an antigenically distinct low pathogenic H5N1 virus in pigs*. *Vaccine*, 2012. **30**(37): p. 5557-63.
173. Wisselink, H.J., et al., *Protection of pigs against challenge with virulent Streptococcus suis serotype 2 strains by a muramidase-released protein and extracellular factor vaccine*. *Vet Rec*, 2001. **148**(15): p. 473-7.
174. Leenaars, M., et al., *Immune responses and side effects of five different oil-based adjuvants in mice*. *Vet Immunol Immunopathol*, 1998. **61**(2-4): p. 291-304.
175. Campodonico, V.L., et al., *Efficacy of a conjugate vaccine containing polymannuronic acid and flagellin against experimental Pseudomonas aeruginosa lung infection in mice*. *Infect Immun*, 2011. **79**(8): p. 3455-64.
176. Gupta, R.K. and G.R. Siber, *Comparison of adjuvant activities of aluminium phosphate, calcium phosphate and stearyl tyrosine for tetanus toxoid*. *Biologicals*, 1994. **22**(1): p. 53-63.
177. Farzad, Z. and K. James, *Isotype responses of mice to tetanus-toxoid preparations*. *J Med Microbiol*, 1986. **22**(3): p. 189-93.
178. Tierney, R., et al., *Transcutaneous immunization with tetanus toxoid and mutants of Escherichia coli heat-labile enterotoxin as adjuvants elicits strong protective antibody responses*. *J Infect Dis*, 2003. **188**(5): p. 753-8.
179. Cynthia Calzas, M.T., Insaf Salem Fourati, Marcelo Gottschalk, Hugo Soudeyans, Thierry Defrance, Mariela Segura, *Terminal sialic acid in Gram-positive bacterial capsular polysaccharides does not exert an immunosuppressive effect on the humoral response*. *Infect. Immun*, 2016. **Submitted**.
180. Perrie, Y., et al., *Designing liposomal adjuvants for the next generation of vaccines*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016. **99**(Pt A): p. 85-96.

## **VII. Annexe**

**Annexe I : Licences des droits d’auteurs pour l’utilisation des figures de la revue de littérature**

<b>Figure</b>	<b>Journal, Editeur</b>	<b>Licence obtenue via</b>	<b>Numéro de Licence et date d’octroi</b>
Figure 1	Infection and Immunity, American Society for Microbiology	Copyright Clearance Center	Voir la capture d’écran ci dessous (Figure 1). Dec 06, 2016.
Figure 2	Infection and Immunity, American Society for Microbiology	Copyright Clearance Center	Voir la capture d’écran ci dessous (Figure 2). Dec 06, 2016.
Figure 3	Emerging Microbe and Infection, Nature publishing group	Copyright Clearance Center	Voir la capture d’écran ci-dessous (Figure 3) Janv 24, 2016
Figure 4	FEBS Letter	John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center	4003240631960 Dec 06, 2016
Figure 5	Future Microbiology, Future Medecine Ltd	Copyright Clearance Center	4003260239245 Dec 06, 2016
Figure 6	Future Microbiology, Future Medecine Ltd	Copyright Clearance Center	4003260239245 Dec 06, 2016
Figure 7	Figure non publiée, propriété du Dre Mariela Segura		
Figure 8	Molecular Immunology	Elsevier and Copyright Clearance Center	4003261440993 Dec 06, 2016
Figure 9	Frontiers in Immunology	Copyright Clearance Center	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4451681/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4451681/</a> Janv 24, 2016
Figure 10	Figure originale-Léa Martelet (2017)		
Figures de l’article scientifique et de la discussion générale	Figures originales-Léa Martelet (2017)		

Figure 1 :



The screenshot displays a web interface for RightsLink. At the top left is the Copyright Clearance Center logo. To its right is the RightsLink logo. Further right are navigation buttons for Home, Account Info, and Help, along with an email icon. On the left side, there is a logo for the American Society for Microbiology (ASM). The main content area lists the following details for a publication:

- Title:** Invasion of Porcine Brain Microvascular Endothelial Cells by *Streptococcus suis* Serotype 2
- Author:** Ghyslaine Vanier, Mariela Segura, Peter Friedl, et al.
- Publication:** Infection and Immunity
- Publisher:** American Society for Microbiology
- Date:** Mar 1, 2004

Below the publication details, it states "Copyright © 2004, American Society for Microbiology". To the right of this information, a grey box shows the user is logged in as Léa Martelet with account number 3001090724, and a blue LOGOUT button is present.

**Permissions Request**

ASM authorizes an advanced degree candidate to republish the requested material in his/her doctoral thesis or dissertation. If your thesis, or dissertation, is to be published commercially, then you must reapply for permission.

At the bottom of the request section, there are two blue buttons: BACK and CLOSE WINDOW.

At the very bottom of the page, there is a copyright notice: "Copyright © 2017 Copyright Clearance Center, Inc. All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#). Comments? We would like to hear from you. E-mail us at [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com)"

Figure 2.



The screenshot displays the RightsLink interface. At the top left is the Copyright Clearance Center logo. To its right is the RightsLink logo. Further right are navigation buttons for Home, Account Info, and Help, along with an email icon. On the left side, there is a logo for the American Society for Microbiology. The main content area lists the following details for a copyright request:

- Title:** Exacerbated Type II Interferon Response Drives Hypervirulence and Toxic Shock by an Emergent Epidemic Strain of *Streptococcus suis*
- Author:** Claude Lachance, Marcelo Gottschalk, Pehuén P. Gerber, et al.
- Publication:** Infection and Immunity
- Publisher:** American Society for Microbiology
- Date:** Jun 1, 2013

Below the article details, there is a copyright notice: Copyright © 2013, American Society for Microbiology. On the right side, a user is logged in as Léa Martelet with account number 3001090724, and a LOGOUT button is visible.

### Permissions Request

ASM authorizes an advanced degree candidate to republish the requested material in his/her doctoral thesis or dissertation. If your thesis, or dissertation, is to be published commercially, then you must reapply for permission.

BACK

CLOSE WINDOW

Copyright © 2017 Copyright Clearance Center, Inc. All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#). Comments? We would like to hear from you. E-mail us at [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com)

Figure 3.



The screenshot displays the RightsLink interface. At the top left is the Copyright Clearance Center logo. To its right is the RightsLink logo. Further right are navigation buttons for Home, Account Info, Help, and an email icon. Below the Copyright Clearance Center logo is the Nature Publishing Group logo. The main content area shows article metadata: Title: Streptococcus suis, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent[mdash]an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing; Author: Guillaume Goyette-Desjardins, Jean-Philippe Auger, Jianguo Xu, Mariela Segura and Marcelo Gottschalk; Publication: Emerging Microbes & Infections; Publisher: Nature Publishing Group; Date: Jun 1, 2014. A 'Logged in as:' box shows the user Léa Martelet with account number 3001090724 and a LOGOUT button. At the bottom, it states Copyright © 2014, Rights Managed by Nature Publishing Group.

### Creative Commons

The request you have made is considered to be non-commercial/educational. As the article you have requested has been distributed under a Creative Commons license (Attribution-Noncommercial), you may reuse this material for non-commercial/educational purposes without obtaining additional permission from Nature Publishing Group, providing that the author and the original source of publication are fully acknowledged (please see the article itself for the license version number). You may reuse this material without obtaining permission from Nature Publishing Group, providing that the author and the original source of publication are fully acknowledged, as per the terms of the license. For license terms, please see <http://creativecommons.org/>

[BACK](#) [CLOSE WINDOW](#)

Copyright © 2017 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement.](#) [Terms and Conditions.](#) Comments? We would like to hear from you. E-mail us at [customer@copyright.com](mailto:customer@copyright.com)