

Université de Montréal

Étude des interactions entre *Haemophilus parasuis* et des cellules endothéliales et épithéliales porcines: implications d'une composante bactérienne, le lipooligosaccharide (LOS)

par

Bénédicte Bouchet

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

Août 2008

© Bénédicte Bouchet, 2008

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé :

Étude des interactions entre *Haemophilus parasuis* et des cellules endothéliales et épithéliales porcines: implications d'une composante bactérienne, le lipooligosaccharide (LOS)

présenté par :

Bénédicte Bouchet

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Mariela Segura
présidente-rapporteuse

Marcelo Gottschalk
directeur de recherche

Mario Jacques
co-directeur

John M. Fairbrother
membre du jury

RÉSUMÉ

Haemophilus parasuis est un pathogène porcin causant la maladie de Glässer caractérisée par de la polysérosite fibrineuse, polyarthrite, méningite et septicémie. La pathogenèse de l'infection et les facteurs de virulence sont encore mal connus. Le site de colonisation de *Haemophilus parasuis* dans le tractus respiratoire supérieur est controversé. Pour accéder à la circulation sanguine, *H. parasuis* doit envahir la muqueuse. *H. parasuis* adhère à des cellules épithéliales porcines de trachée (NPT_r). Pour accéder au système nerveux central et causer la méningite, *H. parasuis* doit traverser la barrière hémato-méningée. *H. parasuis* adhère à et envahit des cellules endothéliales porcines de microvaisseaux cérébraux (PBMEC) provenant de la BBB. Le but de cette étude était d'étudier certaines interactions entre *H. parasuis* et son lipooligosaccharide (LOS), et des cellules endothéliales et épithéliales porcines. Les résultats démontrent que l'adhésion de *H. parasuis* Nagasaki aux NPT_r et aux PBMEC est en partie médiée par son LOS. *H. parasuis* induit l'apoptose des NPT_r et des PBMEC, mais le LOS ne semble pas impliqué. *H. parasuis*, et à un niveau moindre son LOS, stimulent la sécrétion d'interleukine- (IL) 6 et d'IL-8. Différentes souches de *H. parasuis* sérotypes 4 et 5 (sérotypes les plus prévalents en Amérique du Nord) stimulent également les NPT_r et PBMEC à produire IL-6 et IL-8. Les résultats suggèrent que le LOS de *H. parasuis* joue un certain rôle dans la pathogenèse de l'infection, mais d'autres composantes bactériennes sont également impliquées.

Mots clés : *Haemophilus parasuis*, lipooligosaccharide, adhésion, apoptose, induction de cytokines, cellules endothéliales, cellules épithéliales

SUMMARY

Haemophilus parasuis is a swine pathogen that causes Glässer's disease characterized by fibrinous polyserositis, polyarthritis, meningitis and septicemia. The pathogenesis of the infection and virulence factors are not well known. Whether the upper respiratory tract is the site of colonization of *H. parasuis* is still a controversial issue. *H. parasuis* must invade the mucosa to gain access to the bloodstream. *H. parasuis* is able to adhere to newborn pig trachea cells (NPTr). *H. parasuis* must then cross the blood-brain barrier to gain access to the central nervous system in cases of meningitis. *H. parasuis* is able to adhere to and invade porcine brain microvascular endothelial cells (PBMEC). The aim of this work was to study the interactions between *H. parasuis*, its lipooligosaccharide (LOS), and porcine endothelial and epithelial cells. Results showed that adhesion of *H. parasuis* Nagasaki to NPTr and PBMEC was partially mediated by its LOS. *H. parasuis* induced NPTr and PBMEC apoptosis, although purified LOS does not seem to be involved. *H. parasuis*, and to a lesser extent its LOS, stimulated the release of interleukin- (IL) 6 and IL-8. Field strains of *H. parasuis* serotypes 4 and 5 (the most prevalent serotypes in North America) also induced the production of IL-6 and IL-8. Results suggest that *H. parasuis* LOS plays a role in the pathogenesis of the infection, but other bacterial components are also involved.

Keywords : *Haemophilus parasuis*, lipooligosaccharide, adhesion, apoptosis, induction of cytokines, endothelial cells, epithelial cells

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
RÉSUMÉ	iii
SUMMARY	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS	ix
DÉDICACE	xi
REMERCIEMENTS.....	xii
I. INTRODUCTION	1
II. RECENSION DE LA LITTÉRATURE	4
1. <i>Haemophilus parasuis</i>	5
1.1. Aspects généraux de <i>H. parasuis</i>	5
1.2. Les sérotypes	5
1.3. Infection causée par <i>H. parasuis</i>	7
1.4. Traitement et prévention de l'infection	8
1.4.1. Antibiothérapie	8
1.4.2. Vaccination	8
2. Les facteurs de virulence proposés de <i>H. parasuis</i>	10
2.1. Capsule.....	10
2.2. Protéines	11
2.2.1. OMP	11
2.2.2. Adhésine	12
2.2.3. Neuraminidase	12
2.2.4. Fimbriae	12
2.3. Lipooligosaccharide	13
2.3.1. Composition générale d'un LOS/LPS	13
2.3.2. Rôles du LOS de <i>H. parasuis</i>	14
2.3.3. Activité du LOS des autres <i>Pasteurellaceae</i> sur les cellules endothéliales et épithéliales.....	16
2.4. Systèmes d'acquisition du fer	16
2.5. Résistance au sérum	17
2.6. Formation de biofilm	18
2.7. Gènes associés à la virulence	19
3. La pathogenèse de l'infection causée par <i>H. parasuis</i>	20
3.1. Colonisation du tractus respiratoire supérieur	21
3.2. Voies d'entrée possibles dans le sang et dissémination dans l'organisme	21
3.3. Voies d'entrée possibles dans le SNC	22

4. Apoptose	23
4.1. Généralités	23
4.2. Mécanisme d'apoptose.....	24
4.3. Apoptose versus cytotoxicité.....	27
4.4. Induction de l'apoptose par les bactéries	28
5. Cytokines	30
5.1. Rôle des cytokines relâchées par les cellules endothéliales et épithéliales	30
5.2. Rôle du LOS versus d'autres composantes bactériennes sur la production des cytokines induite par d'autres bactéries de la famille des <i>Pasteurellaceae</i>	31
6. Trachée	33
7. Barrière hémato-méningée	34
III. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS	35
Article I: Interactions of <i>Haemophilus parasuis</i> and its LOS with Porcine Brain Microvascular Endothelial Cells. Sept-Oct 2008 . Vet. Res. 39(5) : 42.	36
Article II: Studies on the interactions of <i>Haemophilus parasuis</i> with porcine epithelial tracheal cells : limited role of LOS in apoptosis and pro-inflammatory cytokine release. Fev 2009 . Microb. Pathog. 46(2) : 108-113	62
IV. DISCUSSION	83
V. CONCLUSIONS GÉNÉRALES	93
VI. BIBLIOGRAPHIE	96

LISTE DES FIGURES

RECENSION DE LITTÉRATURE

Figure 1.	Composition du LPS	13
Figure 2.	Les voies de l'apoptose	27
Figure 3.	Apoptose versus cytotoxicité	28
Figure 4.	L'épithélium trachéal	33
Figure 5.	La barrière hémato-méningée (BBB)	34

MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

Article I: Interactions of *Haemophilus parasuis* and its LOS with Porcine Brain Microvascular Endothelial Cells.

Figure 1.	(A) Kinetics of PBMEC apoptosis induced by <i>H. parasuis</i> (B) Effect of <i>H. parasuis</i> concentration on PBMEC apoptosis..	46
Figure 2.	Western blot micrographs demonstrating activation of caspase-3 in PBMEC stimulated with <i>H. parasuis</i>	47
Figure 3.	(A) Kinetics of IL-6 production by PBMEC stimulated with <i>H. parasuis</i> (B) Kinetics of IL-8 production by PBMEC stimulated with <i>H. parasuis</i>	49
Figure 4.	Effect of <i>H. parasuis</i> concentration on IL-6 and IL-8 production by PBMEC	50
Figure 5.	(A) Kinetics of IL-6 production by PBMEC stimulated with <i>H. parasuis</i> LOS (B) Kinetics of IL-8 production by PBMEC stimulated with <i>H. parasuis</i> LOS.....	52
Figure 6.	(A) Comparative analysis of IL-6 production by different <i>H. parasuis</i> strains (B) Comparative analysis of IL-8 production by different <i>H. parasuis</i> strains	54

Article II: Studies on the interactions of *Haemophilus parasuis* with porcine epithelial tracheal cells : limited role of LOS in apoptosis and pro-inflammatory cytokine release.

Figure 1.	(A) Kinetics of NPTr apoptosis induced by <i>H. parasuis</i> and its LOS (B) Western blot micrograph demonstrating activation of caspase-3 in NPTr stimulated with <i>H. parasuis</i>	68
Figure 2.	Kinetics of IL-8 production by NPTr stimulated with <i>H. parasuis</i>	70
Figure 3.	(A) Comparative analysis of IL-8 induction by different <i>H. parasuis</i> strains (B) Comparative analysis of IL-6 induction by different <i>H. parasuis</i> strains	73

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

BALB/c	Lignée de souris
BBB	Barrière hémato-méningée
BMEC	Cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux
CAM	Camptothecin
CD95	Récepteur de mort
CD95L	Ligand qui se fixe au récepteur CD95
CFU	Unité formatrice de colonie
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CSF	Liquide céphalo-rachidien
C3H/HeN	Lignée cellulaire de macrophages péritonéaux de souris
dATP	Déoxyadénosine triphosphate
DD	<i>Death domain</i>
DED	<i>Death effector domain</i>
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EU	Unité d'endotoxine
FADD	<i>Fas-associated death domain protein</i>
Fhu	<i>Ferric hydroxamate uptake</i>
FhuA	Récepteur du <i>Ferric hydroxamate uptake</i>
HaCaT	Lignée cellulaire de kératinocytes
HS27	Lignée cellulaire de fibroblastes de prépuce humain
IFN- γ	Interféron gamma
Ig	Immunoglobuline
IL-1 β	Interleukine-1 beta
IL-6	Interleukine-6
IL-8	Interleukine-8
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
JurkaT	Lignée cellulaire de lymphocytes T
J744.1	Lignée cellulaire de macrophages murins
KCl	Chlorure de potassium
kDa	Kilodalton
KDO	Acide 2-keto-3-déoxyoctonique
KH ₂ PO ₄	Phosphate de potassium
LDH	Lactate déshydrogénase
LOS	Lipooligosaccharide
LPS	Lipopolysaccharide
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein-1</i>
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
NaCl	Chlorure de sodium
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
Na ₂ HPO ₄	Phosphate de sodium
NK	Cellules <i>Natural Killer</i>
NO	Oxyde nitrique
NPTr	<i>Newborn Pig Trachea</i>

OD	Densité optique
OMP	Protéine de membrane externe
PAGE	Electrophorèse en gel de polyacrylamide
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBMEC	Cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de porc
PBS	Tampon phosphate
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PmB	Polymyxine B
PPLO	<i>Pleuropneumoniae-like organism</i>
PTS	Phosphotransférase
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase-Polymerase Chain Reaction</i>
RAW 264.7	Lignée cellulaire de macrophages/monocytes murins
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SNC	Système nerveux central
TbpB	<i>Transferrin binding protein B</i>
TEER	Résistance électrique trans-endothéliale/épithéliale
TGF- β 1	<i>Transforming growth factor beta</i>
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale alpha
TNFR	Recepteur TNF
TonB	Système de transport du fer
UV	Ultra-violet
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
ZO	Zonula occludens

À ma famille et mon conjoint

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier sincèrement les personnes suivantes :

Le Dr Marcelo Gottschalk pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et donner l'opportunité d'effectuer mes études supérieures sous sa direction, pour sa confiance, sa grande disponibilité, ses connaissances, ses conseils judicieux, ses encouragements ainsi que son soutien financier.

Le Dr Mario Jacques, mon co-directeur, pour sa contribution, son professionnalisme, sa disponibilité et pour ses conseils précieux en science.

Sonia Lacouture, assistante de recherche au laboratoire du Dr Gottschalk, pour sa disponibilité, son aide précieuse et ses bons conseils.

Geneviève Chabot-Roy, Maria de la Cruz Dominguez-Punaro, Miriam Esgleas, Nahuel Fittipaldi, Marie-Pier Lecours, Diane Meunier-Côté, Ghyslaine Vanier, membres anciens et actuels du laboratoire pour leur aide généreuse, leur soutien et leur amitié, et pour le plaisir que j'ai eu à les côtoyer chaque jour. Un merci particulier à Ghyslaine Vanier pour m'avoir tant appris aux niveaux scientifique et humain.

Les Dr Mario Jacques, Dre Monique Doré, Dr Daniel Dubreuil et Dr John Fairbrother pour avoir fait partie de différents comités d'évaluation et m'avoir prodigué de précieux conseils tout au long de mes études de maîtrise.

Tous les professeurs, étudiants et membres du personnel du GREMIP qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet pour leur aide, leur disponibilité et leurs conseils.

Cette étude a été rendue possible grâce au support financier des organismes suivants : Fonds Québécois de Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT) et Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP).

Tout au long de mes études supérieures, j'ai reçu des bourses du Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP).

Finalement, je tiens à remercier ma famille, mon conjoint et mes amis pour leur compréhension, leur soutien moral et leurs encouragements.

I. INTRODUCTION

Haemophilus parasuis est un organisme commensal des voies respiratoires supérieures chez le porc. C'est aussi, dans certains cas, un pathogène causant la maladie de Glässer chez les porcelets [62]. Les animaux infectés présentent des signes cliniques de polysérosite fibrineuse, de polyarthrite, de méningite, de pneumonie, et de septicémie [4, 61, 72, 84]. Quinze sérotypes ont été décrits mais la nature exacte des antigènes impliqués dans le sérotypage est peu connue, bien que la capsule, la membrane externe et le lipooligosaccharide (LOS) aient été suggérés comme jouant un rôle. Les sérotypes 4 et 5 sont les plus fréquemment retrouvés en Amérique du Nord [52, 114].

À ce jour, peu de facteurs de virulence ont été décrits. La présence d'une activité neuraminidase, d'un système de capture du fer, de protéines de membrane externe, ainsi que la capacité à former des biofilms et à résister au sérum ont été associés à la virulence de *H. parasuis* [23, 32, 59, 84, 99]. La présence d'une capsule ou de structures semblables à des fimbriae à la surface de la bactérie a été décrite pour certaines souches, mais leur implication dans la virulence n'a pas été établie [84]. Enfin, des analyses de "differential display RT-PCR" [67] et de "microarray" [66] ont également suggéré des gènes reliés à la virulence.

Le lipooligosaccharide (LOS) ou lipopolysaccharide (LPS) est un constituant majeur de la membrane externe des bactéries Gram négatives qui induit un grand éventail de réponses de la part des cellules endothéliales et épithéliales [2, 13, 26, 50, 111, 112]. Il stimule les cellules hôtes à produire et relâcher une grande variété de médiateurs de l'inflammation [50]. Il a également la capacité d'induire l'apoptose des cellules endothéliales et épithéliales [13, 26, 112], et il a été démontré qu'il est impliqué dans l'adhésion aux cellules hôtes par plusieurs bactéries [2, 46, 111]. Il a été proposé que le LOS de *H. parasuis* est lié au choc endotoxique, à l'aggravation des signes cliniques et à la mort des porcs atteints de septicémie, suggérant qu'il pourrait jouer un rôle important dans la pathogenèse de l'infection [5]. Cependant, sa véritable activité biologique est encore inconnue.

La pathogenèse de l'infection causée par ce pathogène est encore mal connue. Le fait que le tractus respiratoire supérieur soit le site de colonisation de *H.*

parasuis est encore controversé [3, 124]. L'organisme est fréquemment isolé dans les cavités nasales et la trachée, et très rarement dans les poumons et les amygdales. Les lésions dans le tractus respiratoire supérieur des porcs sont habituellement associées à une importante infiltration de neutrophiles avec dommages cellulaires. Ces altérations de la surface mucosale pourraient affecter les mécanismes de défense de l'hôte et permettre à *H. parasuis* d'envahir la muqueuse et d'accéder à la circulation sanguine [124]. Cependant les mécanismes utilisés par *H. parasuis* pour rejoindre la circulation sanguine sont encore inconnus. Des études *in vitro* ont récemment démontrées que *H. parasuis* était capable d'adhérer à une lignée de cellules épithéliales porcines de trachée (NPTr) [8].

Pour se rendre au système nerveux central (SNC) et causer la méningite, *H. parasuis* doit traverser la barrière hémato-méningée (BBB). Cette barrière est formée de cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux recouvertes des terminaisons d'astrocytes et est associée avec des péricytes [121]. Elle est responsable du maintien de l'homéostasie à l'intérieur du SNC et est caractérisée par des jonctions intercellulaires serrées qui régulent la circulation des macromolécules, des cellules et des fluides [121]. On sait que *H. parasuis* est capable d'adhérer à et d'envahir des cellules endothéliales porcines de microvaisseaux cérébraux (PBMEC) provenant de la BBB mais les interactions entre les PBMEC et *H. parasuis* sont seulement partiellement caractérisées [127].

Le but de cette étude était de mieux caractériser les interactions entre *H. parasuis* et les cellules de l'hôte. Pour cela, il s'agissait d'évaluer l'aptitude de *H. parasuis* à induire l'apoptose, et d'étudier sa capacité à stimuler le relâchement de médiateurs inflammatoires au niveau de la trachée et de la barrière hémato-méningée en utilisant les deux modèles de lignées cellulaires NPTr et PBMEC. Les autres objectifs de ce projet étaient d'évaluer le rôle d'une des composantes de la bactérie dans ces deux processus, le LOS, ainsi que son implication dans l'adhésion aux NPTr et aux PBMEC.

L'hypothèse de recherche était que le LOS de *H. parasuis* jouerait un rôle important dans les interactions entre la bactérie et les cellules endothéliales et épithéliales porcines.

II. RECENSION DE LA LITTÉRATURE

1. *Haemophilus parasuis*

Haemophilus parasuis est un organisme commensal des voies respiratoires supérieures chez le porc. C'est aussi, dans certains cas, un pathogène causant la maladie de Glässer chez les porcelets [62].

1.1. Aspects généraux de *H. parasuis*

Haemophilus parasuis appartient à la famille des *Pasteurellaceae*. *H. parasuis* est un petit coccobacille pléomorphe à Gram négatif, mais sa forme peut varier d'un petit coccobacille à un long bacille [55]. Il est de type anaérobie facultatif, non motile et non hémolytique sur gélose au sang. *H. parasuis* est une bactérie fastidieuse et fragile qui nécessite du NAD pour sa croissance, mais pas le facteur X contrairement aux autres espèces de *Haemophilus* [17]. Son isolement est relativement difficile et requiert l'emploi de milieux enrichis tels que PPLO, gélose au sang cuit (gélose chocolat) ou gélose au sang [55]. Sa croissance est lente et peut être favorisée par l'ajout d'extraits de levure aux milieux de culture.

1.2. Les sérotypes

La principale difficulté pour caractériser *H. parasuis* réside dans le fait qu'il est impossible de différencier les souches en utilisant des tests biochimiques et enzymatiques ou par simples méthodes sérologiques. De plus, les propriétés antigéniques des constituants de la surface de cette bactérie sont assez peu connues. Les premières tentatives de sérotypage ont été réalisées par l'équipe de Bakos [11, 10] qui a pu différencier 4 sérotypes ("A, B, C et D") avec un test de précipitation utilisant un extrait cellulaire chauffé à 37°C comme antigène. Plusieurs années plus tard, Schimmel *et al.* ont établi 3 nouveaux sérotypes en utilisant un test d'agglutination pour sérotyper 115 isolats originaires d'Allemagne [100]. Morozumi et Nicolet [72] et Nicolet *et al.* [77] ont pu définir 7 nouveaux sérotypes désignés de "1 à 7" en utilisant un antigène thermostable et soluble dans une épreuve d'immunodiffusion. Kielstein *et al.* [51, 53] ont examiné 158 isolats originaires d'Allemagne et ont rapporté l'existence de 7 nouveaux sérotypes

désignés "jena 6 à jena 12". Rapp-Gabrielson et Gabrielson [91] ont examiné 243 isolats d'Amérique du Nord et rapporté l'existence de 5 nouveaux sérotypes, qu'ils nomment "ND1 à ND5".

Il est clair que la classification suggérée jusqu'à présent n'était pas suffisante pour sérotyper toutes les souches. Kielstein et Rapp-Gabrielson [52] ont alors étudié toutes les souches sérotypées à travers le monde en se basant sur le test d'immunodiffusion en gel et ont pu différencier 15 sérotypes. L'antigène spécifique utilisé étant soluble, stable à la chaleur, non modifié par le traitement protéolytique et pouvant être extrait par le phénol, il a été suggéré qu'il était de nature polysaccharidique [73]. Cependant, un grand nombre d'isolats sont demeurés non typables par cette méthode [89] ce qui peut être expliqué par l'existence de sérotype (s) additionnel (s) ou encore par le fait que ces isolats expriment peu leur antigène spécifique et que ce dernier n'est pas détectable dans le test d'immunodiffusion [19]. De plus des réactions croisées entre les différents sérotypes ont été observées avec ce test. Un test d'hémagglutination indirecte présentant moins de réactions croisées a donc été proposé par 2 études [30, 114], dans lesquelles le taux de souches typables s'élevait à 90%. Cependant, Turni et Blackall [122] recommandent le test d'hémagglutination indirecte seulement comme complément de la méthode de diffusion en gel, dans le cas où la souche serait non typable ou dans le cas de réaction croisée.

Enfin, le rapport entre virulence et sérotypes n'a pas été clairement établie, et demeure encore un sujet de discorde. D'après Neilsen [78], les sérotypes 1 et 5 seraient virulents, contrairement aux sérotypes 2, 3, 4, 6 et 7. Pour d'autres auteurs [93], les sérotypes 1, 5, 10, 12, 13 et 14 seraient les plus virulents, les sérotypes 2, 4, 8, et 15 causeraient de la polysérosite mais pas la mort, et les sérotypes 3, 6, 7, 9 et 11 seraient avirulents.

Les sérotypes 4 et 5 sont les plus prévalents au Japon, en Chine, en Allemagne, en Espagne, au Danemark, en Australie, aux Etats-Unis et au Canada [6, 19, 22, 52, 71, 91, 98, 114].

1.3. Infection causée par *H. parasuis*

Les facteurs de risque menant au développement de la maladie chez le porc ne sont pas clairement établis, mais il semble que le statut immunitaire des animaux dans le troupeau (faible stimulation immunitaire dans les élevages assainis) ainsi que l'état de stress des animaux soient des déterminants majeurs [78, 92, 97]. Le développement de la maladie semble coïncider avec un regroupement ou un déplacement d'animaux. Les porcs de tous âges sont susceptibles à une infection par *H. parasuis*, mais les porcelets seraient les plus vulnérables. D'importantes pertes économiques sont associées aux infections à *H. parasuis* en raison des coûts liés aux traitements antibiotiques et à la perte d'animaux [49].

De nombreux signes cliniques sont associés à *H. parasuis* tels que la mort subite, des signes neurologiques, de l'anorexie, un amaigrissement, une enflure des articulations, une diminution de la motricité, de la prostration, de la difficulté à respirer, de la fièvre, des sécrétions nasales, des avortements, une inflammation de l'oreille interne, de la cyanose et occasionnellement de la toux [62]. Les lésions pathologiques les plus importantes lors d'une infection à *H. parasuis* sont de l'arthrite, de la pleurite, de la péricardite, de la péritonite, de la méningite, de la polysérosite, et de la rhinite [62].

Une des conséquences les plus graves d'une infection à *H. parasuis* est le développement de la maladie de Glässer. Son apparition est généralement soudaine, et son évolution est rapide et fatale. Elle est caractérisée par de la polysérosite fibrineuse, de la polyarthrite et de la méningite. Elle touche l'ensemble des membranes séreuses mais peut également atteindre le péritoine, la plèvre, le péricarde et les articulations. On observe généralement de l'inflammation, de la douleur et de la chaleur au niveau de toutes les articulations ce qui provoque de fortes boiteries. La méningite peut être une autre conséquence de la maladie de Glässer. Les animaux souffrent alors de troubles nerveux se traduisant par des tremblements, des spasmes et des crampes musculaires [62, 72, 84]. Les porcs atteints de la forme respiratoire de la maladie souffrent de pneumonie, mais dans certains cas aigus, une forme septicémique de la maladie peut également affecter les porcelets [88].

1.4. Traitement et prévention de l'infection

1.4.1. Antibiothérapie

Une antibiothérapie peut être efficace si elle est administrée au stade initial de la maladie. La susceptibilité aux antibiotiques de plusieurs souches de *H. parasuis* (52 isolats provenant du Danemark) isolées de porcs souffrants de méningite, polysérosite ou pneumonie a été mesurée par détermination de la CMI. Tous les isolats testés apparaissent susceptibles à l'ampicilline, au ceftiofur, à l'érythromycine, au florphénicol, à la pénicilline, à la septinomycine, à la tétracycline, au tiamulin, et au tilmicosin. En revanche, 6 isolats ont démontré une susceptibilité réduite à la ciprofloxacine, et 12 ont démontré une susceptibilité réduite à la combinaison triméthoprime + sulfaméthoxazole [1].

Une étude précédente rapporte que des isolats (32) de *H. parasuis* provenant de Suisse sont sensibles à la pénicilline et à l'enrofloxacine, mais que des résistances envers la streptomycine, la kanamycine, la gentamicine, la tétracycline, le sulfonamide, l'érythromycine et la combinaison triméthoprime + sulfaméthoxazole ont été observées par méthode de disque-diffusion [133].

L'antibiotique généralement utilisé dans le traitement de la maladie de Glässer est la pénicilline en raison de son faible coût et de sa disponibilité.

1.4.2. Vaccination

Il a été démontré que la vaccination est une méthode efficace pour prévenir la maladie de Glässer [105]. La vaccination à partir de bactéries tuées à la formaline et adsorbées à l'hydroxyde d'aluminium s'est avérée protectrice contre la maladie de Glässer chez de jeunes porcs exempts d'organismes pathogènes spécifiques [69]. Il a également été démontré une réaction croisée, c'est-à-dire que le vaccin pouvait protéger les porcs gnotobiotiques contre une autre souche que celle utilisée pour le vaccin [70]. L'inoculation intranasale de souches de divers sérotypes résulte en la production d'anticorps qui semblent protéger les porcs contre une infection avec une souche d'un autre sérotype [78]. Nielsen [78] a également rapporté que des porcelets vaccinés provenant d'une mère ayant aussi

été vaccinée, bénéficiaient d'une protection à long terme contre le développement de la maladie de Glässer. L'immunisation d'animaux avec un vaccin monovalent à base de bactérine serait elle aussi protectrice contre une infection avec une souche du même sérotype, mais pas contre une souche d'un autre sérotype, alors qu'un vaccin bivalent serait plus efficace [116]. L'utilisation d'un vaccin contenant une souche de *H. parasuis* sérotype 5 inactivée à la formaline et un adjuvant, a récemment été testée et semble conférer une immunité contre une infection avec une autre souche de *H. parasuis* du sérotype 5 [9]. Ce vaccin s'est également révélé efficace pour protéger les porcs d'une infection par plusieurs autres sérotypes. Oliveira *et al.* ont également pu observer une protection des animaux après vaccination avec des bactéries tuées [83].

La protection contre la manifestation de la polysérosite a été décrite, entre autres, par Nielsen et Danielsen [79], Riising [95] et Rapp-Gabrielson *et al.* [93]. De plus, les animaux vaccinés dont la mère avait aussi été vaccinée étaient protégés contre le développement de lésions systémiques lorsqu'ils étaient infectés avec une souche virulente de *H. parasuis*. Les porcs vaccinés ou non, nés de mère vaccinée, étaient également protégés contre la polysérosite [106]. Ces résultats ont récemment été confirmés par Baumann et Bilkei [14] dont les observations ont permis de confirmer que la vaccination des truies peut aider à contrôler la maladie et protéger les porcelets lors de l'allaitement. Cependant, il semblerait que l'immunité de la truie vaccinée, et donc, l'immunité passive transférée dans les immunoglobulines du colostrum, soit spécifique au sérotype [93].

Une étude a montré récemment que l'inoculation expérimentale de porcelets âgés de 5 jours avec une souche systémique vivante de *H. parasuis* pouvait être plus efficace pour réduire la morbidité et la mortalité que la colonisation de porcelets par contact avec des truies inoculées [82].

Bon nombre de ces vaccins sont utilisés mais à l'heure actuelle aucun vaccin ne confère une immunité complète contre tous les sérotypes.

2. Les facteurs de virulence proposés de *H. parasuis*

2.1. Capsule

La présence d'une capsule a été clairement démontrée chez 12 souches sur 32 de *H. parasuis* provenant de différents sites du corps [72]. Le matériel capsulaire peut être facilement détecté par électrophorèse de la substance capsulaire extraite à la chaleur et par la précipitation subséquente avec du hexadecyltrimethylammonium bromide (Cetavlon; Fluka, Buchs, Switzerland). La nature polysaccharidique du matériel capsulaire a été démontrée de part sa stabilité suite à des traitements avec la pronase ou la trypsine, et l'autoclave. L'intensité des arcs de précipitation avec le Cetavlon diminue avec l'âge de la culture (48h d'incubation), indiquant une perte du matériel capsulaire après une incubation prolongée [72]. En revanche un quart des souches ne précipite pas avec le Cetavlon suggérant une autre structure polysaccharidique. L'étude de la nature chimique de la capsule reporte une structure d'unités répétées de α -galactosyl- α -N-acetylglucosaminide polymérisée par des ponts phosphodiester 4-4'.

Toutes les souches non capsulées montrent un certain polymorphisme avec une morphologie de forme filamenteuse ou de bâtonnet, alors que les souches capsulées sont plutôt de forme coccobacillaire [72].

L'association entre la virulence et la présence ou l'absence de la capsule est très controversée. La capsule est généralement considérée comme un important facteur de virulence pour le genre *Haemophilus*. Morozumi et Nicolet [72] ont vérifié si cette hypothèse était aussi valable pour *H. parasuis* mais il a été montré qu'une souche non capsulée est plus virulente qu'une souche capsulée. Dans cette étude, les souches capsulées ont plutôt été associées à des isolats provenant des cavités nasales de porcs apparemment sains et sont moins souvent retrouvées chez des isolats provenant de cas pathologiques. Cependant, Rapp-Gabrielson *et al.* ont suggéré que des passages *in vivo* pouvaient sélectionner des clones encapsulés de *H. parasuis*, et que l'encapsulation était qualitativement réduite après des passages *in vitro* [92].

2.2. Protéines

2.2.1. OMP

Un autre facteur potentiel de virulence est la présence de protéines de membrane externe (OMPs). Miniats *et al.* ont rapporté que les anticorps détectés dans le sérum de porcs immunisés avec des bactérines adsorbées à l'hydroxyde d'aluminium étaient dirigés uniquement contre les OMPs de *H. parasuis*, suggérant que les OMPs sont plus immunogènes que d'autres composantes bactériennes [70]. La détection d'anticorps anti-OMP dans le sérum de porcs naturellement infectés suggère qu'elles pourraient jouer un rôle dans la pathogenèse de l'infection, d'autant plus que de tels anticorps confèrent une certaine protection chez des souris immunisées puisqu'ils éliminent complètement les bactéries du sang [115]. En revanche aucun rôle dans la virulence n'a été clairement démontré à ce jour.

D'autre part, la présence d'une protéine unique de 37 kDa exprimée par les isolats de *H. parasuis* provenant de cas de septicémie ou de maladie de Glässer a été décrite [71, 72, 76]. Deux différents patrons d'électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) (type I et II) ont été identifiés par SDS-PAGE. Ces isolats ont été classifiés comme étant du type PAGE II, alors que les isolats respiratoires qui ne possédaient pas cette protéine ont été classifiés comme étant du type PAGE I [71-73, 76]. Rosner *et al.* [97] ont ensuite utilisé un système différent pour la classification des profils de protéines des cellules entières de *H. parasuis*. Sept types PAGE ont été décrits, basés sur les protéines majeures observées : type I, type IIa, type IIb, type IIIa, type IIIb, type IV et type V.

L'analyse SDS-PAGE des OMPs a indiqué que 78% des isolats provenant de cas de polysérose possédaient une protéine majeure avec un poids moléculaire de 37 à 38.5 kDa [90], et que les isolats provenant de sites systémiques étaient caractérisés par la présence d'une OMP majeure avec un poids moléculaire allant de 36.6 à 38.5 kDa [84, 99]. Il semble y avoir une relation entre les isolats capables de causer des maladies systémiques, cependant, l'association entre la présence d'une protéine spécifique et la virulence est controversée due à la variabilité entre les études concernant la caractérisation des types PAGE.

2.2.2. Adhésine

Parmi les facteurs de colonisation exprimés par *Haemophilus influenzae* dans le tractus respiratoire de l'homme, l'OMP P5 est une protéine majeure qui semble jouer un rôle dans l'évasion du système immunitaire [65]. Récemment, une adhésine "P5-like" de *H. parasuis* a été décrite [65]. Il s'agit d'une protéine de membrane externe de *H. parasuis* de 32 kDa, homologue à la protéine P5 de *H. influenzae*. Son rôle dans la virulence de *H. parasuis* n'a pas encore été décrit.

2.2.3. Neuraminidase

La présence d'une activité neuraminidase ou sialidase, un facteur potentiel de virulence pour les bactéries, a été démontrée chez *H. parasuis* [59]. Elle contribue à la virulence de 3 façons différentes. Elle permet d'exploiter l'acide sialique de la cellule hôte comme source de carbone avec l'action subséquente d'une perméase et d'une aldolase. L'acide sialique est un sucre retrouvé chez tous les animaux et qui peut être catabolisé par les enzymes suivantes, la neuraminidase qui extrait l'acide sialique de polysaccharides, glycoprotéines et glycolipides, la perméase qui transporte l'acide sialique à travers les membranes cellulaires, et l'aldolase qui clive le sucre [59]. En plus de son rôle dans la nutrition, elle permet de démasquer les récepteurs nécessaires à la colonisation ou l'envahissement des cellules hôtes. Elle interfère également avec les défenses de l'hôte en diminuant la viscosité de la mucine ou en altérant les fonctions du système immunitaire et des médiateurs inflammatoires [59].

2.2.4. Fimbriae

En plus de la capsule, *H. parasuis* semble aussi produire des structures filamenteuses de type fimbriae lorsque cultivé dans la membrane chorio-allantoïde d'œufs embryonnés [75]. Même si certaines souches de *H. parasuis* semblent porter des fimbriae à leur surface, là encore, leur implication dans la virulence n'est pas encore établie.

2.3. Lipooligosaccharide

2.3.1. Composition générale d'un LOS/LPS

Le lipopolysaccharide (LPS) ou lipooligosaccharide (LOS) est un constituant majeur de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Il est un composant essentiel de la paroi cellulaire et est indispensable à la viabilité de la bactérie [125].

Le LOS/LPS est constitué de 4 différentes parties (Figure 1). La première et la plus importante est le lipide A, la composante lipidique du LOS/LPS liée de façon covalente et ancrée dans la membrane externe, qui semble être responsable du potentiel toxique du LOS/LPS. La deuxième partie est le core interne, constitué par plusieurs sucres : 2 acides 2-keto-3-déoxyoctoniques (KDO) ou plus, liés à la partie glucosamine du lipide A, et 2 ou 3 heptoses liés aux KDO. Le core externe, la troisième partie, est constitué de sucres communs et est plus variable que le core interne. La dernière partie de la molécule de LOS/LPS est l'antigène O. Cette partie est attachée au sucre terminal du core externe et s'étend jusqu'à la surface de la bactérie, et est hautement immunogénique. L'antigène O est composé d'unités de sucres communs mais il existe de nombreuses variations dans sa composition et sa longueur en fonction de l'espèce et de la souche bactérienne. La longueur de l'antigène O peut varier de 0 à 40 unités répétées. Pour les bactéries possédant l'antigène O, on parle de lipopolysaccharide (LPS) de type smooth, et pour les bactéries n'ayant pas l'antigène O, on parle de lipopolysaccharide (LPS) de type rough. Comme son nom l'indique, le lipooligosaccharide (LOS) possède une courte chaîne d'antigène O [125].

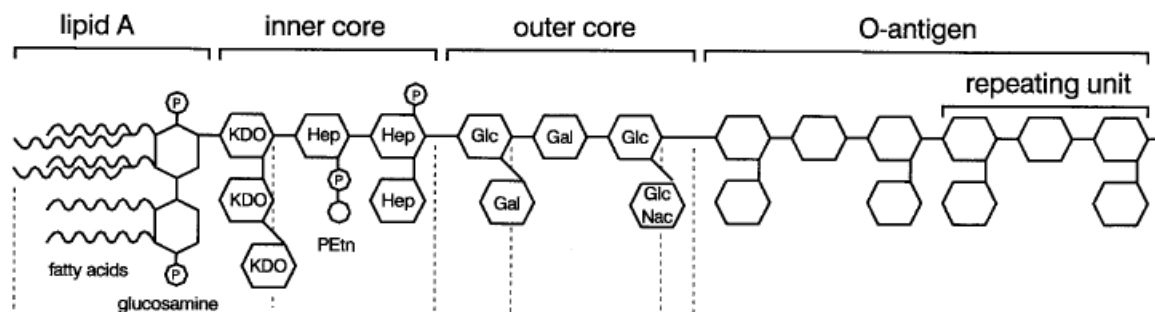


Figure 1 : Composition du LPS

A ce jour, aucune étude n'a décrit la synthèse et la structure du LOS de *H. parasuis*, de sorte que tous les auteurs ne s'accordent pas pour dire s'il s'agit de LOS ou de LPS, mais il semble que, d'après son profil électrophorétique, le LOS de *H. parasuis* ne possède pas les caractéristiques d'un LPS de type smooth [81]. Les patrons d'électrophorèse du LOS d'isolats de *H. parasuis* provenant d'animaux malades ou cliniquement sains ont été comparés [136], et cette étude décrit sept profils électrophorétiques de LOS. Les seules données connues à ce jour sont que la structure du LOS sur gels SDS-PAGE semble être stable lors de variations des conditions de croissance telles qu'une augmentation du CO₂ dans l'atmosphère, ou une diminution de l'oxygène [136].

2.3.2. Rôles du LOS de *H. parasuis*

De même que pour les OMP, le rôle du LOS de *H. parasuis* n'a pas encore été complètement élucidé mais on peut supposer qu'il jouerait un rôle important dans la pathogenèse, comme pour de nombreuses autres bactéries à Gram négatif. Il est connu que les effets des endotoxines sont impliqués dans la formation de microthrombose lors d'infections à bactéries Gram négatives [5]. Amano *et al.* ont détecté la présence de coagulation intravasculaire disséminée et de fortes concentrations d'endotoxines dans le sang de porcs atteints de la maladie de Glässer et de septicémie aiguë induites par *H. parasuis*, et ont indiqué que les endotoxines devaient jouer un rôle important dans la pathogenèse des lésions septicémiques des infections à *H. parasuis* [3]. Dans une autre étude [5], Amano *et al.* ont démontré l'apparition de signes cliniques et de septicémie chez des porcs exempts d'organismes pathogènes spécifiques inoculés par voie intratrachéale avec une souche de *H. parasuis* Nagasaki. De plus, des endotoxines et des désordres du système de coagulation ont été rapidement et simultanément détectés dans le plasma. La concentration des endotoxines augmentait de façon critique juste avant la mort des animaux. Les désordres du système de coagulation suggéraient le développement de coagulation intravasculaire disséminée et des microthromboses étaient observées dans plusieurs organes. Les signes cliniques ainsi que la leucopénie et l'hypoglycémie observés chez les animaux infectés avec *H. parasuis* semblaient correspondre aux traumatismes associés à un choc

endotoxique. Il a donc été proposé que les animaux atteints de septicémie due à *H. parasuis* souffraient de choc endotoxique, puis de coagulation intravasculaire disséminée, et enfin mouraient dans un délai très court [5].

Plus tard, Tadjine *et al.* [115] ont produit des anticorps monoclonaux contre *H. parasuis*, dirigé contre des épitopes de nature polysaccharidique (LOS). Ces anticorps reconnaissent spécifiquement les épitopes de LOS de toutes les souches de référence ainsi que des souches de champ de *H. parasuis*. Les anticorps étaient incapables de tuer *H. parasuis in vitro* en présence de complément, ce qui confirme les résultats obtenus par Cerda-Cuellar *et al.* [23] (voir section 2.5.). Cependant, l'élimination des bactéries du sang était significativement augmentée chez des souris infectées expérimentalement et inoculées avec ces anticorps. De plus, des souris inoculées avec *H. parasuis* et ayant reçu ces anticorps survivaient à l'infection. Il semble que la protection que confèrent ces anticorps serait principalement due à sa capacité à neutraliser les endotoxines du sang. Ainsi, les souris infectées ne succomberaient pas au choc endotoxique résultant en une aggravation des signes cliniques, et échapperaient donc à la mort, ce qui rejoint les résultats de Amano *et al.* [5] (voir paragraphe ci-dessus). Ces anticorps capables d'offrir une protection contre l'infection chez la souris pourraient être une avenue pour la prévention et le traitement des infections à *H. parasuis*.

Il a également été démontré que le LOS de *H. parasuis* était capable de stimuler le relâchement de TNF- α et de NO par une lignée cellulaire de macrophages/monocytes murins, les cellules RAW 264.7 [81]. En revanche, rien n'est connu quant à l'activité du LOS de *H. parasuis* sur les cellules endothéliales et épithéliales, mis à part qu'il possède une activité mitogène sur des cellules de rate de souris BALB/c [81].

2.3.3. Activité du LOS des autres *Pasteurellaceae* sur les cellules endothéliales et épithéliales

Il est connu que le LOS de *H. influenzae* est capable de stimuler des cellules épithéliales bronchiques humaines à exprimer IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1 et TNF- α [27, 50]. Le LOS sur-régule également l'expression d'ICAM-1 à la surface de ces cellules [37, 50]. Il semble aussi que le relâchement de IL-8 dans la phase initiale de l'inflammation soit le résultat d'une stimulation directe par le LOS, et dans la phase secondaire, le résultat de l'induction par TNF- α et/ou IL-1 [50].

Un modèle de cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de rat a permis de démontrer que le LOS de *H. influenzae* peut également induire une augmentation de la perméabilité de la BBB à l'albumine, sans provoquer la destruction de cellules [120, 121]. Le LOS de *H. influenzae* est également cytotoxique pour des cellules endothéliales aortiques bovines [58], et est capable d'endommager une monocouche de cellules endothéliales de cerveau bovines [87].

Il a été démontré que le LOS de *Haemophilus (Histophilus) somnus* pouvait provoquer l'apoptose de cellules endothéliales bovines [112, 113]. Le LPS de *Mannheimia haemolytica* (anciennement désignée sous le nom de *Pasteurella haemolytica*) induit quand à lui l'apoptose de cellules endothéliales bovines de microvaisseaux pulmonaires [64]. Enfin, le LPS de *Actinobacillus pleuropneumoniae* est indispensable pour l'adhésion de la bactérie à des cellules du tractus respiratoire [15, 86].

2.4. Systèmes d'acquisition du fer

Morton et Williams [74] ont proposé le premier modèle d'acquisition du fer par *H. parasuis*, en montrant que la bactérie pouvait lier la transferrine porcine. Ensuite, Charland *et al.* [24] ont assigné cette fonction à deux potentiels polypeptides qui pourraient spécifiquement lier le fer de la transferrine porcine, mais pas de la lactoferrine.

Plus tard, del Rio *et al.* [31] ont démontré la présence d'une région TonB chez *H. parasuis*, et que les protéines encodées par ces gènes étaient sur-

régulées dans des conditions de privation en fer. De plus une similarité de taille et d'organisation entre les gènes de la région TonB de *H. parasuis* et d'*A. pleuropneumoniae* et *Actinobacillus suis* a été observée. Leurs observations semblent également indiquer que la région N-terminale de TbpB pourrait être une région immunodominante, pouvant être utilisée dans un vaccin.

L'étude de l'expression de gènes de *H. parasuis* dans des conditions de privation en fer a également permis d'identifier des homologues de gènes de *H. influenzae*, *Pasteurella multocida* et de *Yersinia pestis* impliqués dans l'acquisition du fer, et qui semblent être reliés à la virulence de ces bactéries [66].

Récemment, del Rio *et al.* [32] ont démontré la présence de la région Fhu (ferric hydroxamate uptake) et l'expression du récepteur FhuA chez *H. parasuis*. Ces résultats supportent l'hypothèse selon laquelle *H. parasuis* pourrait utiliser le ferrichrome comme source de fer, ce qui pourrait lui permettre de croître et survivre dans des conditions de limitation en fer. Le système de capture du ferrichrome comprend 4 gènes codant pour 4 protéines qui coopèrent dans les étapes de capture, translocation, et transport des sidérophores du milieu extracellulaire jusqu'au cytoplasme. La présence du récepteur FhuA chez tous les sérotypes de *H. parasuis* a également été démontrée [32]. Cependant son expression semble être indépendante de la concentration en fer dans le milieu de culture. De plus, les boucles extracellulaires de FhuA seraient exposées au système immunitaire durant l'infection puisque des porcs infectés ont développé une réponse immunitaire humorale contre cette protéine.

2.5. Résistance au sérum

Récemment, la résistance de plusieurs souches de *H. parasuis* à l'effet bactéricide du sérum a été testée [23]. Les souches isolées des cavités nasales de porcs sains étaient sensibles à l'effet bactéricide du sérum alors que les souches systémiques étaient principalement résistantes. Les souches pulmonaires incluaient des souches sensibles ainsi que des souches résistantes au sérum. De plus, les souches pulmonaires résistantes au sérum ont été isolées chez des animaux avec des lésions systémiques. Les résultats de cette étude semblent

indiquer que la résistance au sérum serait un mécanisme de virulence de *H. parasuis*.

Les observations de cette étude ont également permis de montrer que le complément était un facteur clé dans cet effet, puisque un traitement du sérum à la chaleur abolit l'activité bactéricide. Une susceptibilité équivalente a été démontrée avec du sérum de porc ou de lapin. De plus, la présence d'anticorps spécifiques dirigés contre *H. parasuis* n'augmentait pas la destruction des souches par le sérum. Cette observation suggère que les anticorps ne sont pas impliqués dans l'activation du complément [23].

2.6. Formation de biofilms

Les biofilms sont formés par une communauté de bactéries, liées entre elles par une matrice extracellulaire polysaccharidique qu'elles produisent, et adhérant à une surface biotique ou abiotique. Les biofilms jouent un rôle important dans l'évasion du système immunitaire et dans la résistance aux agents anti-microbiens, menant à des infections persistantes et chroniques [28, 41].

La capacité de *H. parasuis* à former des biofilms a été décrite récemment à l'aide de tests en tubes ou en microplaques de polystyrène [48]. Il a été décrit que 67% des souches de référence et 43% des souches de champ - incluant les souches représentant 13 sérotypes (exceptés les sérotypes 3 et 8) et des souches non typables - montraient une capacité à former des biofilms à différents niveaux via les essais en plaque de polystyrène. Parmi les souches de référence représentant les 15 sérotypes, les souches des sérotypes 2, 9, 12, 13 et 15 ne formaient pas de biofilms sur la surface en polystyrène. Il a également été démontré que 85% des souches formant des biofilms à l'interface air-liquide dans les tubes, formaient aussi des biofilms sur les surfaces en polystyrène. Généralement, les sérotypes non virulents ont montré un plus haut degré de formation de biofilm que les sérotypes virulents.

Le phénotype de formation de biofilm de la plupart des souches était maintenu lors de passages en bouillon et en gélose [48]. Les souches de *H. parasuis* provenant des cavités nasales d'animaux infectés expérimentalement

avec des bactéries ayant la capacité à former des biofilms maintenaient le phénotype de formation de biofilm, alors que les bactéries retrouvées dans les poumons ou le cerveau perdaient leur aptitude à former des biofilms. Les isolats provenant d'animaux infectés avec des souches ne formant pas de biofilms n'étaient pas capables d'en produire suite à l'infection expérimentale.

Les résultats de cette étude indiquent que la plupart des sérotypes de *H. parasuis* peuvent former des biofilms *in vitro*, et que le phénotype de formation de biofilm est associé avec le site de provenance des souches, et maintenu lorsque les bactéries subissent des passages *in vitro* et *in vivo* dans le tractus respiratoire supérieur [48].

2.7. Gènes associés à la virulence

Dans le but de caractériser des facteurs de virulence de *H. parasuis*, des études de "differential display RT-PCR" [43] et de "microarray" [66] ont été réalisées. La surexpression de certains gènes a été mesurée en fonction de diverses conditions de stress.

Pour l'expérience de "differential display RT-PCR", l'expression des gènes a été testée à une température de 40°C et en absence de sérum de porc ou en présence de sérum de porc désactivé pour mimer les conditions rencontrées par *H. parasuis* dans le tractus respiratoire lors d'une infection aiguë [43]. Plusieurs gènes sont effectivement surexprimés, codant pour des protéines impliquées dans le transport, le métabolisme, et la biosynthèse d'acides gras et d'acides aminés, mais sans aucun lien avec la virulence [43].

Les conditions testées pour la détection de gènes par "microarray" sont une privation en fer, des stress acides et thermiques, et une croissance microaérobie (diminution de l'oxygène disponible comme lors de la propagation systémique et de la cyanose) [66]. Soixante-quinze gènes régulés ont été identifiés, parmi lesquels on retrouve des gènes qui codent pour des transporteurs pour le fer et des sucres, des enzymes métaboliques, le métabolisme de l'ADN, et des protéines hypothétiques de fonction inconnue. Le système phosphotransférase (PTS) semble jouer un rôle important dans l'adaptation au stress. Des homologues de certains de ces gènes sont connus comme facteurs de virulence chez d'autres

bactéries pathogènes, et certains sont exprimés lors d'infections naturelles ou expérimentales par des pathogènes de la famille des *Pasteurellaceae* [66].

Plus récemment, Metcalf et MacInnes [67] ont tenté d'identifier les gènes d'une souche virulente du sérovar 5 de *H. parasuis* avec expression modifiée suite à une restriction en fer ou en présence de liquide céphalo-rachidien (CSF) porcin, conditions qui reflètent les conditions de croissance *in vivo*. À l'aide d'une technique de représentation différentielle obtenue par transcriptase inverse suivie d'une réaction d'amplification en chaîne par la polymérase, ils ont observé que des homologues de l'aldolase du fructose bisphosphate (*fba*), de la synthétase de l'adénylsuccinate (*purA*), de la phosphodiesterase des nucléotides 29,39-cycliques (*cpdB*), de la peptidase signal des lipoprotéines (*lspA*), de la pyrophosphate réductase (*lytB*), de la superoxide dismutase (*sodC*), de la tyrosyl ARN-t synthétase (*tyrS*), de la cystéine synthétase (*cysK*), une protéine inconnue, et un homologue d'une hydrolase de la super-famille des haloacides déshydrogénases étaient tous régulés à la hausse en réponse à une carence en fer. De plus, les homologues de *purA*, *cpdB*, *lspA*, *lytB*, et *sodC*, des ADNc homologues à un co-transporteur Na⁺/alanine, une ligase des acides gras (*fadD*), la diadénosine tétraphosphatase (*apaH*), et une protéine inconnue étaient régulés à la hausse en réponse au CSF.

Lorsque les souches de référence des 15 sérovars ont été éprouvées pour la présence de ces gènes afin d'évaluer leur utilité comme marqueurs diagnostiques des souches avec un potentiel de virulence élevé, les homologues de tous les gènes exprimés de manière différentielle ont été détectés chez toutes les souches de référence. Toutefois, l'homologue de l'hydrolase n'était exprimé que chez les souches représentatives de *H. parasuis* associées à un potentiel de virulence élevé, ce qui suggère que cet enzyme pourrait jouer un rôle dans la pathogénie [67].

3. La pathogénèse de l'infection causée par *H. parasuis*

H. parasuis est une bactérie commensale des voies respiratoires supérieures du porc [20, 84]. Dans certaines situations, *H. parasuis* est capable de

causer la maladie de Glässer, sporadique et associée au stress, caractérisée par de la polysérosite fibrineuse, de l'arthrite et de la méningite chez les porcelets dans les élevages conventionnels, et une septicémie aiguë plus dévastatrice chez les porcs non immuns à haut statut sanitaire de tous âges [62]. *H. parasuis* est aussi capable d'induire une pneumonie aiguë et une large variété d'autres infections.

3.1. Colonisation du tractus respiratoire supérieur

La pathogenèse de l'infection causée par *H. parasuis* est encore mal connue car elle a été peu explorée à ce jour. *H. parasuis* est fréquemment retrouvé dans les cavités nasales ou dans la trachée et les amygdales des porcs sains [20, 84]. La colonisation semble être la première étape de pathogénicité pour plusieurs espèces bactériennes. Cependant, le site initial de colonisation par *H. parasuis* dans le tractus respiratoire supérieur d'animaux infectés est encore controversé. *H. parasuis* était constamment isolé de la cavité nasale et de la trachée, rarement des poumons et de la circulation sanguine, mais pas des amygdales de porcs nés par césarienne et privés de colostrum inoculés par voie intranasale [124]. De plus, certains auteurs ont rapporté l'isolement constant de *H. parasuis* de la cavité nasale et des amygdales de porcs infectés par voie intranasale, ou d'écouvillons provenant des amygdales ou de la trachée d'animaux infectés par voie intratrachéale [3, 101]. Des résultats similaires ont été rapportés par l'équipe de Kirkwood [54], bien qu'il semble qu'une plus grande quantité d'isolats aient été retrouvés dans des écouvillons nasaux plutôt que dans des écouvillons provenant de la trachée.

3.2. Voies d'entrée possibles dans le sang et dissémination dans l'organisme

Ensuite, la bactérie doit gagner accès à la circulation sanguine et se disséminer à travers l'hôte par diffusion systémique [124]. Cependant, comment *H. parasuis* traverse la muqueuse du tractus respiratoire pour entrer dans la circulation sanguine est un phénomène peu connu. Vahle *et al.* [124] ont observé des lésions dans la muqueuse nasale et trachéale. Il a été émis l'hypothèse selon laquelle *H. parasuis* se lie à la couche de mucus, endommage l'épithélium mucosal,

et induit de l'inflammation [123, 124]. Ces altérations pourraient altérer les mécanismes de défense de l'hôte et permettre à *H. parasuis* d'envahir la muqueuse et d'atteindre la circulation sanguine [124]. Plus récemment Auger *et al.* [8] ont démontré que *H. parasuis* était capable d'adhérer à une lignée cellulaire de trachée porcine (NPT_r).

Après avoir atteint la circulation sanguine, les bactéries circulantes doivent résister à la phagocytose pour maintenir de fortes concentrations dans le sang. Segales *et al.* ont rapporté que *H. parasuis* était capable de résister à la phagocytose par les macrophages alvéolaires [102]. On ne connaît rien des interactions entre *H. parasuis* et les polymorphonucléaires ou les monocytes du sang, mais en revanche, on peut supposer que la bactérie pourrait également résister aux phagocytes du sang.

3.3. Voies d'entrée possibles dans le SNC

Les facteurs impliqués dans l'invasion systémique par *H. parasuis* sont inconnus. Pour causer la méningite, *H. parasuis* doit rejoindre le système nerveux central. La bactérie pourrait gagner accès au SNC en traversant la barrière hémato-méningée. Le passage de la bactérie à travers la BBB semble être une étape clé dans la pathogenèse de la méningite [127].

Il a récemment été démontré que *H. parasuis* était capable d'adhérer à et d'envahir des cellules endothéliales porcines de microvaisseaux cérébraux (PBMEC) [127]. Il a également été démontré que *H. parasuis* était capable de survivre à l'intérieur des PBMEC pendant plusieurs heures [127]. Suite à cette observation, il a été suggéré que *H. parasuis* pourrait entrer dans les cellules par un processus transitoire, puisque le nombre de bactéries diminuait ensuite graduellement. Il a été émis l'hypothèse selon laquelle *H. parasuis* pourrait ressortir par exocytose après avoir envahi les PBMEC. En revanche, la diminution du nombre de bactéries intracellulaires viables pourrait également être due, en partie, à la mort bactérienne [127].

Le rôle de la synthèse d'ADN, d'ARN et de protéines dans l'invasion des PBMEC par *H. parasuis* a également été évalué. Les résultats de cette étude

suggèrent que la synthèse d'aucune de ces composantes n'est requise par *H. parasuis* pour envahir les PBMEC, et que l'entrée de la bactérie pourrait être médiée par des invasines putatives déjà existantes interagissant avec un récepteur cellulaire. Cependant, il a été observé que les protéines bactériennes ne semblent pas jouer un rôle important dans l'invasion des PBMEC par *H. parasuis*. Il a donc été suggéré que le LOS pourrait être impliqué dans l'adhésion à et l'invasion des PBMEC par *H. parasuis* [127].

Le rôle de composantes du cytosquelette de l'hôte dans l'invasion des PBMEC a aussi été évalué. Il a été observé que la réorganisation de certaines composantes du cytosquelette de l'hôte comme les microfilaments d'actine et les microtubules était requise pour l'entrée de *H. parasuis* à l'intérieur des PBMEC [127].

4. Apoptose

4.1. Généralités

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus physiologique naturel qui intervient lors du développement embryonnaire, mais également tout au long de la vie pour éliminer principalement les cellules âgées ou endommagées, pour maintenir l'homéostasie des tissus, et pour éliminer les cellules infectées par des microorganismes [21, 130].

L'apoptose est une forme de mort cellulaire finement régulée et dépendante de l'expression de la machinerie interne de suicide de la cellule, dans laquelle la cascade des caspases est induite [21, 132]. Les changements morphologiques importants qui ont lieu pendant l'apoptose incluent le rétrécissement de la cellule, la perte de l'attachement aux autres cellules, la condensation de la chromatine, la fragmentation du noyau, le clivage de l'ADN chromosomal aux sites internucléosomiaux qui résulte en la génération d'un patron de fragments d'ADN caractéristique sur gels d'électrophorèse, et le renflement de la surface cellulaire avec apparition de protusions qui résultent en le relâchement de corps apoptotiques. Dans les premières étapes de l'apoptose, les phosphatidylsérines qui sont normalement localisées dans la face interne de la membrane plasmique,

sont transloquées et ainsi exposées à la surface, et fournissent un signal de reconnaissance pour l'englobement par les phagocytes [21, 130, 132].

4.2. Mécanisme d'apoptose

L'apoptose est régulée de manière stricte par l'interaction de molécules pro- et anti-apoptotiques. La machinerie apoptotique est activée quand l'équilibre entre ces molécules est perturbé par la suppression de signaux de survie comme les facteurs de croissance, par l'intervention de signaux particuliers lors du cycle cellulaire, ou par la reconnaissance d'une molécule spécifique à la surface de la cellule [130].

Le mécanisme de signal médié par un récepteur est complexe. L'apoptose peut être activée par une voie extrinsèque ou intrinsèque, et induite par la stimulation de récepteurs de mort dans la membrane plasmique ou par la perméabilisation de la membrane mitochondriale en réponse à une perturbation de l'homéostasie intracellulaire [21].

Les récepteurs de mort appartenant à la super famille récepteur TNF (TNFR) sont des protéines transmembranaires localisées dans la membrane cytoplasmique [130]. Leurs domaines extra-cellulaires sont responsables de la fixation des ligands. Ils possèdent aussi des " death domains " ou " domaines de mort " (DD) dans leur queue cytoplasmique qui permet aux récepteurs de mort de s'engager dans la machinerie apoptotique. Dans certaines situations, ces domaines médient des interactions qui suppriment le stimulus apoptotique [130]. Les récepteurs de mort TNFR et CD95 (Fas) lient TNF- α et le ligand CD95 (CD95L ou FasL), respectivement. Suite à la fixation du ligand, les domaines de mort de CD95 interagissent avec la protéine de domaine de mort associée au Fas (Fas-associated DD protein, FADD), une molécule adaptatrice qui est recrutée au complexe récepteur. La protéine FADD, qui contient un " death effector domain " ou " domaine effecteur de mort " (DED), se lie ensuite à un domaine analogue de la procaspase-8 formant ainsi le complexe DISC death-inducing signaling complex (voir Figure 2). Le signal via TNFR requière une molécule adaptatrice additionnelle pour interagir avec le FADD, appelée protéine de domaine de mort associée au

TNFR (TNFR-associated-DD protein). Cette protéine peut aussi se lier au facteur 2 associé au TNFR ou à une protéine réceptrice. Le facteur 2 associé au TNFR et la protéine réceptrice stimulent l'activation de la transcription et agissent comme signaux anti-apoptotiques [130].

Les mitochondries jouent un rôle majeur dans l'orchestration de l'apoptose. Durant l'apoptose, le cytochrome *c* et probablement d'autres facteurs sont relâchés dans le cytoplasme par la mitochondrie. Le cytochrome *c* est requis pour la formation d'un complexe pro-apoptotique appelé apoptosome, qui inclue aussi le cofacteur Apaf-1 et la procaspase-9 et qui nécessite du dATP (voir Figure 2) [130].

Lors de l'apoptose, de nombreuses protéines sont mises en jeu, dont les membres de la famille des caspases et de la famille Bcl-2 qui ont un rôle important et des fonctions biologiques distinctes. Concernant les mécanismes biochimiques qui résultent en un phénotype apoptotique, il semble que diverses voies de signalisation soient impliquées, et qu'elles convergent vers une voie commune qui résulte en l'hydrolyse de plusieurs protéines clé [118, 130].

Les membres de la famille des caspases sont spécifiquement activés et représentent les exécuteurs responsables de la plupart des changements morphologiques observés dans les cellules apoptotiques [130]. Les caspases participent de trois façons dans l'apoptose. Elles peuvent inactiver des inhibiteurs. Elles peuvent également dissocier l'effecteur et les domaines régulateurs d'autres protéines. Enfin, elles contribuent à l'apoptose en détruisant des protéines structurales comme les laminines qui forment l'échafaudage du noyau, et des protéines du cytosquelette comme l'actine [80, 130]. Elles réorganisent aussi les structures cellulaires en clivant plusieurs protéines impliquées dans la régulation du cytosquelette, ou dans la synthèse et la réparation de l'ADN, et peuvent activer des nucléases [80, 119]. Les caspases sont des molécules effectrices synthétisées en zymogènes de faible activité catalytique (procaspase) qui gagnent leur activité complète après leur clivage en un site spécifique. Les caspases sont impliquées dans la phase effectrice (caspase-3, -6 et -7) de l'apoptose où elles ont une activité protéolytique, et dans les voies de signalisation en amont où elles sont activées et activent (caspase-2, -8, -9 et -10) les caspases de la phase effectrice [118, 130]. Ainsi, dépendamment de la voie de signalisation (intrinsèque ou extrinsèque), les

caspases initiatrices caspase-8 ou caspase-9 vont être activées, et vont à leur tour activer les caspases effectrices caspase-3 et caspase-7, qui vont ensuite déclencher une cascade de réaction en activant d'autres caspases. La caspase-3 clive des cibles en aval et engage irréversiblement la cellule dans le processus apoptotique menant à sa mort (voir figure 2).

Les membres de la famille Bcl-2 sont également des protéines importantes puisqu'elles sont des régulateurs clé de l'apoptose. Cette famille de protéines inclue Bcl-2 et Bcl-x_L qui sont des inhibiteurs, alors que Bax, Bak, Bim, Bad et Bid régulent positivement l'apoptose [130]. Certains des membres pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 peuvent réguler la concentration de protéines libres, et décider du sort de la cellule. Bcl-2 est localisé dans la face cytoplasmique de la mitochondrie, le réticulum endoplasmique, et l'enveloppe nucléaire. La structure tri-dimensionnelle (similaire à celle des protéines bactériennes formant des pores) de certains membres de la famille peut leur permettre de fonctionner comme des pores pour de petites molécules. Les membres anti-apoptotiques de la famille peuvent prévenir la liaison d'activateurs de caspases aux caspases. Bcl-2 peut aussi réguler la perméabilité de la membrane mitochondriale pour le passage d'activateurs de caspases vers le cytoplasme. Les membres pro-apoptotiques peuvent induire la mort de la cellule indépendamment de l'activité des caspases, suggérant que leur capacité à former des pores pourrait être suffisante pour induire l'apoptose [130].

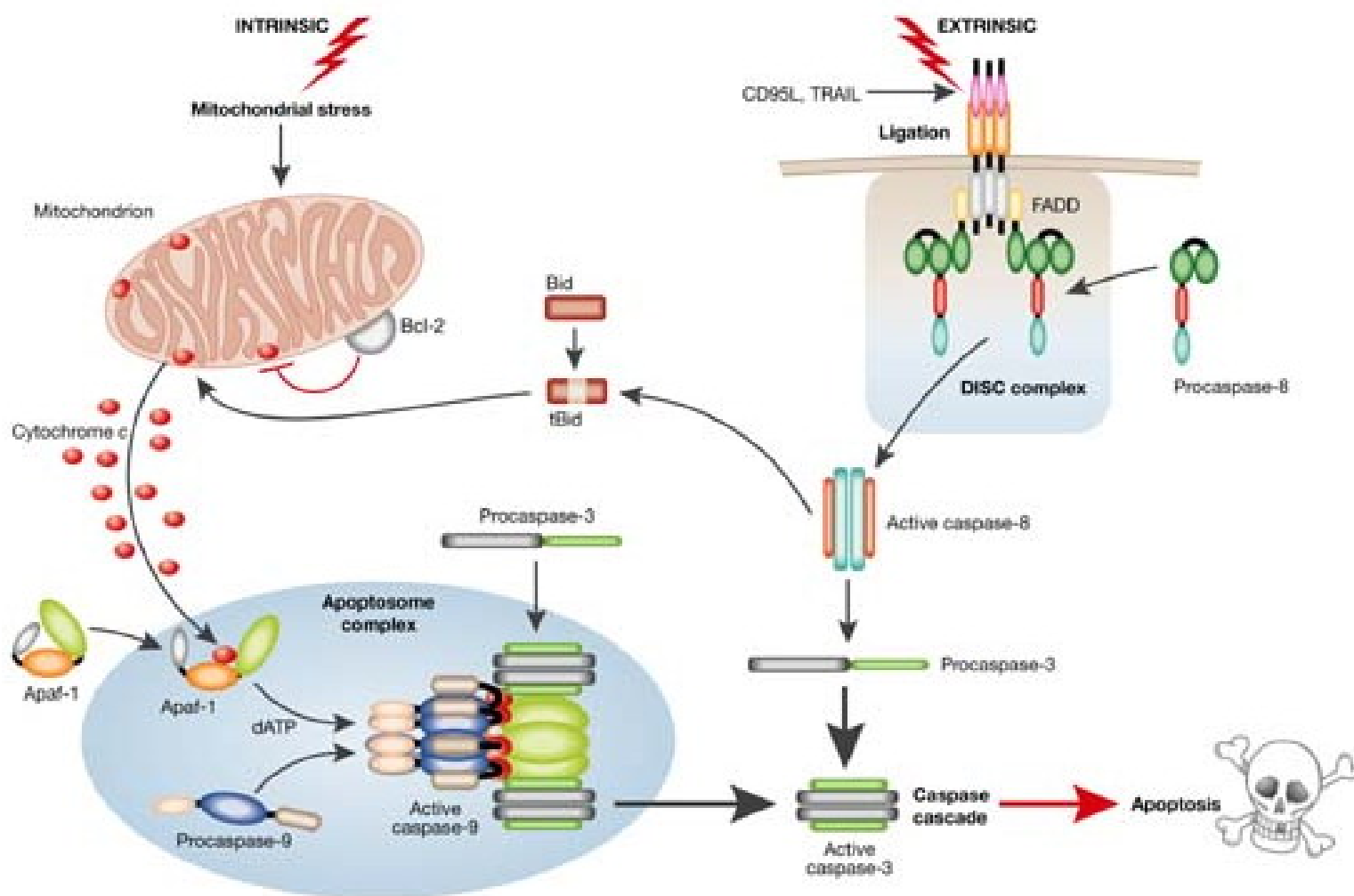


Figure 2 : Les voies de l'apoptose

4.3. Apoptose versus cytotoxicité

Comme mentionné ci-haut, les cellules apoptotiques sont éliminées de l'organisme par phagocytose sans provoquer de réaction inflammatoire, et donc sans affecter les cellules environnantes. Contrairement à l'apoptose, l'induction d'un effet cytotoxique sur une cellule peut avoir des conséquences sur son environnement. En effet, la cytotoxicité provoque généralement le bris de la membrane cytoplasmique ayant pour effet la lyse de la cellule et du noyau. La libération du contenu cellulaire dans l'environnement cause de l'inflammation au niveau des cellules voisines.

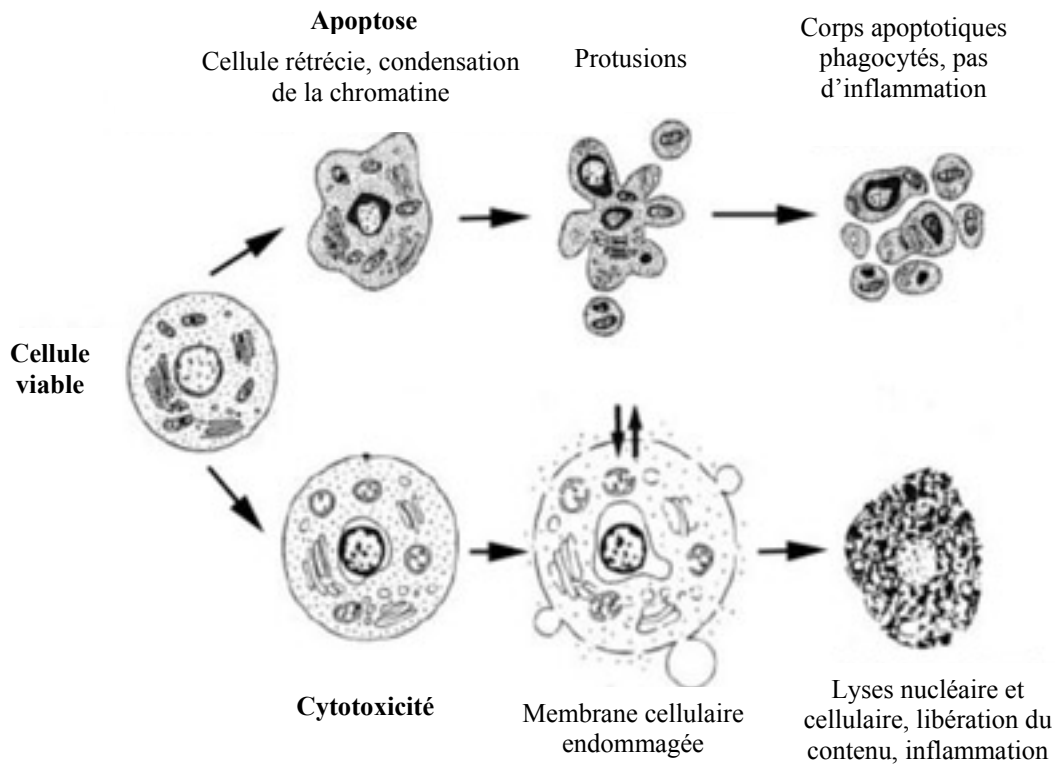


Figure 3 : Apoptose versus cytotoxicité

4.4. Induction de l'apoptose par les bactéries

Les stratégies utilisées par les pathogènes pour activer l'apoptose pourraient être nécessaires pour renverser les réponses de défense normales de l'hôte. Bon nombre de pathogènes sont armés d'une panoplie de déterminants de virulence qui interagissent avec les composantes clé de la voie apoptotique de l'hôte ou avec la régulation des facteurs de transcription contrôlant la survie cellulaire [130]. Ces facteurs de virulence induisent la mort cellulaire grâce à une variété de mécanismes incluant (a) des toxines formant des pores qui interagissent avec la membrane cellulaire de l'hôte et induisent la fuite des composantes cellulaires, (b) d'autres toxines qui expriment leur activité enzymatique dans le cytosol de l'hôte, (c) des protéines effectrices délivrées directement dans la cellule hôte par un système de sécrétion de type III hautement spécialisé, (d) des superantigènes qui ciblent les cellules immunitaires, et (e) d'autres modulateurs de la mort cellulaire de l'hôte [130].

Plusieurs bactéries de la famille des *Pasteurellaceae* sont des pathogènes qui ont eux aussi développé des stratégies pour coloniser ou causer des dommages en induisant l'apoptose des cellules de l'hôte.

Le LPS est un facteur de virulence de *M. haemolytica*, il provoque des changements morphologiques et induit l'apoptose de cellules endothéliales bovines de microvaisseaux pulmonaires [64]. *M. haemolytica* possède également une leucotoxine, qui a elle aussi des propriétés apoptotiques sur des lymphoblastes bovins, et il a été démontré que la mort de ces cellules résulte de l'activation des caspases-3 et -9 avec libération de cytochrome c de la mitochondrie vers le cytoplasme [7].

Le LPS de *Actinobacillus (Aggregatibacter) actinomycetemcomitans*, un autre pathogène de la famille des *Pasteurellaceae*, induit l'apoptose des cellules J744.1, une lignée cellulaire de macrophages murins, des macrophages péritonéaux de souris C3H/HeN, ainsi que des macrophage humains [109]. *A. actinomycetemcomitans* dispose d'un autre facteur de virulence important, la "cytolethal distending toxin" qui induit l'apoptose de cellules T humaines en provoquant l'arrêt du cycle cellulaire dans la phase G₂ [103].

A. pleuropneumoniae possède quand à lui la toxine Apx qui induit l'apoptose de macrophages alvéolaires porcins [25].

Tout comme *A. actinomycetemcomitans*, *H. ducreyi* dispose d'une "cytolethal distending toxin" qui induit l'apoptose d'une grande variété de cellules humaines comme les cellules myéloïdes, les cellules épithéliales, les kératinocytes, les fibroblastes, les cellules T et la lignée de cellules JurkaT [12, 135].

Enfin, tel que discuté dans le paragraphe 2.3.3., il a été démontré que le LOS de *H. somnus* était capable d'induire l'apoptose de cellules endothéliales bovines [112, 113]. En revanche, la capacité de *H. parasuis* ou d'une de ses composantes à induire l'apoptose n'a pas été évaluée à ce jour.

5. Cytokines

5.1. Rôle des cytokines relâchées par les cellules endothéliales et épithéliales

Il a été démontré que des cellules épithéliales humaines du tractus respiratoire étaient capables d'exprimer et de générer des cytokines spécifiques, incluant IL-6, IL-8 et TNF- α , qui pourraient jouer un rôle dans l'activation et la migration des neutrophiles au site de l'inflammation dans l'épithélium [50].

IL-6 est important pour l'induction de la phase aiguë de la réponse, l'augmentation de la production d'anticorps, et est relâché tôt lors de la réponse inflammatoire. IL-6 pourrait également contribuer à stimuler les mécanismes de défense humoral et cellulaire, et pourrait être impliqué dans les réactions médiées par les endotoxines [50, 110].

IL-8 possède des propriétés importantes d'activation des neutrophiles, incluant la chimio-attraction des neutrophiles et l'augmentation de l'attachement des neutrophiles au site d'inflammation, ce qui pourrait être une conséquence de l'expression de CD11b/CD18 à la surface des neutrophiles induite par IL-8. Il a été démontré que des cellules épithéliales bronchiques humaines sont capables de générer de l'IL-8, et que l'expression de cette chimiokine pourrait être sur-réglée par TNF- α , une cytokine multifonctionnelle connue pour augmenter la perméabilité épithéliale *in vitro*, et augmenter l'expression d'ICAM-1 [50, 104]. En effet, des cellules épithéliales bronchiques humaines sont capables d'exprimer ICAM-1, ayant un rôle dans le recrutement et la migration des neutrophiles et éosinophiles [50]. TNF- α a été décrit comme un médiateur de la cascade des cytokines, qui apparaît tôt, et induit ensuite des cytokines secondaires comme IL-1, IL-6 et IL-8 [50, 104].

IL-1 β a des effets biologiques similaires à TNF- α et augmente significativement l'adhérence des neutrophiles aux cellules endothéliales de cerveaux [50, 108]. IL-1 β augmente également l'expression de molécules d'adhésion et le relâchement de prostaglandines. IL-1 β sur-régule aussi l'expression et le relâchement de IL-8 et MCP-1 par les cellules endothéliales de cerveau. TNF- α stimule l'expression de molécules d'adhésion et de chimiokines dans des cellules endothéliales cérébrales. Les chimiokines IL-8 et MCP-1 attirent

les leucocytes grâce à leur pouvoir chimioattractant, et pourraient être responsables de l'induction de fortes interactions entre les leucocytes et l'endothélium, leur expression pourrait également être un évènement décisif dans l'initiation de la transmigration des leucocytes adhérents à travers la BBB [108]. De plus, TNF- α , IL-1 β et IL-6 ont la capacité d'augmenter la perméabilité de la BBB, puisqu'il a été démontré que ces cytokines induisaient une diminution de la TEER d'une monocouche de cellules endothéliales cérébrales de rat [29].

5.2. Rôle du LOS versus d'autres composantes bactériennes sur la production des cytokines induite par d'autres bactéries de la famille des *Pasteurellaceae*

Le LPS de *H. ducreyi*, l'agent étiologique du chancre, est impliqué dans la stimulation de cytokines pro-inflammatoires. Il induit le relâchement de IL-8 par une coculture de cellules HaCaT et HS27, une lignée cellulaire de kératinocytes et des fibroblastes de prépuce humain, respectivement [135].

Le LOS de *H. somnus* active des plaquettes qui, une fois activées, vont à leur tour stimuler la production de IL-1 β , MCP-1 et MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1alpha) par des cellules endothéliales d'artères pulmonaires bovines [56].

Tel que mentionné dans le paragraphe 2.3.3., le LOS de *H. influenzae* induit l'expression de IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1 et TNF- α par des cellules épithéliales bronchiques humaines [27, 50]. Il semble aussi que le relâchement de IL-8 dans la phase initiale de l'inflammation soit le résultat d'une stimulation directe par le LOS, et dans la phase secondaire, le résultat de l'induction par TNF- α et/ou IL-1 [50]. Le LOS de *H. influenzae* induit également l'expression de IL-5 chez des cellules PBMC (peripheral blood mononuclear cells) humaines. En plus du LOS, l'OMP P6 de *H. influenzae* a été décrite comme un puissant inducteur de cytokines. En effet, OMP P6 est capable de stimuler la production de IL-10, TNF- α , et IL-8 par des macrophages humains [16]. IL-8 est un chimioattractant pour les neutrophiles, alors que TNF- α est un indicateur de l'activation des macrophages et module les réponses médiées par les cellules T. IL-10 peut sous-réguler les réponses médiées par les cellules T. *H. influenzae* possède également une porine impliquée dans la pathophysiologie de la méningite bactérienne. Lorsque la porine est

inoculée dans un ventricule cérébral de rat, elle est responsable de l'expression de IL-1 α , TNF- α , et MIP-2 (macrophage inflammatory protein-2). Cette porine induit également la production de IL-6 et de TNF- α par des macrophages murins péritonéaux [38, 39].

Une toxine de *Pasteurella multocida* induit la production de IL-6 par des fibroblastes [96], alors qu'une porine de cette bactérie induit l'expression de IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ et IL-12 par des splénocytes murins [45]. Les endotoxines de *P. multocida* induisent le relâchement de TNF- α par des macrophages alvéolaires bovins [18].

Le LPS et une leukotoxine de *M. haemolytica* induisent le relâchement de IL-1 β , TNF- α , et IL-8 par des macrophages alvéolaires bovins [18, 63]. Le LPS de *M. haemolytica* induit aussi le relâchement de cytokines pro-inflammatoires par des cellules endothéliales bovines de microvaisseaux pulmonaires et des cellules épithéliales pulmonaires bovines. Les deux types cellulaires stimulés par le LPS produisent IL-1 α , IL-1 β et IL-8, les cellules épithéliales produisent également du TNF- α , contrairement aux cellules endothéliales qui en produisent très peu.

A. actinomycetemcomitans semble relâcher du matériel de surface libre et soluble indépendamment des vésicules de la membrane externe. Chez l'homme, ce matériel augmente clairement la production de plusieurs cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, et MIP-1 β (macrophage inflammatory protein-1beta) dans le sang [85]. *A. actinomycetemcomitans* possède également une protéine antigénique extracellulaire de 37 KDa qui induit la production de IL-1 β , TNF- α et IL-6 par des macrophages murins [117]. Le LPS de *A. actinomycetemcomitans* est quand à lui capable de provoquer le relâchement de IL-1 et TNF par des monocytes quiescents de sang périphérique humain [60].

6. Trachée

La trachée est formée de l'épithélium respiratoire, de la membrane basale, des glandes submucosales, du périchondrium, de cartilage et de muscle.

Les cellules bordant la trachée forment un épithélium pseudostratifié et sont en contact avec la membrane basale. Les cellules sont liées entre elles et à la membrane basale par des jonctions serrées qui assurent le maintien d'une barrière mécanique étanche, et qui contrôlent les échanges entre l'air et l'intérieur du corps. Les cellules épithéliales peuvent être ciliées ou être des cellules « goblet », c'est-à-dire des glandes exocrines unicellulaires. Les capillaires et les petits vaisseaux sont situés dans le tissu connectif en dessous de l'épithélium.

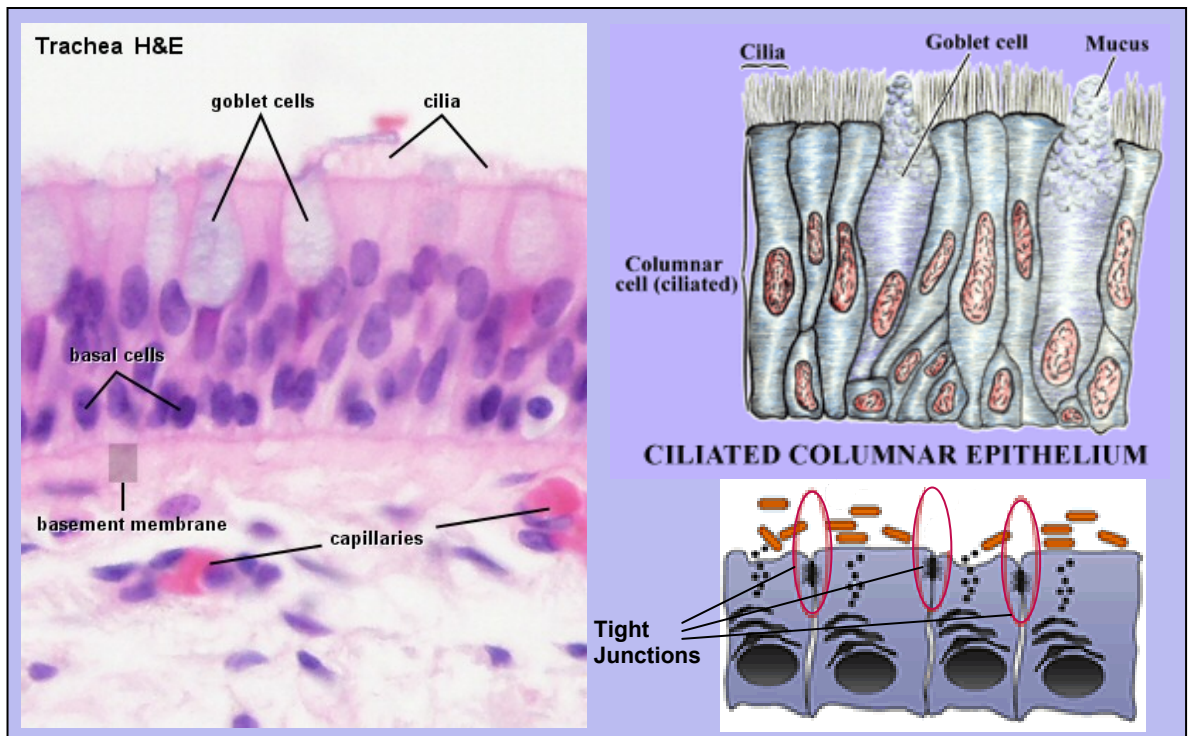


Figure 4 : L'épithélium trachéal

7. Barrière hémato-méningée

La barrière hémato-méningée est constituée de la membrane arachnoïde, du plexus choroïdien et de l'endothélium microvasculaire cérébral [121, 126]. Les cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux sont une des composantes majeures de la BBB, reliées entre elles par des jonctions serrées qui contrôlent les échanges moléculaires entre le sang et le cerveau. Des altérations de ces jonctions serrées pourraient mener à une augmentation de la perméabilité de la BBB [121].

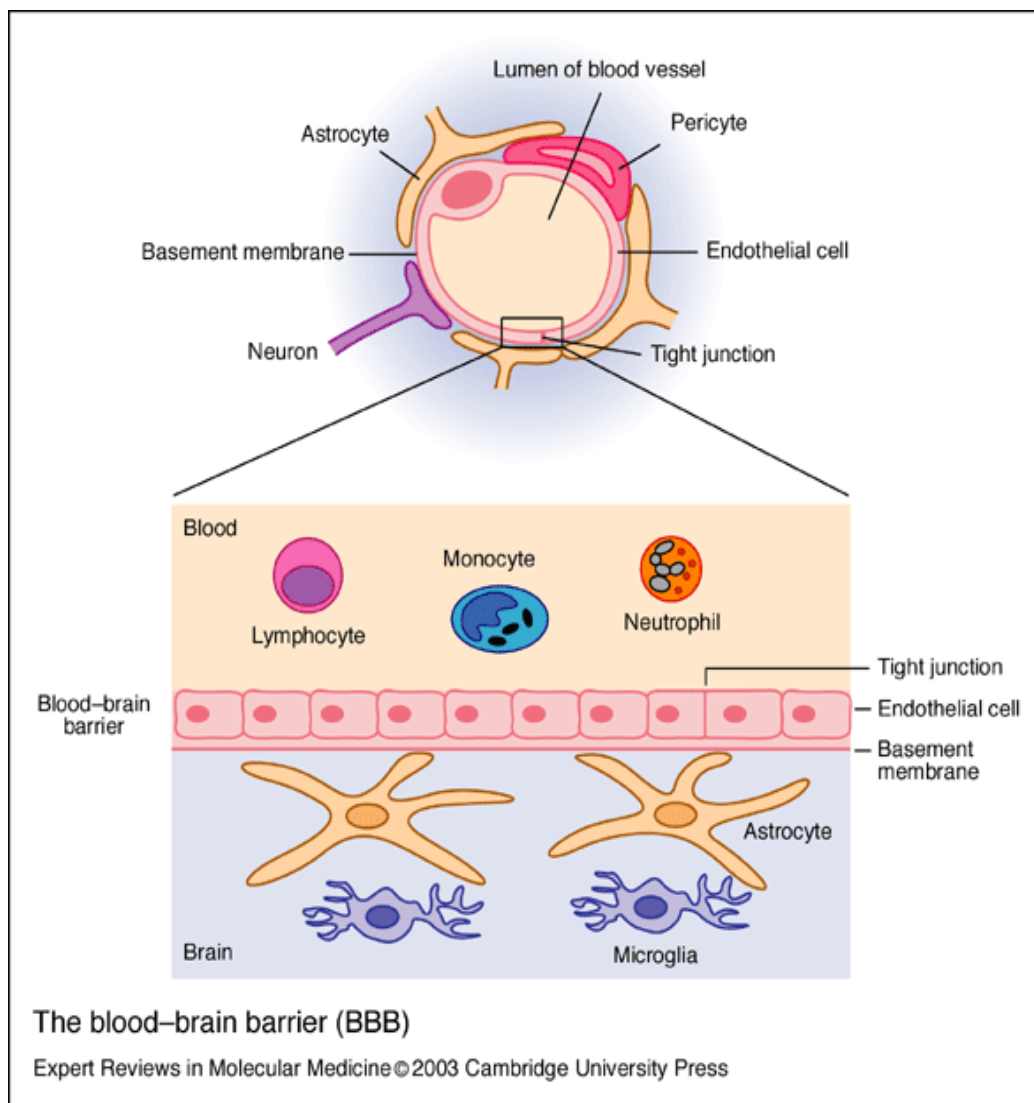


Figure 5 : La barrière hémato-méningée (BBB)

III. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

Article I

Interactions of *Haemophilus parasuis* and its LOS with Porcine Brain Microvascular Endothelial Cells

Bénédicte BOUCHET, Ghyslaine VANIER, Mario JACQUES,
Marcelo GOTTSCHALK*

Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP) and Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Sicotte, St Hyacinthe, Qc, J2S 2M2, Canada

Veterinary Research (2008) ; 39(5):42

Rôle du candidat dans la conception de l'article:

Je suis l'auteur principal de cet article. J'ai participé activement à la conception et au design expérimental et à la mise au point des techniques. J'ai aussi effectué les manipulations et l'analyse des résultats. Finalement, j'ai fait la conception graphique et j'ai écrit le manuscrit.

ABSTRACT

Haemophilus parasuis is a swine pathogen that causes Glässer's disease, which is characterized by polyserositis and meningitis. The pathogenesis of the *H. parasuis* infection is poorly understood. To cause meningitis, *H. parasuis* has to cross the blood-brain barrier (BBB) to gain access to the central nervous system (CNS). We recently showed that *H. parasuis* adheres to and invades porcine brain microvascular endothelial cells (PBMEC). The aim of this study was to evaluate the role of *H. parasuis* lipooligosaccharide (LOS) in the adhesion to PBMEC and to determine if *H. parasuis* (and/or its LOS) is able to induce apoptosis and activation of PBMEC. Results showed that adhesion of *H. parasuis* to PBMEC was partially mediated by LOS. Moreover, *H. parasuis* induces caspase-3-mediated apoptosis of PBMEC in a time –and dose– dependent manner, but its LOS did not seem to be involved in such a process. Furthermore, *H. parasuis* and, to a lesser extent, its LOS, was able to induce the release of IL-8 and IL-6 by PBMEC. Field strains of *H. parasuis* serotypes 4 and 5 induced similar levels of these inflammatory mediators. Our data suggest that *H. parasuis* uses cellular adhesion, induction of apoptosis and up-regulation of inflammatory mediators as mechanisms to invade the CNS via the BBB, and that LOS would play a certain but limited role in such pathological process.

Keywords: *Haemophilus parasuis* / LOS / endothelial cells / BBB / meningitis.

1. INTRODUCTION

Haemophilus parasuis is a commensal organism of the upper respiratory tract of swine. It is also the causative agent of Glässer's disease, which is characterized by fibrinous polyserositis, polyarthritis, meningitis as well as other important conditions [2, 22, 26, 29]. To date, 15 serotypes have been identified and serotypes 5 and 4 are the most prevalent serotypes in North America [18, 37]. However, little is known about the real nature of autoclaved antigens involved in the serotyping, being the capsule, outer membrane and lipooligosaccharide (LOS) already suggested as playing a certain role [4, 37].

The pathogenesis of *H. parasuis* infection is poorly understood. The initial site of colonization is probably the nasal cavity and/or the tracheal mucosa [29], with subsequent dissemination throughout the host [29, 41]. To cause meningitis, bacteria have to reach the subarachnoid space. Hence, the passage of bacteria through the blood-brain barrier (BBB) to access the central nervous system (CNS) is thought to be a key step in the pathogenesis of meningitis [41]. A better understanding of the mechanisms involved in this critical step is therefore of considerable importance. It has been proposed that meningeal pathogens could reach the subarachnoid space by directly invading brain microvascular endothelial cells (BMEC) [14, 41] and/or by increasing BBB permeability [38]. We recently showed that *H. parasuis* can adhere to and invade porcine BMEC [41]. BMEC, the primary components of the BBB, are linked by intercellular tight junctions that control molecular exchanges between the blood and the brain [38]. Alterations of these tight junctions can lead to an increase in BBB permeability [38]. Bacteria-induced overexpression of immunomodulatory mediators may be deleterious to the host and have been linked to an increase in BBB permeability in meningitis [38]. Alterations of endothelial cells could also be the result of bacteria-induced cytotoxic effects or cell destruction by apoptosis [35, 38]. Research thus far has suggested that *H. parasuis* is not toxic to endothelial cells [41].

Our understanding of *H. parasuis* virulence factors is also very limited, with a few putative potential candidates [5, 10, 21, 29, 33]. Differential display RT-PCR [24] and microarray [23] analysis have also suggested virulence-related genes.

Several reports have proposed that lipopolisaccharide (LPS) or lipooligosaccharide (LOS) of several meningeal pathogens such as *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus sp.* [17, 19, 25] are major virulence factors. *Haemophilus influenzae* LOS has been shown to cause marked cytotoxicity against bovine BMEC [38]. Moreover, *Histophilus (Haemophilus) somnus* LOS is known to induce apoptosis of bovine endothelial cells [35]. However, little is known about the actual biological activity of LOS from *H. parasuis*. Amano et al. [3] have proposed that *H. parasuis* endotoxins are linked to endotoxic shock, aggravation of clinical signs, and death of pigs with septicemia, suggesting that LOS might play an important role in pathogenesis. However, the specific role of *H. parasuis* LOS in the pathogenesis of infection, particularly with respect to meningitis, has yet to be investigated.

The aim of this study was to further characterize the pathogenesis of *H. parasuis*-induced meningitis by investigating the relative contribution of *H. parasuis* LOS in adhesion to porcine BMEC, and its ability to induce PBMEC apoptosis and pro-inflammatory cytokine production.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Bacterial strains and growth conditions

H. parasuis Nagasaki strain (reference strain of serotype 5) isolated from a septicemic pig with meningitis [26] (kindly provided by Dr R.F. Ross, Iowa State University, USA), was used as the reference strain in this study. Field strains of *H. parasuis* serotypes 4 (n = 18) and 5 (n = 10) isolated from cases of meningitis, septicemia, arthritis or pneumonia in swine, as well as seven strains of serotype 4 recovered from nasal swabs of clinically healthy animals (from farms considered free from endemic disease caused by *H. parasuis*) were also used in this study. Bacterial strains were grown to the late logarithmic phase of growth as described previously [41]. Bacteria were appropriately diluted in cell culture medium before infection. Heat-killed bacteria were prepared by incubation at 60 °C for 45 min, and lack of viable bacteria was confirmed by plating heat-killed bacteria suspension onto pleuropneumonia-like organisms (PPLo) agar (Difco Laboratories, Detroit, MI,

USA). For most of the experiments, we used 1×10^7 CFU/mL of live bacteria and 5×10^8 CFU/mL of heat-killed bacteria as there is an increase of live bacteria from 1×10^7 CFU/mL to 5×10^8 CFU/mL during the 48 h incubation time (data not shown).

2.2. LOS purification

LOS was purified from lyophilized *H. parasuis* Nagasaki strain, as previously described [9]. Briefly, bacteria (4 g) were subjected to two enzymatic treatments with 100 µg/mL of pancreatic DNase I (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), 25 µg/mL of pancreatic RNase A (Sigma-Aldrich) and 200 µg/mL of proteinase K (Roche, Laval, QC, Canada). Then, the bacterial suspension was passed through a French Press at 20 000 lb/in² and was sonicated at maximum intensity to ensure complete bacterial breakage. After precipitation with MgCl₂ in 95% ethanol, LOS was obtained by differential centrifugation, lyophilized (4 g of lyophilized bacteria resulted in approximately 175 mg of purified lyophilized LOS) and stored at room temperature. Protein contamination of the LOS preparation was low as determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis followed by silver and Coomassie Blue stainings. Purified LOS was also examined for the presence of proteins by bicinchoninic acid protein assay (Pierce, Rockford, IL, USA), and was shown to have less than 5% protein contamination (w/w). Endotoxins from *H. parasuis* LOS and positive control *Escherichia coli* LPS O127:B8 (Sigma-Aldrich) were quantified by a Limulus Amebocyte Lysate gel-clot test (Pyrotell, Associates of Cape Cod, Falmouth, MA, USA) (sensitivity limit of 0.5 endotoxin units (EU)/mL), according to the manufacturer's instructions. A similar concentration of endotoxin of 4 EU/ng was obtained for both *H. parasuis* LOS and *E. coli* LPS.

2.3. PBMEC adhesion assay

The PBMEC/C1-2 cell line was cultivated as previously described [41]. Cells were cultured at 37 °C with 5% CO₂ in a humid atmosphere in T75 flasks (Falcon; Becton Dickinson, Bedford, MA, USA) and Primaria 24-well tissue culture plates (Falcon) precoated with 1% (v/v) type A gelatin from porcine skin (Sigma-Aldrich).

For assays, cells were trypsinized by adding 0.05% trypsin - 0.03% EDTA solution (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) and diluted in culture medium to obtain a concentration of 8×10^4 cells/mL. Then, the cellular suspension was distributed onto tissue culture plates which were incubated until cell confluence was reached. Before assays, culture medium was removed from the wells and replaced with complete medium without antibiotics.

The adhesion assay was performed as previously described [41]. Briefly, PBMEC were infected with *H. parasuis* Nagasaki strain at 1×10^6 CFU/mL in culture medium (1 mL per well) and incubated at 37 °C with 5% CO₂. After 90 min of incubation, cells were washed five times with pyrogen-free phosphate-buffered saline (PBS, 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.3) to remove non-adherent bacteria. Then, cells were incubated with 200 µL of 0.05% trypsin - 0.03% EDTA (Invitrogen) for 10 min at 37 °C. Thereafter, 800 µL of cold water was added and cells were disrupted by scrapping the bottom of the well and by repeated pipetting. Serial dilutions of the lysate were plated onto PPLO agar (Difco Laboratories) and incubated for 48 h at 37 °C to determine the number of cell-associated bacteria. To test the role of *H. parasuis* LOS on bacterial adhesion to PBMEC, assay was performed as described above with some modifications. Briefly, purified LOS (100 µg/mL) from Nagasaki strain was added to the cell monolayer along with Nagasaki strain (1×10^6 CFU/mL). Results are expressed as percentage of adhesion compared with the adhesion level of Nagasaki strain alone (considered as 100%). Results are expressed as mean of duplicates from three independent experiments.

2.4. Cytotoxicity assay

The cytotoxic effect of bacteria or purified LOS was evaluated by measurement of lactate dehydrogenase (LDH) release using the CytoTox 96 nonradioactive cytotoxicity assay (Promega, Madison, WI, USA). Briefly, PBMEC were treated with live (up to 1×10^9 CFU/mL) or heat-killed (5×10^8 CFU/mL) *H. parasuis* Nagasaki strain, or purified LOS (up to 10 µg/mL). Monolayers were incubated with either live bacteria, heat-killed bacteria or purified LOS, and plates were centrifuged at $800 \times g$ for 10 min to increase contact of bacteria or LOS with

the cells. Then, the plates were incubated at 37 °C for different incubation times up to 48 h. Non-treated cells were used as negative control, whereas cells lysed in 9% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) were used as positive control (100% toxicity). Results are expressed as mean of duplicates from three independent experiments.

2.5. Detection of cell apoptosis

The ability of *H. parasuis* to induce apoptosis of PBMEC was determined by measuring DNA fragmentation using the Cell Death Detection ELISA kit (Roche). This immunoassay specifically detects histone regions of mono- and oligonucleosomes of fragmented DNA that are released during apoptosis. PBMEC were treated with live (1×10^8 CFU/mL) or heat-killed (5×10^8 CFU/mL) *H. parasuis* Nagasaki strain, or purified *H. parasuis* LOS (10 µg/mL). To inhibit stimulation due to LOS, polymyxin B (PmB, Sigma-Aldrich), a cationic antibiotic that binds to the lipid A region from LOS, was used. Heat-killed whole bacteria were pre-incubated with 10 µg/mL of PmB (Sigma-Aldrich) in cell culture medium with agitation for 30 min at room temperature, before incubation with PBMEC. The proapoptotic topoisomerase-I inhibitor camptothecin (CAM, 40 µg/mL, Sigma-Aldrich) was used as positive control. Apoptosis was measured at 6 h, 12 h and 24 h after stimulation. In selected experiments, cell monolayers were incubated for 24 h with different concentrations of heat-killed *H. parasuis* Nagasaki strain (1×10^6 to 1×10^9 CFU/mL). Monolayers were processed according to manufacturer's instructions. Plates were read in a Molecular Devices UVmax (Molecular Devices Corp, Sunnyvale, CA, USA) microplate reader. Samples from at least three individual assays were measured in duplicates. Results are expressed as absorbance of the experimental cell lysates read at 405 nm after 30 min which corresponds to the level of DNA fragmentation.

Apoptosis was confirmed using the Apoptosis Marker: Cleaved Caspase-3 (Asp 175) Western Detection Kit (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) which detects specifically activated caspase-3 and its inactive zymogen procaspase-3. Activation of caspase-3 requires proteolytic processing of its inactive zymogen, procaspase-3 (35 kDa), into activated p17 and p12 fragments. CAM (40 µg/mL, Sigma-Aldrich) was used as positive control. PBMEC were

incubated with heatkilled *H. parasuis* Nagasaki strain (5×10^8 CFU/mL), CAM (Sigma-Aldrich), or medium alone for 24 h. Then, monolayers were processed according to manufacturer's instructions. After western blotting, bands were visualized by adding LumiGLO substrate (Cell Signaling Technology). Results shown are representative immunoblots of three independent experiments.

2.6. Cytokine stimulation assays

Cells were treated with live or heat-killed *H. parasuis* Nagasaki strain at a concentration of 1×10^7 or 5×10^8 CFU/mL, respectively. Moreover, purified *H. parasuis* LOS (10 μ g/mL) from Nagasaki strain was used to stimulate PBMEC, while *E. coli* LPS (10 μ g/mL) was used as positive control. PBMEC were incubated for different times up to 48 h as described for the cytotoxicity assay. After each incubation time, plates were centrifuged at $800 \times g$ for 10 min and cell supernatants were harvested and frozen at -20°C .

To inhibit stimulation due to LOS, PmB (Sigma-Aldrich) was used. Whole bacteria or purified LOS were pre-incubated with 10 μ g/mL of PmB (Sigma-Aldrich) in cell culture medium with agitation for 30 min at room temperature before cell infection. In selected experiments, the monolayers were incubated with heat-killed *H. parasuis* Nagasaki strain corresponding to different concentrations (1×10^6 to 1×10^9 CFU/mL), or with field strains of *H. parasuis* serotypes 4 and 5 for 24 h.

Cytokines and chemokines were detected by direct sandwich enzyme linked immunosorbent assays (ELISA) using porcine specific pair-matched antibodies for tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. Two-fold dilutions of recombinant porcine TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, and TGF- β 1 were used to generate standard curves, and sample dilutions giving optical density readings in the linear portion of the appropriate standard curve were used to quantify the levels of each cytokine. Plates were read in a Molecular Devices UVmax (Molecular Devices Corp) microplate reader. Standard and sample dilutions were measured in duplicates and analysis were performed at least three times for each individual

stimulation assay. Unstimulated PBMEC provided basal levels of cytokine expression. These values were subtracted from data, thus all results obtained throughout this study represent up-regulated expression of cytokines after bacterial or LOS stimulation.

2.7. Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm standard deviation (SD) (error bars). Data were analysed by two-tailed, unpaired *t* test. For comparison of cytokine release induced by different *H. parasuis* strains, the Dunnett post-hoc test was used. A $P < 0.05$ was considered as significant. All assays were repeated at least three times in independent experiments.

3. RESULTS

3.1. LOS is partially involved in adhesion of *H. parasuis* to PBMEC

To determine if LOS is involved in adhesion of *H. parasuis* to PBMEC, purified LOS and live *H. parasuis* Nagasaki strain were used in a competitive binding assay. Results showed that adhesion of *H. parasuis* to PBMEC after 90 min of incubation was reduced up to $62\% \pm 27\%$ ($P < 0.05$) in the presence of 100 $\mu\text{g/mL}$ of purified LOS. A positive correlation between LOS concentration and inhibition was observed, although a similar level of decrease was observed with concentrations of LOS higher than 100 $\mu\text{g/mL}$ (up to 500 $\mu\text{g/mL}$). Similar results were obtained when cells were treated first with LOS and then incubated with live *H. parasuis* (data not shown).

3.2. *H. parasuis* and its LOS are not toxic to PBMEC

High concentrations of live (up to 1×10^9 CFU/mL) or heat-killed (5×10^8 CFU/mL) *H. parasuis* Nagasaki strain were used to stimulate PBMEC. During the period of incubation of 48 h, both live and heat-killed bacteria caused no cytotoxicity to PBMEC, with maximum values of 17% which were not significantly

different than those observed in non-treated cells. Purified *H. parasuis* LOS was also used to stimulate PBMEC and caused no detectable cytotoxicity even at concentrations up to 10 µg/mL (data not shown).

3.3. *H. parasuis* induces PBMEC apoptosis

To measure DNA fragmentation, PBMEC were incubated with heat-killed *H. parasuis* Nagasaki strain (5×10^8 CFU/mL) for different lengths of time up to 24 h. CAM induced time-dependent apoptosis, as indicated by the DNA fragmentation level observed (Fig. 1A). A time-dependent increase in PBMEC apoptosis level was also observed following incubation with heat-killed *H. parasuis* ($P < 0.05$). Apoptosis was detected as early as 6 h, remained constant at 12 h, and peaked at 24 h (Fig. 1A). A high concentration of live *H. parasuis* (1×10^8 CFU/mL) was required to induce a significant level of PBMEC apoptosis at 24 h ($P < 0.05$) (Fig. 1A) and this level was similar to that observed after 24 h stimulation with heat-killed *H. parasuis*.

Incubation of PBMEC with different concentrations of heat-killed *H. parasuis* revealed that induction of apoptosis was dose-dependent (Fig. 1B). In addition, results showed that heat-killed bacteria were potent inducers of apoptosis at high concentrations (higher than 5×10^8 CFU/mL), but apoptosis decreased rapidly to nondetectable levels at bacterial concentrations lower than 1×10^7 CFU/mL (Fig. 1B).

To determine if LOS is involved in the induction of PBMEC apoptosis, cells were incubated with purified *H. parasuis* LOS (10 µg/mL). No DNA fragmentation was observed after stimulation with LOS (Fig. 1A) even at higher concentrations of up to 100 µg/mL (data not shown). Moreover, levels of PBMEC apoptosis induced by PmB-treated heat-killed *H. parasuis* were similar to those observed with untreated heat-killed *H. parasuis* (Fig. 1A).

Apoptosis was confirmed using an anti-caspase-3 polyclonal antibody recognizing full length caspase-3 (procaspase-3, 35 kDa) and the fragment that results from its cleavage (17 kDa). We detected a 35 kDa band corresponding to procaspase-3 in each samples (Fig. 2). After CAM (positive control) and *H. parasuis* treatment, a 17 kDa band corresponding to the active form of caspase-3

appeared (Fig. 2), suggesting that this pathogen triggered caspase-3 dependent apoptosis of PBMEC.

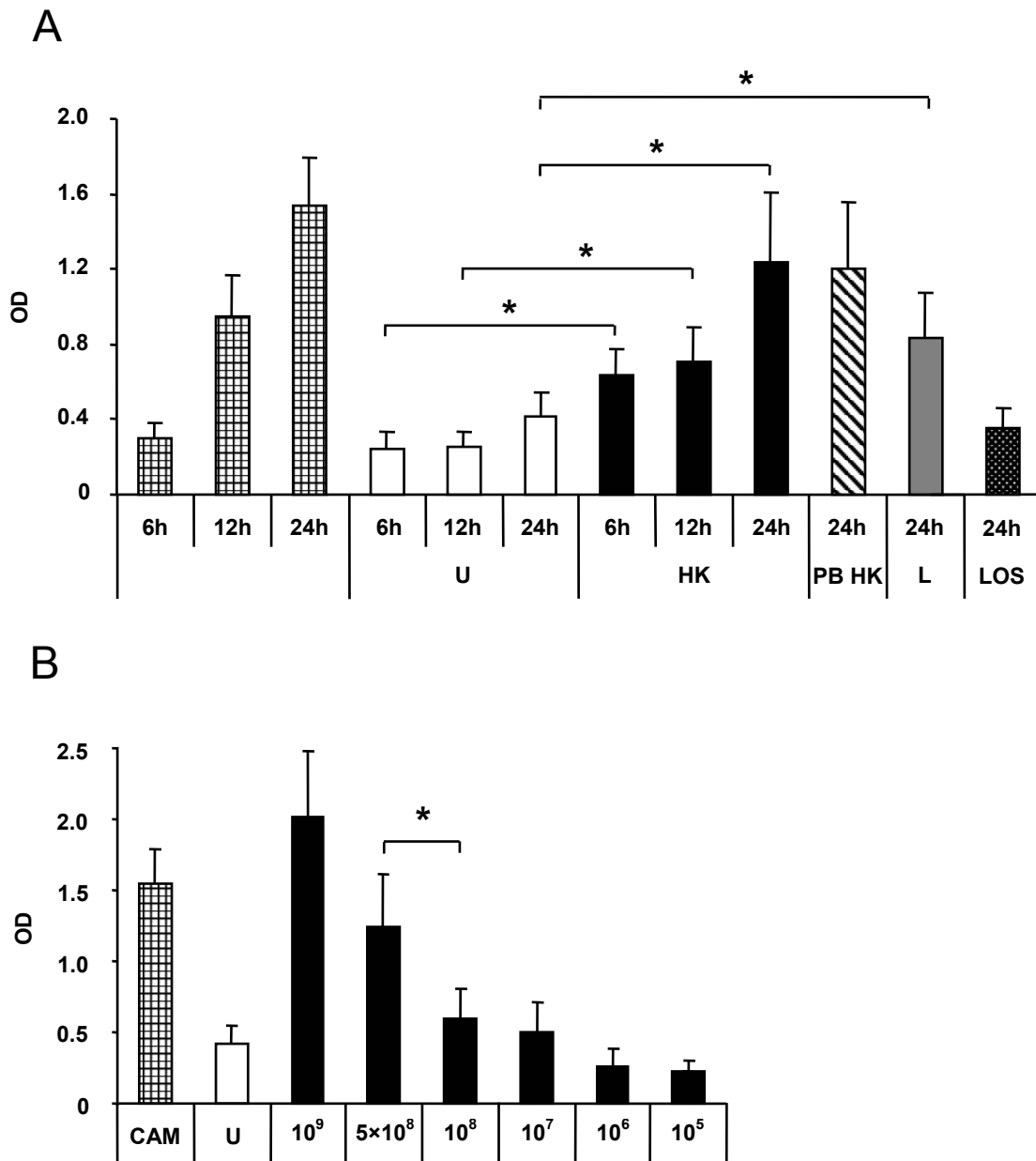


Figure 1: (A) Time course of PBMEC apoptosis after stimulation with heat-killed (HK) (5×10^8 CFU/mL), PmB-treated heat-killed (PB HK) (5×10^8 CFU/mL), live (L) (1×10^8 CFU/mL) *H. parasuis*, or LOS (10 μ g/mL). (B) Effect of varying bacterial concentrations on induction of PBMEC apoptosis by heat-killed bacteria at 24 h. Unstimulated cells (U) and CAM (40 μ g/mL) were used as negative and positive controls, respectively. Apoptosis was detected by measuring DNA fragmentation. Data are expressed as mean \pm SD. *, $P < 0.05$

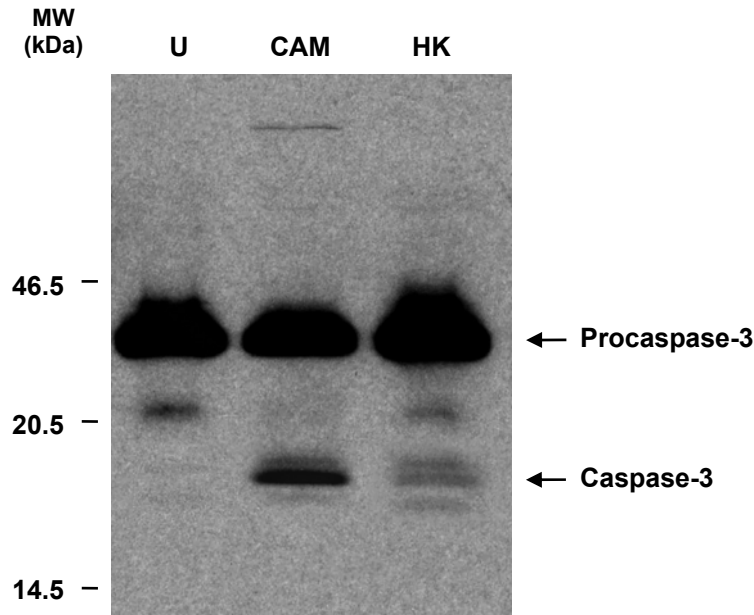


Figure 2: Western blot analysis of procaspase-3 processing in PBMEC stimulated with heat-killed *H. parasuis* (HK) (5×10^8 CFU/mL). Unstimulated cells (U) and CAM (40 μ g/mL) were used as negative and positive controls, respectively. Cells treated with controls and heat-killed *H. parasuis* were harvested and cell extracts were analysed by western blot. Procaspase-3 and caspase-3 were detected by anti-caspase-3 antibody. Arrows indicate inactive 35 kDa procaspase-3 and active 17 kDa caspase-3.

3.4. *H. parasuis* induces time-dependent release of IL-6 and IL-8 by PBMEC

Stimulation of PBMEC with live (1×10^7 CFU/mL) or heat-killed (5×10^8 CFU/mL) *H. parasuis* Nagasaki strain up-regulated the expression of IL-6 and IL-8 in a time-dependent manner as shown in Figure 3. Moreover, levels of IL-8 secretion were significantly higher than those of IL-6 ($P < 0.05$). For both IL-6 and IL-8 production, heat-killed *H. parasuis* appeared to be a more potent stimulus than live *H. parasuis* ($P < 0.05$) (Fig. 3), which can be explained by the different bacterial concentrations used. Heat-killed *H. parasuis*-induced IL-6 and IL-8 productions gradually increased throughout the incubation period ($P < 0.05$) (Fig. 3). IL-6 production reached a plateau at 24 h (Fig. 3A), while IL-8 secretion peaked at 48 h ($P < 0.05$) (Fig. 3B). Live bacteria induced a low and gradual production of

IL-6 from 6 h to 48 h ($P < 0.05$) (Fig. 3A), whereas a high level of IL-8 release was observed as soon as 6 h ($P < 0.05$) (Fig. 3B).

We also investigated the ability of live (1×10^7 CFU/mL) and heat-killed (5×10^8 CFU/mL) *H. parasuis* Nagasaki strain to induce the release of TNF- α , IL-1 β and TGF- β 1. No cytokine production was detected after 48 h incubation with either *H. parasuis* strain or with LPS positive control (data not shown).

3.5. *H. parasuis* induces dose-dependent cytokine production by PBMEC

To evaluate induction of IL-6 and IL-8 production, PBMEC were stimulated with different concentrations of heat-killed *H. parasuis* Nagasaki strain (from 1×10^6 to 1×10^9 CFU/mL) for 24 h. As shown in Figure 4, lower amounts of cytokines are produced when cells are stimulated with lower numbers of bacteria. No production of IL-6 was observed at bacterial concentrations lower than 1×10^6 CFU/mL (Fig. 4A). IL-8 production was more sustained than IL-6 production. Thus, levels of IL-8 release began to decrease at 1×10^8 CFU/mL, and then remained almost constant until 1×10^6 CFU/mL, which was the lowest concentration that was able to induce detectable IL-8 production (Fig. 4B).

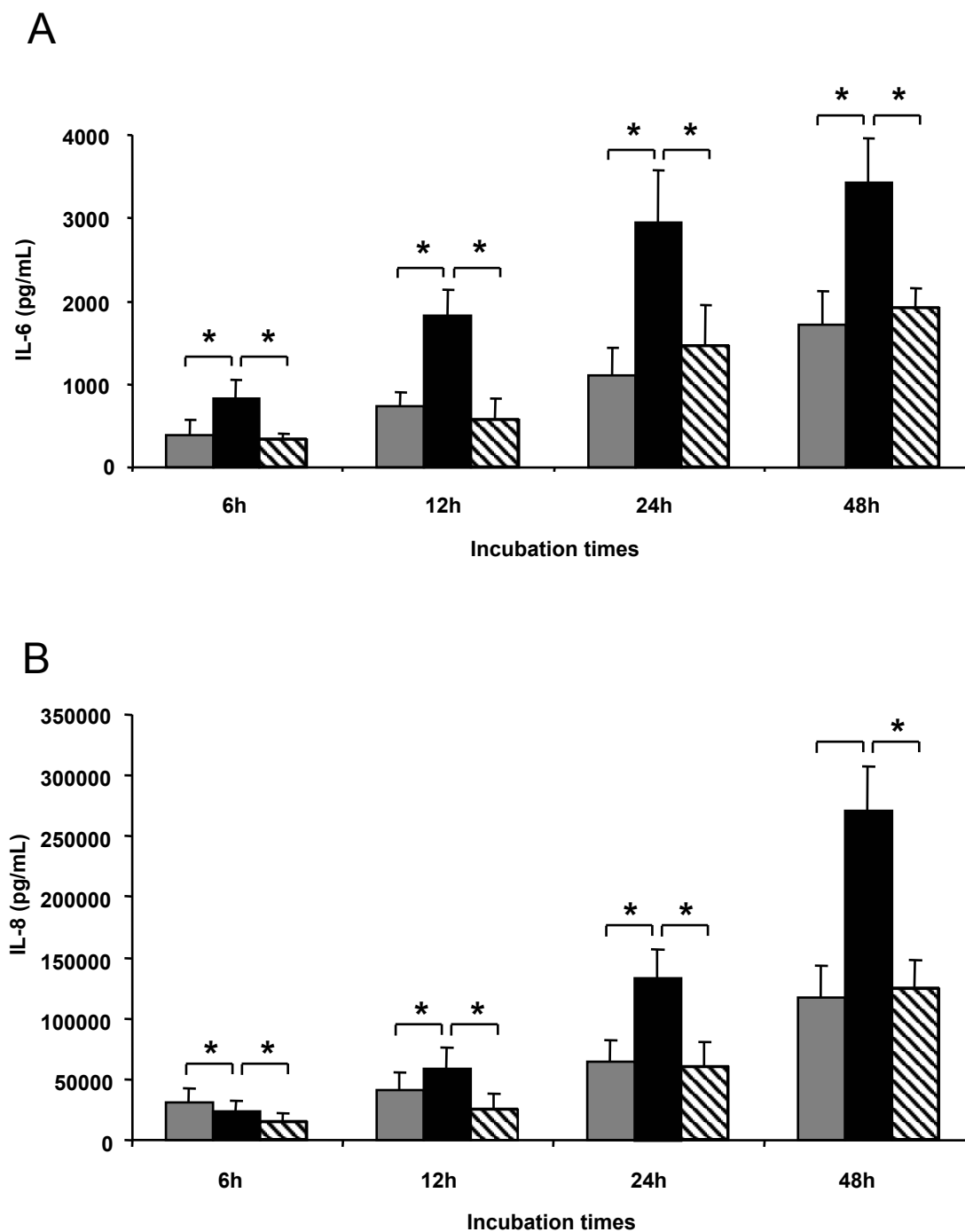


Figure 3: Kinetics of pro-inflammatory cytokines IL-6 (A) and IL-8 (B) production by PBMEC stimulated with live (1×10^7 CFU/mL, grey bars), heat-killed *H. parasuis* (5×10^8 CFU/mL, black bars), or PmB-treated heat-killed *H. parasuis* (5×10^8 CFU/mL, hatched bars). Data are expressed as mean \pm SD. *, $P < 0.05$.

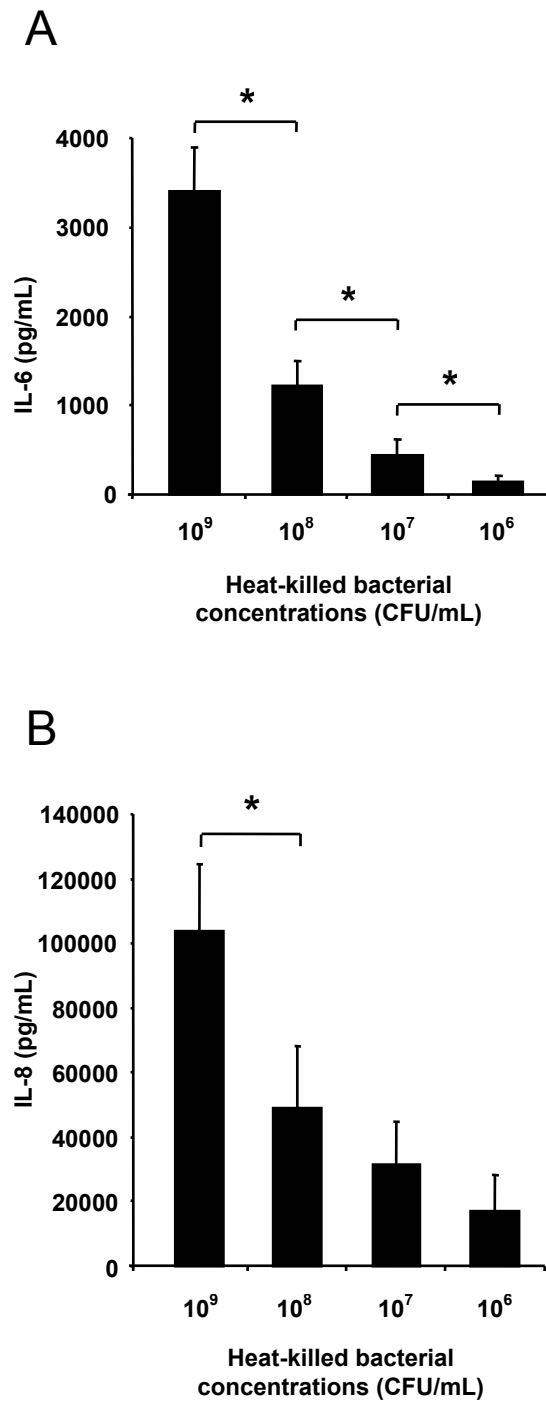


Figure 4 : Effect of different concentrations of heat-killed bacteria (1×10^6 to 1×10^9 CFU/mL) on the release of IL-6 (A) and IL-8 (B) by PBMEC after 24 h. Data are expressed as mean \pm SD. *, $P < 0.05$.

3.6. Partial involvement of LOS for cytokine release by PBMEC

It was of interest to determine whether LOS was responsible for the proinflammatory cytokine production induced by whole bacteria. To address this, experiments were performed using the LOS inhibitor PmB. No change in basal cytokine secretion was observed after incubation with PmB alone (data not shown). Heat-killed *H. parasuis* (5×10^8 CFU/mL) treated with PmB was still able to stimulate PBMEC to produce IL-6 and IL-8 (Fig. 3), although levels of cytokine release were significantly lower (reduction of about 50%; $P < 0.05$) than those induced by untreated heat-killed *H. parasuis*.

To further characterize the involvement of *H. parasuis* LOS in the induction of cytokine production, PBMEC were stimulated with LOS (10 μ g/mL) purified from *H. parasuis* Nagasaki strain. LOS stimulated PBMEC to produce IL-6 and IL-8 ($P < 0.05$) (Fig. 5), although to a lesser extent compared with heat-killed or live bacteria. Stimulation with LOS, however, yielded similar results as with *E. coli* LPS. Cytokine production induced by *H. parasuis* LOS was time-dependent: IL-6 and IL-8 were gradually up-regulated ($P < 0.05$) and reached a plateau at 24 h (Fig. 5A and B). To confirm the role of *H. parasuis* LOS in cytokine induction, LOS was also treated with PmB before stimulation of PBMEC. As shown in Figure 5, IL-6 production was not detected ($P < 0.05$) with PmB-treated LOS at any time point tested (Fig. 5A). Induction of IL-8 secretion by PmB-treated LOS was not completely abolished but was significantly lower ($P < 0.05$) compared with that stimulated by untreated LOS (Fig. 5B).

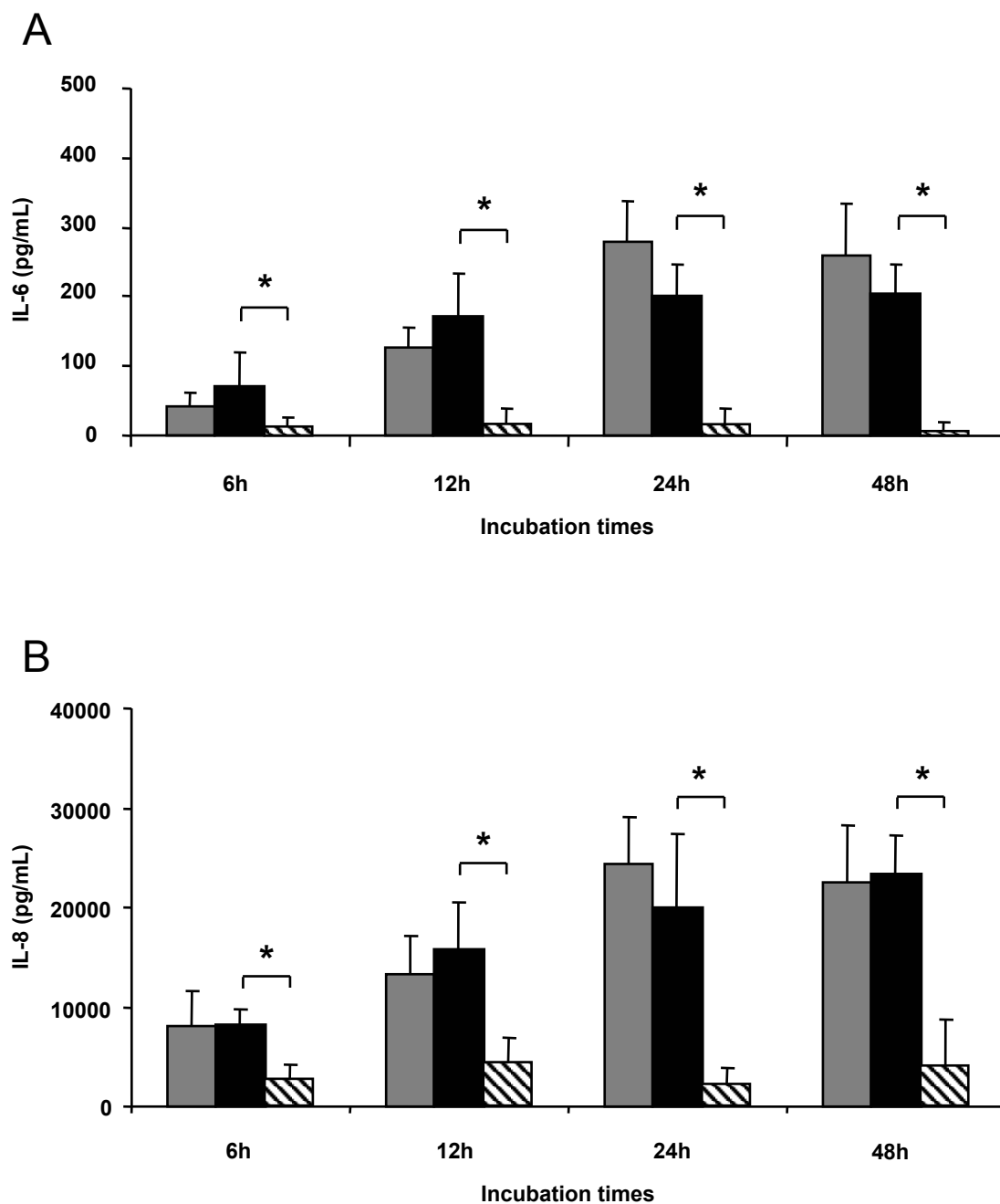


Figure 5: Kinetics of pro-inflammatory cytokines IL-6 (A) and IL-8 (B) production by PBMEC stimulated with *H. parasuis* LOS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, black bars) or PmB-treated LOS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, hatched bars). Purified *E. coli* LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, grey bars) was used as a positive control. Data are expressed as mean \pm SD. *, $P < 0.05$.

3.7. Field strains of *H. parasuis* induce IL-6 and IL-8 production by PBMEC

Several field strains of *H. parasuis* were compared for their capacity to induce the release of IL-6 and IL-8 (Fig. 6). Results showed that all the field strains tested (5×10^8 CFU/mL) were able to stimulate PBMEC to produce IL-6 and IL-8, although individual differences were observed among the strains, especially those of serotype 4 (Fig. 6). Moreover, the mean capacity to induce IL-6 and IL-8 was similar between *H. parasuis* serotypes 4 and 5 strains isolated from diseased pigs. Similar levels of cytokines were also observed with strains recovered from healthy animals (Fig. 6). No correlation between the origin of the strains (meningitis, pneumonia, etc.) and their capacity to induce cytokines could be observed (results not shown).

4. DISCUSSION

To cause meningitis, bacterial pathogens must reach the CNS by traversing the BBB. It is generally accepted that bacterial interactions with BMEC, one of the primary components of the BBB, are mainly characterized by specific bacterial attachment with consequent invasion, toxicity and/or increase of permeability. We have previously shown that *H. parasuis* is able to adhere to and to invade PBMEC [41]. We now demonstrated that LOS significantly impaired the adhesion of *H. parasuis* to PBMEC, suggesting a role for this bacterial component as an adhesin. Likewise, LPS from other bacterial species, including swine pathogens of the same family, such as *Actinobacillus pleuropneumoniae* have been shown to be important adhesins [30, 32]. Nevertheless, other adhesins may also contribute to bacteria-cell interactions based on our finding that the addition of LOS to a competitive assay did not completely abolish the adhesion of *H. parasuis* to PBMEC. In addition, the presence of a contaminant protein that might play a certain role as adhesin in the LOS preparation can not be completely ruled out. Bacterial attachment is often mediated by more than one component in order to multiply contact sites and to ensure strong attachment [1].

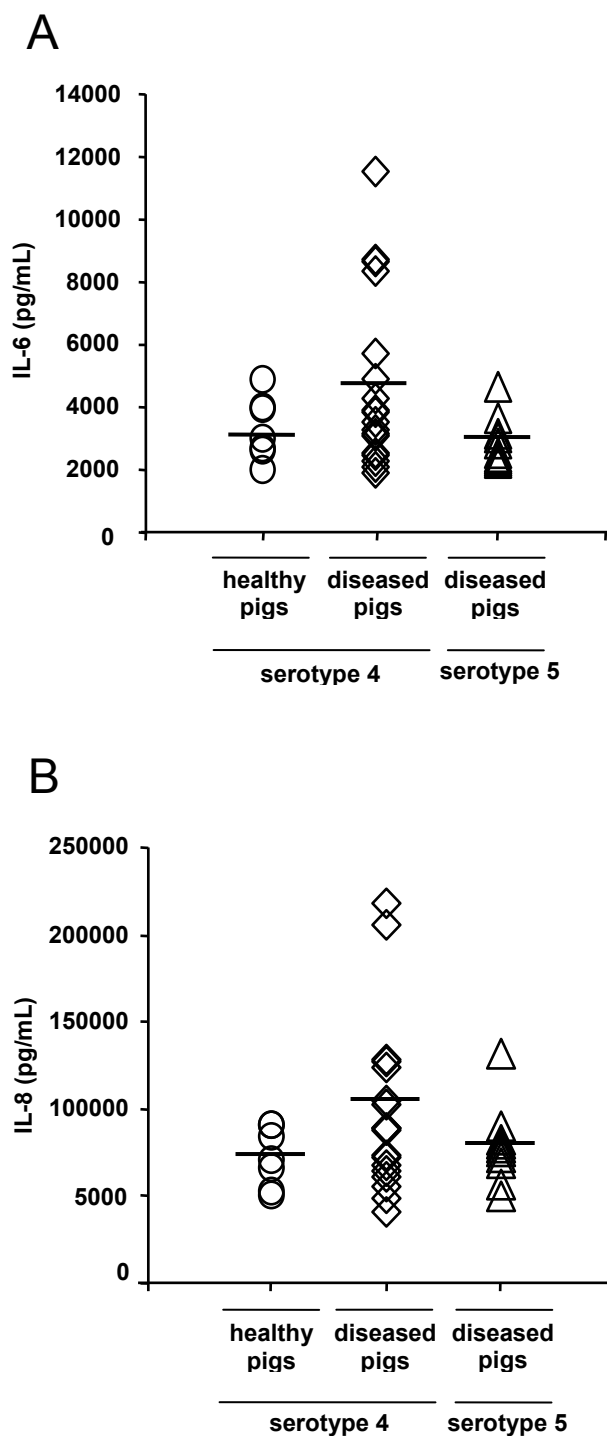


Figure 6 : Comparative analysis of IL-6 (A) and IL-8 (B) production by different *H. parasuis* strains at 24 h post-infection. PBMEC were stimulated with heat-killed *H. parasuis* (5×10^8 CFU/mL) serotype 4 strains isolated from healthy ($n = 7$, circles) or diseased ($n = 18$, diamonds) pigs, or serotype 5 strains ($n = 10$, triangles) isolated from diseased pigs. Cytokine production in cell supernatants was measured by ELISA. Each point represents mean cytokine induction by one strain. Lines represent mean cytokine production by each serotype.

Previous studies in our laboratory [41] indicated that cytotoxicity is likely not a mechanism used by *H. parasuis* to increase BBB permeability. In this study, we confirmed that *H. parasuis* as well as its purified LOS are not toxic to PBMEC. These results differ from those with *H. influenzae* and *H. somnus* [16, 35, 38]. Although not toxic, we demonstrated that both live and heat-killed *H. parasuis* are able to induce PBMEC apoptosis in caspase-3 dependent fashion as previously demonstrated for *H. somnus* [35, 36]. This observation also provides new insights into the role of apoptosis in the regulation of BBB permeability, particularly given that caspases are able to cleave cytoskeletal structures including tight and adherence junctional components [15]. More specifically, it has been demonstrated that tight junctional proteins, ZO-1 and ZO-2 and occludin, are cleaved by caspase-3 [15]. The role of apoptosis in the potential increase of the BBB permeability by *H. parasuis* remains to be investigated, with the use, for example, of transwells as previously described [6].

Since washed heat-killed *H. parasuis* induced similar levels of apoptosis as live bacteria, we hypothesized that cell-associated and heat-resistant bacterial components are involved in this process. Hence, we investigated whether *H. parasuis* LOS plays a role in the apoptosis of PBMEC. Differently from what has been observed for *H. somnus* [35], the absence of detectable DNA fragmentation following incubation of *H. parasuis* LOS with PBMEC suggests that *H. parasuis* LOS did not induce apoptosis. Moreover, we observed no decrease in apoptosis level induced by PmB-treated heat-killed bacteria. Further studies are needed to identify other surface structures that might be involved in *H. parasuis*-mediated PBMEC apoptosis.

As mentioned above, bacterial pathogens may also increase BBB permeability by stimulating the release of inflammatory mediators, which may increase not only local inflammatory mediators that contribute to the development of clinical signs but also barrier permeability [14, 35]. Notably, bacterial meningitis is by definition associated with inflammatory responses in the subarachnoid space, and TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-8 are the most frequently detected cytokines and chemokines in the cerebrospinal fluid (CSF) [11, 14]. Along with other cells, BMEC can produce proinflammatory cytokines as a result of stimulation by other cytokines (e.g. TNF- α , IL-1 β) [7, 40] or direct interaction with microbial pathogens [7, 39].

The present study demonstrates for the first time that *H. parasuis* induces the production of IL-8 and IL-6 by PBMEC. Chemokines are chemotactic molecules that mediate the recruitment of inflammatory cells such as neutrophils and activated T cells to sites of infection or injury [20]. The expression of IL-8 by cerebral endothelial cells is thought to be a key event that initiates the translocation of adhering leukocytes across the BBB [34]. Since leukocytes themselves may cause injury by releasing potentially harmful products such as free radicals, metalloproteases, perchloric acid, and eicosanoids, interactions between leukocytes and endothelial cells may also contribute to CNS damage during bacterial meningitis [11, 34]. IL-6, a key mediator of the inflammatory response in swine infections [13], is considered to be one of the best markers of meningitis [12, 27]. IL-6 release could also lead to an increase in BBB permeability, since this cytokine has been shown to modify transendothelial electrical resistance of cerebral endothelial cells, thereby reflecting alterations of BBB tight junctions [22].

In Gram-negative infections, cytokine-related disruption of the BBB is mainly mediated through LPS activity [42]. Previously, *H. parasuis* LOS has been shown to induce TNF- α production by a mouse macrophage cell line [28]. In the present study, PmB-treated heat-killed *H. parasuis* stimulated 50% less IL-6 and IL-8 release from PBMEC than did untreated heat-killed bacteria, indicating that LOS is only partially responsible for *H. parasuis*-induced cytokine production. Moreover, we observed that purified LOS was a relatively poor cytokine inducer suggesting that other cell-associated or heat-resistant bacterial component(s) are also involved in stimulating cytokine production. These results are consistent with other studies showing that pro-inflammatory responses elicited by *N. meningitidis* are mediated by LOS as well as non-LOS components [8, 31]. Further studies are needed to identify other surface structures involved in PBMEC stimulation by *H. parasuis*.

As mentioned above, 15 serotypes of *H. parasuis* have been identified using an immunodiffusion test [18, 37]. As serotype 5 strains are considered to be more virulent than those of serotype 4 [22], we compared several field strains of both serotypes for their capacity to induce pro-inflammatory cytokines. Although individual differences were observed, the mean capacity to induce cytokine release was similar between strains of serotypes 4 and 5 isolated from diseased pigs.

Since the exact nature of the antigens involved in serotyping is not well known, it is difficult to establish a clear association between serotype, pathogenicity and inflammatory activator. In addition, strains isolated from healthy pigs (belonging to serotype 4) showed a similar capacity to induce cytokines. To induce high levels of pro-inflammatory cytokines from PBMEC, *H. parasuis* must be able to survive and replicate to reach high bacterial concentrations in the bloodstream. Recently, variability in serum resistance of different strains of *H. parasuis* has been reported [5]. Thus, although most strains may have the potential to activate endothelial cells, only virulent and probably serum-resistant strains [5] may be able to achieve the high bacterial loads in the blood needed for effective cell activation.

To conclude, we demonstrated that *H. parasuis* LOS plays a contributing role in the adhesion of *H. parasuis* to PBMEC. We also demonstrated that *H. parasuis* is not toxic but can induce apoptosis of PBMEC while, surprisingly, LOS does not seem to play an important role in this process. In addition, we described the ability of *H. parasuis* to induce brain endothelial cells to release pro-inflammatory cytokines which in turn may play an important role in local inflammation as well as in increasing BBB permeability. However, in our model, LOS appeared to be a weak stimulator of cytokine production by PBMEC, suggesting that other bacterial components are responsible for the *H. parasuis*-induced cytokine response.

ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge Dr Marylène Kobisch (Agence Française de la Sécurité Sanitaire des Aliments, France), Dr Carlos Pijoan (in memoriam, University of Minnesota, USA), Dr Khyali Ram Mittal (University of Montreal, Canada), Dr Eileen Thacker (Iowa State University, USA), and Dr Richard F. Ross (Iowa State University, USA) for providing *H. parasuis* strains used in this study. We also thank Dr André Buret (University of Calgary, Canada) for helpful discussions on apoptosis. This work was supported by the Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT) grant no PR-106 088. Ghyslaine Vanier is the recipient of NSERC and FQRNT scholarships.

REFERENCES

- [1] Alfa M.J., DeGagne P., Attachment of *Haemophilus ducreyi* to human foreskin fibroblasts involves LOS and fibronectin, *Microb. Pathog.* (1997) 22:39-46.
- [2] Amano H., Shibata M., Kajio N., Morozumi T., Pathogenicity of *Haemophilus parasuis* serovars 4 and 5 in contact-exposed pigs, *J. Vet. Med. Sci.* (1996) 58:559-561.
- [3] Amano H., Shibata M., Takahashi K., Sasaki Y., Effects on endotoxin pathogenicity in pigs with acute septicemia of *Haemophilus parasuis* infection, *J. Vet. Med. Sci.* (1997) 59:451-455.
- [4] Angen O., Svensmark B., Mittal K.R., Serological characterization of Danish *Haemophilus parasuis* isolates, *Vet. Microbiol.* (2004) 103:255-258.
- [5] Cerda-Cuellar M., Aragon V., Serum-resistance in *Haemophilus parasuis* is associated with systemic disease in swine, *Vet. J.* (2008) 175:384-9.
- [6] Chin A.C., Flynn A.N., Fedwick J.P., Buret A.G., The role of caspase-3 in lipopolysaccharide-mediated disruption of intestinal epithelial tight junctions, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* (2006) 84:1043-1050.
- [7] Cho N.H., Seong S.Y., Choi M.S., Kim I.S., Expression of chemokine genes in human dermal microvascular endothelial cell lines infected with *Orientia tsutsugamushi*, *Infect. Immun.* (2001) 69:1265-1272.
- [8] Christodoulides M., Makepeace B.L., Partridge K.A., Kaur D., Fowler M.I., Weller R.O., Heckels J.E., Interaction of *Neisseria meningitidis* with human meningeal cells induces the secretion of a distinct group of chemotactic, proinflammatory, and growth-factor cytokines, *Infect. Immun.* (2002) 70:4035-4044.
- [9] Darveau R.P., Hancock R.E., Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains, *J. Bacteriol.* (1983) 155:831-838.
- [10] del Rio M.L., Navas J., Martin A.J., Gutierrez C.B., Rodriguez-Barbosa J.I., Rodriguez Ferri E.F., Molecular characterization of *Haemophilus parasuis* ferric hydroxamate uptake (fhu) genes and constitutive expression of the FhuA receptor, *Vet. Res.* (2006) 37:49-59.

- [11] Diab A., Zhu J., Lindquist L., Wretling B., Link H., Bakhiet M., Cytokine mRNA profiles during the course of experimental *Haemophilus influenzae* bacterial meningitis, *Clin. Immunol. Immunopathol.* (1997) 85:236-245.
- [12] Fida N.M., Al-Mughales J., Farouq M., Interleukin-1alpha, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels in children with sepsis and meningitis, *Pediatr. Int.* (2006) 48:118-124.
- [13] Fossum C., Watrang E., Fuxler L., Jensen K.T., Wallgren P., Evaluation of various cytokines (IL-6, IFN-alpha, IFN-gamma, TNF-alpha) as markers for acute bacterial infection in swine--a possible role for serum interleukin-6, *Vet. Immunol. Immunopathol.* (1998) 64:161-172.
- [14] Fowler M.I., Weller R.O., Heckels J.E., Christodoulides M., Different meningitis-causing bacteria induce distinct inflammatory responses on interaction with cells of the human meninges, *Cell. Microbiol.* (2004) 6:555- 567.
- [15] Gregorc U., Ivanova S., Thomas M., Turk V., Banks L., Turk B., hDLG/SAP97, a member of the MAGUK protein family, is a novel caspase target during cell-cell detachment in apoptosis, *Biol. Chem.* (2005) 386:705-710.
- [16] Gu X.X., Tsai C.M., Apicella M.A., Lim D.J., Quantitation and biological properties of released and cell-bound lipooligosaccharides from nontypeable *Haemophilus influenzae*, *Infect. Immun.* (1995) 63:4115-4120.
- [17] Humphries H.E., Triantafilou M., Makepeace B.L., Heckels J.E., Triantafilou K., Christodoulides M., Activation of human meningeal cells is modulated by lipopolysaccharide (LPS) and non-LPS components of *Neisseria meningitidis* and is independent of Toll-like receptor (TLR)4 and TLR2 signalling, *Cell. Microbiol.* (2005) 7:415-430.
- [18] Kielstein P., Rapp-Gabrielson V.J., Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts, *J. Clin. Microbiol.* (1992) 30:862-865.
- [19] Kuckleburg C.J., Sylte M.J., Inzana T.J., Corbeil L.B., Darien B.J., Czuprynski C.J., Bovine platelets activated by *Haemophilus somnus* and its LOS induce apoptosis in bovine endothelial cells, *Microb. Pathog.* (2005) 38:23-32.
- [20] Lassmann H., Basic mechanisms of brain inflammation, *J. Neural Transm. Suppl.* (1997) 50:183-190.

- [21] Lichtensteiger C.A., Vimr E.R., Neuraminidase (sialidase) activity of *Haemophilus parasuis*, *FEMS Microbiol. Lett.* (1997) 152:269-274.
- [22] MacInnes J.I., Desrosiers R., Agents of the "swine diseases" of swine: *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, and *Streptococcus suis*, *Can. J. Vet. Res.* (1999) 63:83-89.
- [23] Melnikow E., Dornan S., Sargent C., Duszenko M., Evans G., Gunkel N., Selzer P.M., Ullrich H.J., Microarray analysis of *Haemophilus parasuis* gene expression under in vitro growth conditions mimicking the in vivo environment, *Vet. Microbiol.* (2005) 110:255-263.
- [24] Metcalf D.S., MacInnes J.I., Differential expression of *Haemophilus parasuis* genes in response to iron restriction and cerebrospinal fluid, *Can. J. Vet. Res.* (2007) 71:181-188.
- [25] Metkar S., Awasthi S., Denamur E., Kim K.S., Gangloff S.C., Teichberg S., Haziot A., Silver J., Goyert S.M., Role of CD14 in responses to clinical isolates of *Escherichia coli*: effects of K1 capsule expression, *Infect. Immun.* (2007) 75:5415-24.
- [26] Morozumi T., Nicolet J., Morphological variations of *Haemophilus parasuis* strains, *J. Clin. Microbiol.* (1986) 23:138-142.
- [27] Mukai A.O., Krebs V.L., Bertoli C.J., Okay T.S., TNF-alpha and IL-6 in the diagnosis of bacterial and aseptic meningitis in children, *Pediatr. Neurol.* (2006) 34:25-29.
- [28] Ogikubo Y., Norimatsu M., Kojima A., Sasaki Y., Tamura Y., Biological activities of lipopolysaccharides extracted from porcine vaccine strains, *J. Vet. Med. Sci.* (1999) 61:1265-1269.
- [29] Oliveira S., Pijoan C., *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control, *Vet. Microbiol.* (2004) 99:1-12.
- [30] Paradis S.E., Dubreuil D., Rioux S., Gottschalk M., Jacques M., High-molecularmass lipopolysaccharides are involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells, *Infect. Immun.* (1994) 62:3311-3319.
- [31] Plant L., Wan H., Jonsson A.B., Non-lipooligosaccharide-mediated signalling via Toll-like receptor 4 causes fatal meningococcal sepsis in a mouse model, *Cell. Microbiol.* (2007) 9:657-669.

- [32] Ramjeet M., Deslandes V., St Michael F., Cox A.D., Kobisch M., Gottschalk M., Jacques M., Truncation of the lipopolysaccharide outer core affects susceptibility to antimicrobial peptides and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1, *J. Biol. Chem.* (2005) 280:39104-39114.
- [33] Ruiz A., Oliveira S., Torremorell M., Pijoan C., Outer membrane proteins and DNA profiles in strains of *Haemophilus parasuis* recovered from systemic and respiratory sites, *J. Clin. Microbiol.* (2001) 39:1757-1762.
- [34] Stanimirovic D., Satoh K., Inflammatory mediators of cerebral endothelium: a role in ischemic brain inflammation, *Brain Pathol.* (2000) 10:113-126.
- [35] Sylte M.J., Corbeil L.B., Inzana T.J., Czuprynski C.J., *Haemophilus somnus* induces apoptosis in bovine endothelial cells in vitro, *Infect. Immun.* (2001) 69:1650-1660.
- [36] Sylte M.J., Leite F.P., Kuckleburg C.J., Inzana T.J., Czuprynski C.J., Caspase activation during *Haemophilus somnus* lipooligosaccharide-mediated apoptosis of bovine endothelial cells, *Microb. Pathog.* (2003) 35:285-291.
- [37] Tadjine M., Mittal K.R., Bourdon S., Gottschalk M., Development of a new serological test for serotyping *Haemophilus parasuis* isolates and determination of their prevalence in North America, *J. Clin. Microbiol.* (2004) 42:839-840.
- [38] Tunkel A.R., Scheld W.M., Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis, *Annu. Rev. Med.* (1993) 44:103-120.
- [39] Vadeboncoeur N., Segura M., Al-Numani D., Vanier G., Gottschalk M., Proinflammatory cytokine and chemokine release by human brain microvascular endothelial cells stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* (2003) 35:49-58.
- [40] van der Flier M., Geelen S.P., Kimpen J.L., Hoepelman I.M., Tuomanen E.I., Reprogramming the host response in bacterial meningitis: how best to improve outcome?, *Clin. Microbiol. Rev.* (2003) 16:415-429.
- [41] Vanier G., Szczotka A., Friedl P., Lacouture S., Jacques M., Gottschalk M., *Haemophilus parasuis* invades porcine brain microvascular endothelial cells, *Microbiology* (2006) 152:135-142.
- [42] Verma S., Nakaoke R., Dohgu S., Banks W.A., Release of cytokines by brain endothelial cells: A polarized response to lipopolysaccharide, *Brain Behav. Immun.* (2006) 20:449-455.

Article II

Studies on the interactions of *Haemophilus parasuis* with porcine epithelial tracheal cells: limited role of LOS in apoptosis and pro-inflammatory cytokine release

Bénédicte BOUCHET, Ghyslaine VANIER, Eliane AUGER, Mario JACQUES,
Marcelo GOTTSCHALK*

Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP) and Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Sicotte, St Hyacinthe, Qc, J2S 2M2, Canada

Microbial Pathogenesis (2009) ; 46(2) :108-113

Rôle du candidat dans la conception de l'article:

Je suis l'auteur principal de cet article. J'ai participé à la conception et au design expérimental et à la mise au point des techniques. J'ai aussi effectué les manipulations et l'analyse des résultats. Finalement, j'ai fait la conception graphique et j'ai écrit le manuscrit.

ABSTRACT

Haemophilus parasuis colonizes the upper respiratory tract of swine and causes Glässer's disease. We recently demonstrated that *H. parasuis* can adhere to newborn pig tracheal (NPTr) cells. However, the molecular mechanisms involved in upper respiratory tract colonization by *H. parasuis* are unknown. The aim of this work was to investigate the role of *H. parasuis* lipooligosaccharide (LOS) in bacterial adhesion to NPTr cells, the ability of the bacteria and its LOS to induce NPTr cells apoptosis, and their stimulating effect on cytokine release. Our results showed that LOS is partially involved in adhesion to NPTr cells. *H. parasuis* induced NPTr cells apoptosis in a caspase-3 dependent fashion, but LOS did not seem to be involved in such a process. *H. parasuis* and, to a lesser extent, its LOS stimulated IL-8 and IL-6 release by NPTr cells. In addition, *H. parasuis* serotype 4 field isolates induced higher levels of these mediators than did serotype 5 isolates. These results suggest that bacterial adhesion, induction of apoptosis and cytokine release are important events for *H. parasuis* colonization, but LOS appears to have a limited role in these processes.

Keywords: *Haemophilus parasuis* / lipooligosaccharide / NPTr cells / epithelial / swine.

1. INTRODUCTION

Haemophilus parasuis is a common resident of the upper respiratory tract of swine [1-3]. In some situations, *H. parasuis* is able to cause sporadic stress-associated Glässer's disease, which is characterized by fibrinous polyserositis, arthritis and meningitis in young pigs of conventional herds and more devastating acute septicemia in non-immune high-health status pigs of all ages [2]. To date, 15 serotypes of *H. parasuis* have been described using the scheme of Kielstein and Rapp-Gabrielson [4, 5], based on thermostable soluble antigen(s) [5, 6]. However, as little is known about the exact nature of autoclaved antigens involved in the serotyping, the capsule, the outer membrane and the LOS have already been suggested as playing a certain role [5, 7]. Strains of serotypes 4 and 5 are known to be the most prevalent in North America, some European countries and China [5, 7-9].

Virulence factors of *H. parasuis* are poorly defined. Lipooligosaccharide (LOS) or lipopolysaccharide (LPS) is a major constituent of the outer membrane of Gram-negative bacteria [10-15]. LOS has the capacity to induce apoptosis of endothelial and epithelial cells [11, 13, 15] as well as the release of pro-inflammatory mediators [10], and is involved in bacterial adhesion to host cells [12, 14]. *H. parasuis* LOS has been linked to endotoxic shock, aggravation of clinical signs, and death of pigs with septicemia, suggesting that it might play an important role in the pathogenesis of the infection [16]. However, little is known about its actual biological activity.

The pathogenesis of the infection caused by this important pathogen is not well understood. In general, the upper respiratory tract of swine is considered to be the initial site of colonization by *H. parasuis* [17-19]. Although controversial, *H. parasuis* may be found in the nasal cavities and trachea [19]. Nevertheless, molecular mechanisms involved in the colonization process remain unknown. [19, 20]. Recently, we showed that *H. parasuis* was able to adhere to tracheal epithelial cells [21]. Hence, there is a need to better understand the pathogenesis of the infection and virulence factors of *H. parasuis*. Thus, the purpose of this study was to investigate certain interactions with newborn porcine tracheal (NPTr) epithelial cells, specifically its ability to induce toxicity, apoptosis and the release of pro-

inflammatory cytokines. The role of *H. parasuis* LOS in such interactions as well as in the adhesion process to these cells was also evaluated.

2. RESULTS AND DISCUSSION

2.1. Involvement of LOS in *H. parasuis* adhesion to NPTr cells

Using a dose of 1×10^7 colony-forming units per ml (CFU/ml), a total of 7.5×10^2 CFU/ml adhered bacteria were recovered. Thus, we confirmed our results from a previous study showing that *H. parasuis* adheres to NPTr cells [21] which is consistent with several reports indicating that other *Haemophilus sp.* bacteria adhere to host respiratory tract cells [14, 22, 23]. Moreover, it has been demonstrated that *Haemophilus influenzae* LOS is involved in adhesion to human bronchial epithelial cells, and that *Haemophilus ducreyi* LOS plays a role in adhesion to human fibroblasts [12, 14]. Purified *H. parasuis* LOS was used in a competitive binding assay to determine if LOS was involved in adhesion of *H. parasuis* to NPTr cells. The presence of LOS (100 µg/ml) significantly reduced the adhesion of *H. parasuis* to NPTr cells by $91 \pm 9\%$ ($P < 0.05$) after 2 h of incubation. These results suggest that *H. parasuis* adhesion is mediated, at least in part, by its LOS, consistently with a recent study performed in our laboratory demonstrating that *H. parasuis* LOS is involved in bacterial adhesion to endothelial cells from the blood-brain barrier [24]. However, LOS is probably not the sole bacterial component involved as shown for other members of the *Pasteurellaceae* family which can express other surface structures such as fimbriae, fibrils, capsule and proteinaceous components to multiply contact sites with host cells [12, 14, 24-26].

2.2. Cytotoxic effects of *H. parasuis* or its LOS towards NPTr cells

To determine if *H. parasuis* or its LOS were cytotoxic to NPTr cells, lactate dehydrogenase (LDH) release measurements were performed. NPTr cells were treated with high concentrations of live (up to 1×10^8 CFU/ml) or heat-killed (5×10^8 CFU/ml) *H. parasuis* Nagasaki strain, or with purified *H. parasuis* LOS (up to 100 µg/ml). At all time points (6, 12, 24, and 48 h incubation), neither whole

bacteria nor its LOS caused detectable cytotoxicity towards NPTr cells (data not shown), suggesting that *H. parasuis* does not induce cytotoxicity to damage the tracheal epithelium. These observations are consistent with previous studies performed in our laboratory with endothelial cells which indicate that toxicity is likely not a mechanism used by *H. parasuis* to increase cell barrier permeability [24, 27].

2.3. *H. parasuis* induces NPTr cells apoptosis

As toxicity does not seem to play an important role in the interactions between *H. parasuis* and epithelial cells, we investigated its capacity to induce NPTr cells apoptosis. It has been previously suggested that several microbial pathogens may use such a mechanism to damage host cells and consequently increase tissue permeability [13, 28-32].

NPTr cells were incubated with heat-killed *H. parasuis* Nagasaki strain (5×10^8 CFU/ml) for different incubation times up to 24 h, and measurement of DNA fragmentation was performed. An increase in NPTr cells apoptosis level was observed following incubation with heat-killed *H. parasuis* ($P < 0.05$) as indicated by the significant increase in DNA fragmentation compared with unstimulated cells ($P < 0.05$) (Fig. 1A). Apoptosis was detected as early as 6 h and remained constant up to 24 h (Fig. 1A). Live *H. parasuis* (1×10^8 CFU/ml) also induced NPTr cells apoptosis after 24 h, in a similar manner as heat-killed bacteria (data not shown). Incubation of NPTr cells with different concentrations of heat-killed *H. parasuis* Nagasaki strain (1×10^7 to 1×10^9 CFU/ml) revealed that induction of apoptosis was dose-dependent (data not shown). Heat-killed bacteria were potent inducer of apoptosis but only at high concentrations (1×10^9 CFU/ml), since apoptotic cell level rapidly declined, and was undetectable at bacterial concentrations lower than 5×10^8 CFU/ml (data not shown). Consistently high levels of NPTr cell apoptosis were observed with the pro-apoptotic topoisomerase-I inhibitor camptothecin (CAM, 40 μ g/ml, Sigma-Aldrich) as a positive control.

The capacity of *H. parasuis* to induce NPTr cells apoptosis was confirmed using an anti-caspase-3 polyclonal antibody recognizing full length 35 kDa procaspase-3, and the large 17 kDa active fragment of caspase-3 resulting from its

cleavage. We detected a band corresponding to procaspase-3 in each samples (Fig. 1B). A band corresponding to caspase-3 appeared after CAM and *H. parasuis* treatment (Fig. 1B), suggesting that this pathogen triggered caspase-3 dependent apoptosis of NPTr cells. This is consistent with a recent study performed in our laboratory, showing that *H. parasuis* induces activation of caspase-3 in brain endothelial cells [33]. Moreover, during apoptosis, caspases may cleave cytoskeletal structures including tight and adherence junctional components, and it has been demonstrated more specifically that caspase-3 cleaves tight junctional proteins ZO-1 and ZO-2, and occludin [34, 35]. However, the role of caspases in the alterations of tight and adherence junctional components have yet to be explored. Destruction of dead cells, and possibly cleavage of tight and adherence junctional components, could result in an increase of permeability and important alterations of the epithelial barrier [31]. Thus, *H. parasuis* may induce apoptosis to damage the tracheal epithelium, leading to systemic spread of the infection.

To determine if LOS was involved in the induction of NPTr cells apoptosis, cells were incubated with purified *H. parasuis* LOS (100 µg/ml) from Nagasaki strain. LOS-stimulated cells showed similar levels of DNA fragmentation as unstimulated cells (Fig. 1A). Moreover, NPTr cells stimulated with heat-killed *H. parasuis* treated with polymyxin B (PmB), a cationic antibiotic that binds to the lipid A region of LOS, showed comparable levels of apoptosis as cells stimulated with untreated heat-killed *H. parasuis* (Fig. 1A). Although LOS of other pathogens have been implicated in the apoptotic process [13, 15, 36], we could not demonstrate any major role of LOS in *H. parasuis*-induced apoptosis of epithelial cells as shown here, and of endothelial cells as reported previously [24]. Indeed, LOS/LPS is not the sole bacterial component responsible for the induction of apoptosis. A number of pathogens can induce cell death by a variety of mechanisms including toxins, pore-forming toxins, effector proteins delivered into host cells by a type-III secretory system, superantigens, and other modulators of host cell death [33]. Thus, further studies are needed to identify other bacterial components responsible for *H. parasuis*-induced apoptosis.

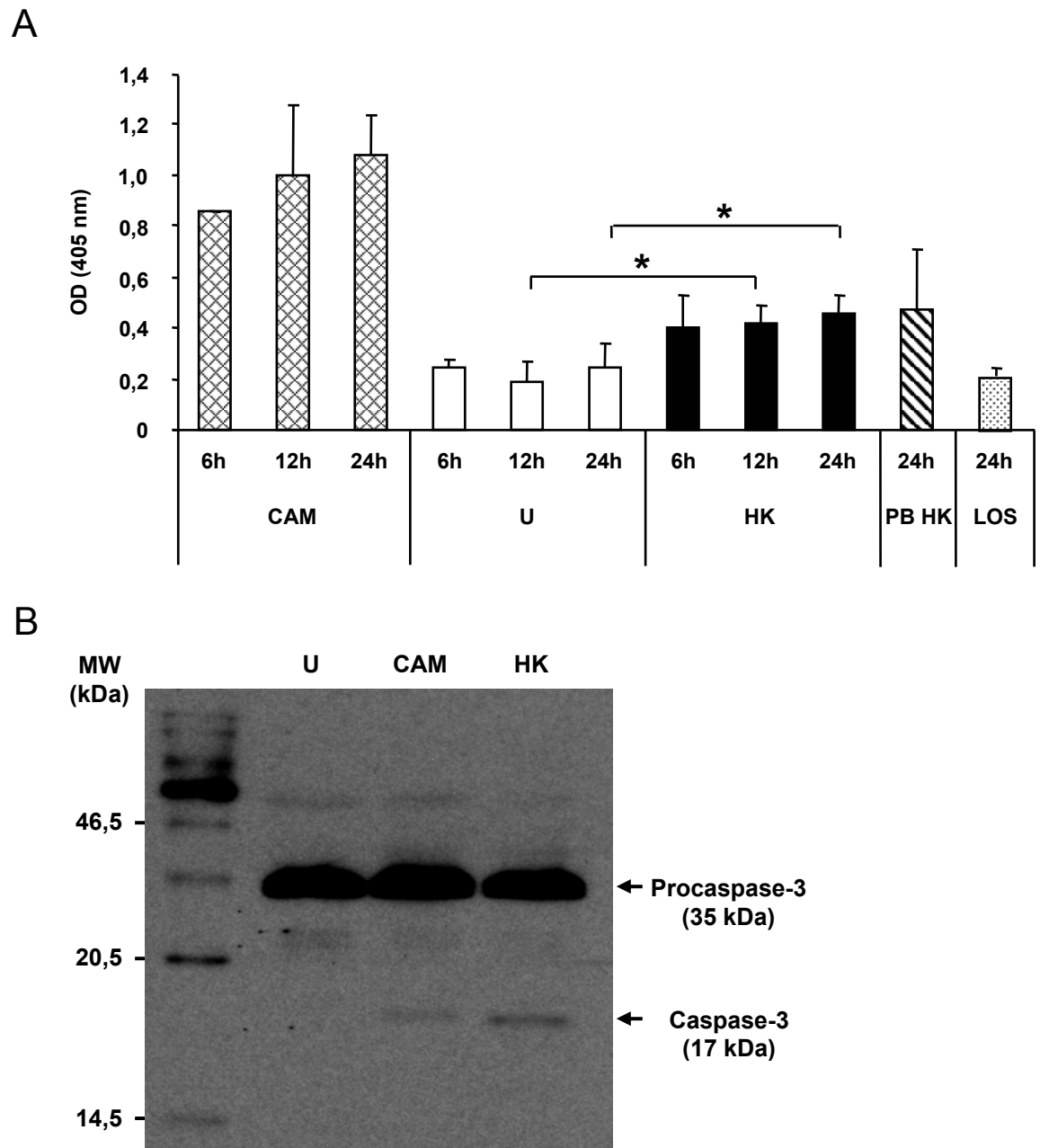


Figure 1 : (A) Time course of NPTTr cells apoptosis after stimulation with heat-killed (HK) (5×10^8 CFU/ml), PmB-treated heat-killed (PB HK) (5×10^8 CFU/ml) *H. parasuis*, or LOS (100 μ g/ml). Apoptosis was detected by measuring DNA fragmentation. Data are expressed as the mean \pm SD. (* $P < 0.05$). (B) Representative Western blot analysis of procaspase-3 processing in NPTTr cells treated with heat-killed *H. parasuis* (HK) (5×10^8 CFU/ml). Cells treated with controls and heat-killed *H. parasuis* were harvested and cell extracts were analysed by western blot. Procaspase-3 and caspase-3 were detected by anti-caspase-3 antibody. Arrows indicate inactive 35 kDa procaspase-3 and active 17 kDa caspase-3. Unstimulated cells (U) and CAM-treated cells (CAM) (40 μ g/ml) were used as negative and positive controls, respectively.

2.4. *H. parasuis* induces a time and bacterial concentration-dependent release of IL-6 and IL-8 by NPTr cells

The initial events leading to respiratory inflammation are thought to involve cellular interactions between infecting bacteria and respiratory epithelial cells [37-39]. Several respiratory pathogens produce a variety of molecules that interact with epithelial cells and cause the secretion of proinflammatory cytokines [37-39]. These cytokine responses occur through microbial attachment to specific receptors and transmembrane signaling, microbial invasion of epithelial cells followed by intracellular activation, or microbial activation of specialized inflammatory cells [39-41]. As it has been hypothesized that, like *H. influenzae*, *H. parasuis* could induce inflammation of the tracheal mucosa [19], we examined the capacity of the bacteria to induce the release of several inflammatory mediators by NPTr cells. Consistent with the effects of *H. influenzae* on cytokine production by respiratory epithelial cells [37], we observed for the first time that *H. parasuis* stimulated NPTr cells to release mainly IL-8 and, to a lesser extent, IL-6. Our findings are also in agreement with a previous study from our laboratory which reported that *H. parasuis* induces the release of IL-8 and, to a lesser extent, IL-6 from brain endothelial cells [24]. NPTr cells stimulated with live (1×10^7 CFU/ml) or heat-killed (5×10^8 CFU/ml) *H. parasuis* Nagasaki strain released IL-8 in a time-dependent manner ($P < 0.05$) as shown in Figure 2. Both live and heat-killed *H. parasuis* induced a low and constant production of IL-8 at 6 h and 12 h, then gradually up-regulated IL-8 secretion until 48 h (Fig. 2). IL-8 is a potent chemoattractant for leukocytes, themselves able to release a variety of potentially harmful products capable of causing damages to the host [41]. Vahle *et al.* examined nasal and tracheal mucosal colonization using a pig model of *H. parasuis* infection [19], and observed submucosal infiltrates of neutrophils and aggregates of intraepithelial neutrophils [19] which might be related to an important release of IL-8. Moreover, they observed that most severe lesions - cell protusion on the apical surface, decreased number of cilia, irregular microvilli, increased cellular space, and macrophages within the epithelium - were localized in areas adjacent to significant infiltrates of neutrophils [19].

IL-6, an important mediator in the induction of the acute phase response, is released early in the inflammatory response, and can act as a messenger from

local to systemic sites [10, 39, 41]. In contrast to IL-8, low but significant levels of IL-6 were detected at later time points (under 300 pg/ml after 48 h of incubation) when NPTr were stimulated with heat-killed *H. parasuis* Nagasaki strain (data not shown). Live bacteria induced weak IL-6 production (less than 50 pg/ml after 48 h, data not shown).

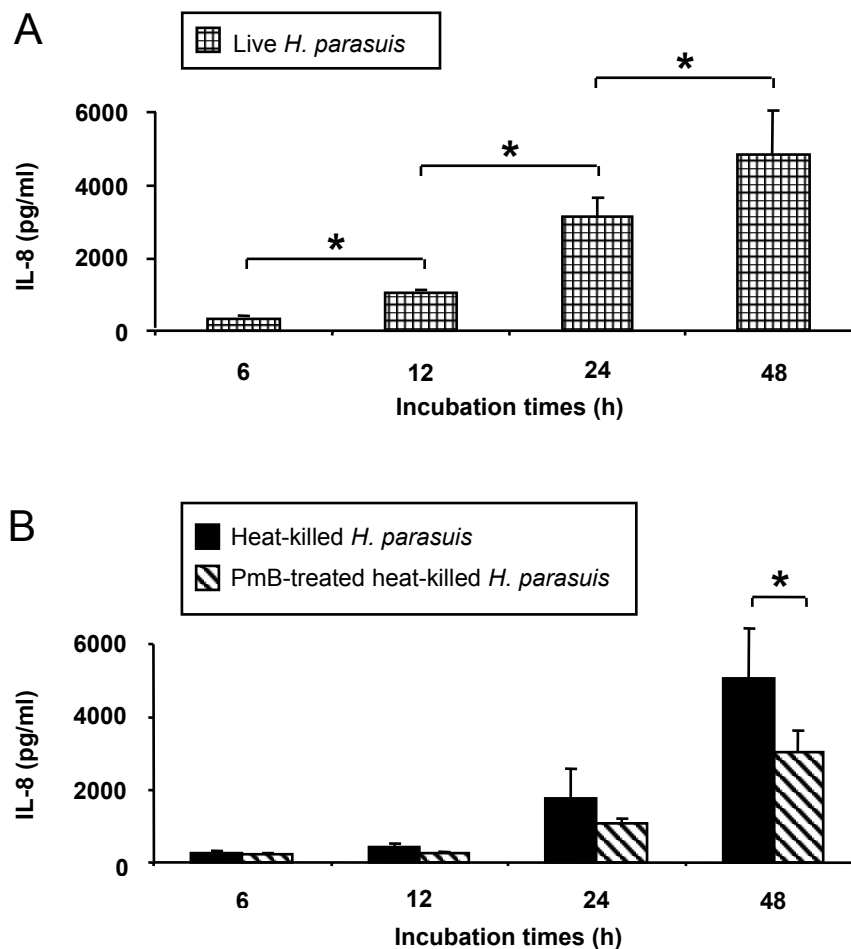


Figure 2 : (A) Kinetic of IL-8 production by NPTr cells treated with live *H. parasuis* (1×10^7 CFU/ml). (B) Kinetics of IL-8 production by NPTr cells treated with heat-killed (5×10^8 CFU/ml, black bars) or PmB-treated heat-killed *H. parasuis* (5×10^8 CFU/ml, hatched bars). Data are expressed as the mean \pm SD. (* $P < 0.05$)

Induction of these cytokines was bacterial dose-dependent (data not shown). Release of IL-8 was more sustained than that of IL-6. Both IL-8 and IL-6 production decreased sharply when the bacterial concentration decreased from 5×10^8 to $1 \times$

10^8 CFU/ml, and 5×10^6 CFU/ml was the lowest concentration able to induce detectable IL-8 production (about 400 pg/ml, data not shown). Very little to no IL-6 production was induced with bacterial concentrations lower than 1×10^8 CFU/ml (under 100 pg/ml, data not shown). Finally, no amounts of TNF- α , IL-1 β , interferon-gamma (IFN- γ) and transforming growth factor-beta1 (TGF- β 1) were detected after stimulation with live or heat-killed *H. parasuis* Nagasaki strain or with the positive control LPS (data not shown) at any time point during the 48 hr incubation period (data not shown).

2.5. LOS is partially involved in *H. parasuis*-induced cytokine release by NPTr cells

To determine whether LOS was responsible for pro-inflammatory cytokine production induced by whole bacteria, experiments were performed using the LOS inhibitor, PmB. Heat-killed *H. parasuis* Nagasaki strain (5×10^8 CFU/ml) treated with PmB was still able to stimulate NPTr cells to produce IL-8 (Fig. 2B) and IL-6 (data not shown), although levels of both cytokines were significantly lower ($P < 0.05$) than those induced by untreated heat-killed *H. parasuis*. PmB alone had no effect on basal cytokine secretion (data not shown).

NPTr cells were also stimulated with purified *H. parasuis* LOS (10 μ g/ml) to evaluate its role in cytokine release. LOS-stimulated NPTr cells produced IL-8 gradually over time (data not shown), but overall LOS induced lower amounts of IL-8 release (about 270 pg/ml after 48 h of incubation) compared with heat-killed or live bacteria (Fig. 3A-B). IL-8 production induced by both *H. parasuis* LOS or *Escherichia coli* LPS was time-dependent (data not shown). To confirm the role of *H. parasuis* LOS in cytokine induction, LOS was treated with PmB before stimulation of NPTr cells. IL-8 secretion induced by PmB-treated LOS was significantly lower ($P < 0.05$) than that induced by untreated LOS (90 pg/ml, data not shown). Almost no IL-6 production was detected after LPS, LOS or PmB-treated LOS stimulation at all time points (data not shown). LOS from *H. parasuis* plays a certain but not a dominant role in inducing cytokine release by NPTr cells, which suggests that other bacterial components could be involved in *H. parasuis*-induced cytokine release. Similar results were obtained in a previous study using

endothelial cells [24]. It is now accepted that LPS is not the only component of the bacteria which can induce eukaryotic cells to produce cytokines. Several classes of bacterial surface components or secretory products such as proteins, carbohydrates, pili, flagella, and lipids are known to stimulate cytokine release by murine and human cells [37-39, 41-44]. Further studies are ongoing in our laboratory to identify other *H. parasuis* surface structures involved in stimulation of pro-inflammatory cytokine production by NPTr cells.

2.6. Field isolates of *H. parasuis* induce IL-6 and IL-8 production by NPTr cells

As mentioned above, 15 serotypes of *H. parasuis* have been identified using an immunodiffusion test [5, 6]. Among the 15 serotypes described to date, serotype 4 and serotype 5 strains are predominant among isolates recovered from diseased animals in many countries [5, 7-9]. In this study, we compared the capacity of different *H. parasuis* isolates of serotype 4 and 5 recovered from diseased pigs to induce an inflammatory response from NPTr cells after 24 h incubation. All the field isolates tested were able to stimulate NPTr cells to produce IL-8 and IL-6 (Fig. 3). In vivo studies in swine have compared the virulence of strains from both serotypes [17, 45], and serotype 5 strains appear to be more virulent than serotype 4 strains [2, 17, 45]. However, in our study, serotype 4 field isolates induced higher levels of IL-8 and IL-6 compared with serotype 5 isolates ($P < 0.01$ and $P < 0.0001$, respectively) (Fig. 3). This difference among field isolates of both serotypes was not previously observed with endothelial cells [24]. We cannot exclude that this higher cytokine induction could be due to higher adhesion. It is important to note, however, that there was high variability in cytokine induction among strains, with some strains inducing either very high or very low amounts of cytokines (Fig. 3). Moreover, the same serotype 4 isolates were responsible for inducing high levels of both IL-8 and IL-6 production (Fig. 3), and three of the four serotype 4 isolates were recovered from cases of septicemia. In the case of in vivo studies, authors have compared reference strain of serotype 4 (SW 124) isolated from a healthy pig [17, 45, 46], with the Nagasaki strain, reference strain of serotype 5 and isolated from a diseased animal, which could explain these contradictory results [17, 45, 46].

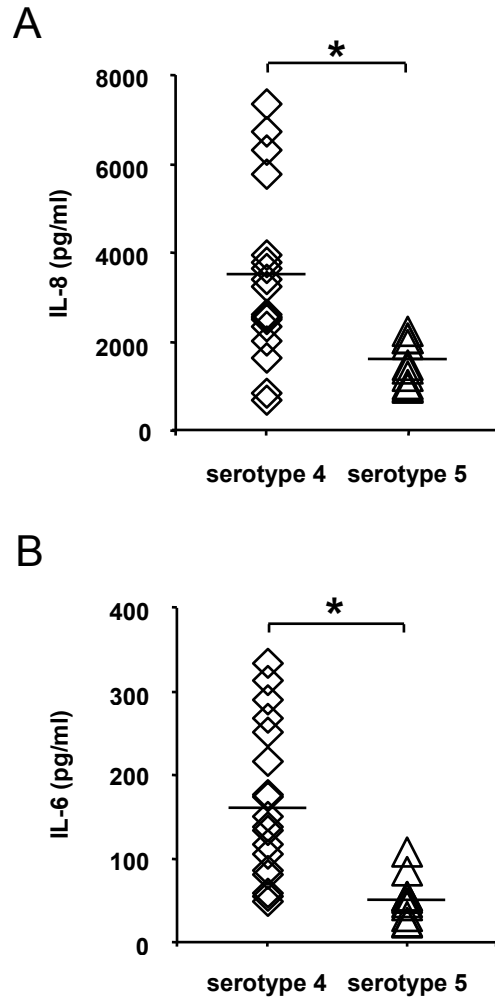


Figure 3 : Induction of IL-8 (A) and IL-6 (B) production by different *H. parasuis* strains at 24 h post-infection. NPTr cells were stimulated with heat-killed *H. parasuis* (5×10^8 CFU/ml) serotype 4 isolates ($n = 18$, diamonds) or serotype 5 isolates ($n = 10$, triangles) recovered from diseased pigs. Cytokine production was measured by ELISA titration of stimulated cell supernatants. Each point represents mean cytokine induction by one given isolate. Lines represent mean cytokine production by each group of isolates.

3. CONCLUSION

The process of initial colonization following *H. parasuis* infection is poorly defined. It is important to elucidate the interactions between bacteria and mucosal epithelium to better understand the pathogenesis of the infection and to identify virulence factors. We demonstrated here that *H. parasuis* LOS is important for adhesion of the bacteria to NPTr cells. We also showed for the first time that, although not toxic, *H. parasuis* is able to induce apoptosis of tracheal epithelial cells which may be a critical mechanism to disrupt the tracheal mucosa. Moreover, *H. parasuis* is able to stimulate NPTr cells to produce inflammatory mediators. However, LOS does not seem to be involved in the induction of apoptosis or stimulation of cytokine release by NPTr cells, which suggests that other so far unknown bacterial components may play an important role as epithelial cell activators.

4. MATERIALS AND METHODS

4.1. Bacterial strains and growth conditions

H. parasuis Nagasaki strain (reference strain of serotype 5) isolated from a case of septicemia with meningitis [47] (kindly provided by Dr. R.F. Ross, Iowa State University) was used as the reference strain for this study. Field isolates of *H. parasuis* serotypes 4 ($n = 18$) and 5 ($n = 10$), recovered from cases of meningitis, septicemia, arthritis or pneumonia in swine and serotyped using the indirect hemagglutination test [5], were also included in this study. The reference strain and field isolates were grown as previously described [24]. For most of the experiments, 1×10^7 colony-forming units per mL (CFU/mL) of live bacteria and 5×10^8 CFU/mL of heat-killed bacteria were used as there is an increase of live bacteria from 1×10^7 CFU/mL to 5×10^8 CFU/mL during the 48 h incubation time (data not shown). Live bacteria were used to verify if components that may have been affected during bacterial inactivation could play a certain role in NPTr cells activation. In addition, an hypothetical role of *in vivo* produced products (including secreted products) could also be evaluated.

4.2. LOS purification

LOS was purified from lyophilized *H. parasuis* Nagasaki strain as previously described [24, 48]. No significant protein contamination of the LOS preparation was detected as determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis followed by silver and Coomassie Blue stainings (data not shown). Purified LOS was also examined for the presence of proteins by bicinchoninic acid protein assay (Pierce, Rockford, IL, USA), and was shown to have less than 5% protein contamination (w/w) (data not shown). Endotoxins from *H. parasuis* LOS and positive control *E. coli* LPS O127:B8 (Sigma-Aldrich) were quantified as previously described [24]. A similar concentration of 4 endotoxin units/ng was obtained for both *H. parasuis* LOS and *E. coli* LPS.

4.3. Cell culture

The newborn pig trachea epithelial cell line NPTr [49] was grown in MEM (Minimum Essential Medium) (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated foetal bovine serum, penicillin-streptomycin, gentamicine, sodium pyruvate, and L-glutamine (Invitrogen). Cells were cultured at 37 °C with 5% CO₂ in a humid atmosphere in T75 flasks (Falcon, Becton Dickinson, Bedford, MA, USA) and 24-well tissue culture plates (Falcon). For assays, cells were trypsinized by adding a 0.05% trypsin–0.03% EDTA solution (Invitrogen) and diluted in culture medium to obtain a concentration of 8×10^4 cells/ml. Then, the cell suspension was distributed into tissue culture plates and incubated until cell confluence was reached. Before assays, culture medium was removed from the wells and replaced by complete medium without antibiotics.

4.4. Adhesion assay

NPTr cells were infected with *H. parasuis* Nagasaki strain at 1×10^7 CFU/ml in culture medium (1 ml per well) and incubated at 37 °C with 5% CO₂ for 2 h. Then, the assay was performed as described previously [24]. To test the role of *H. parasuis* LOS on bacterial adhesion to NPTr cells, purified *H. parasuis* LOS (100

$\mu\text{g/ml}$) from Nagasaki strain was added to the cell monolayer along with Nagasaki strain (1×10^7 CFU/ml). Results are expressed as percentage of adhesion compared to the adhesion level of Nagasaki strain alone (considered as 100%) and represent mean of duplicates from three independent experiments.

4.5. Cytotoxicity and apoptosis assays

The cytotoxic effect of live (up to 1×10^8 CFU/ml) or heat-killed (5×10^8 CFU/ml) *H. parasuis* Nagasaki strain, or purified LOS (up to $100 \mu\text{g/ml}$) was evaluated by lactate dehydrogenase (LDH) release measurement as described previously [24].

The ability of *H. parasuis* to induce apoptosis of NPTr cells was determined by measuring DNA fragmentation using Cell Death Detection ELISA kit (Roche). NPTr cells were treated with live (1×10^8 CFU/ml), heat-killed (5×10^8 CFU/ml) *H. parasuis* Nagasaki strain, or purified *H. parasuis* LOS ($100 \mu\text{g/ml}$). To inhibit stimulation due to LOS, polymyxin B (PmB, Sigma-Aldrich), a cationic antibiotic that binds to the lipid A region from LOS, was used. Heat-killed whole bacteria were pre-incubated with $10 \mu\text{g/ml}$ of PmB in cell culture medium with agitation for 30 min at room temperature, before incubation with NPTr cells. The proapoptotic topoisomerase-I inhibitor camptothecin (CAM, $40 \mu\text{g/ml}$, Sigma-Aldrich) was used as positive control. Apoptosis was measured at 6, 12, and 24 h after stimulation. In selected experiments, the monolayers were incubated for 24 h with heat-killed *H. parasuis* Nagasaki strain corresponding to different concentrations (1×10^6 to 1×10^9 CFU/mL). Monolayers were processed according to manufacturer's instructions. Results are expressed as absorbance of the experimental cell lysates read at 405 nm after 30 min which correspond to the level of DNA fragmentation. Samples from at least three individual assays were measured in duplicates.

Induction of apoptosis by *H. parasuis* was confirmed using Apoptosis Marker : Cleaved Caspase-3 (Asp 175) Western Detection Kit (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) which detects specifically activated caspase-3 (p17 fragment) and its inactive zymogen procaspase-3. Activation of caspase-3 requires proteolytic processing of inactive procaspase-3 (35 kDa) into activated p17 and p12 fragments. CAM ($40 \mu\text{g/ml}$) was used as positive control. NPTr cells

were incubated either with heat-killed *H. parasuis* Nagasaki strain (5×10^8 CFU/ml), with CAM, or with medium alone for 24 h. Then, monolayers were processed according to the manufacturer's instructions. Results shown are representative immunoblots of three independent experiments.

4.6. Cytokine stimulation assays

Cells were stimulated with live (1×10^7 CFU/ml), heat-killed (5×10^8 CFU/ml), PmB-treated heat-killed *H. parasuis* Nagasaki strain (5×10^8 CFU/ml), purified *H. parasuis* LOS (10 µg/ml) from Nagasaki strain, PmB-treated LOS (10 µg/ml), or the positive control *E. coli* LPS (10 µg/ml) as described earlier [24]. In selected experiments, the monolayers were incubated with heat-killed *H. parasuis* Nagasaki strain corresponding to different concentrations (1×10^6 to 1×10^9 CFU/ml) for 48 h or with field isolates of *H. parasuis* serotypes 4 and 5 (5×10^8 CFU/ml) isolated from diseased pigs for 24 h. Cytokines and chemokines were detected by direct sandwich enzyme linked immunosorbent assays (ELISA) using porcine specific pair-matched antibodies for TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), IFN- γ (Biosource International, Camarillo, CA, USA) and TGF- β 1 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA), according to the manufacturer's recommendations.

4.7. Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm standard deviation (SD, error bars). Data were analysed by Mann-Whitney U test. For comparison of cytokine release induced by different *H. parasuis* isolates, the Dunnett post-hoc test was used. A *P* value < 0.05 was considered as significant. All assays were repeated at least three times in independent experiments.

ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge Dr. Marylène Kobisch (AFSSA, France), Dr. Khyali Ram Mittal (Université de Montréal), Dr. Carlos Pijoan (*in memoriam*, U. of

Minnesota), and Dr. Eileen Thacker and Dr. Richard F. Ross from Iowa State University for providing *H. parasuis* strain and isolates used in this study. We thank Dr. M. Ferrari (Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Brescia, Italy) for providing the NPTr cell line. We also wish to thank Dr. André Buret (U. of Calgary) for helpful discussions on apoptosis. This work was supported by the Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT) grant no PR-106 088. Ghyslaine Vanier is the recipient of a FQRNT scholarship.

REFERENCES

- [1] Oliveira S, Pijoan C. Haemophilus parasuis: new trends on diagnosis, epidemiology and control. Vet Microbiol 2004;99:1-12.
- [2] MacInnes JI, Desrosiers R. Agents of the "suis-ide diseases" of swine: Actinobacillus suis, Haemophilus parasuis, and Streptococcus suis. Can J Vet Res 1999;63:83-9.
- [3] Blanco I, Galina-Pantoja L, Oliveira S, Pijoan C, Sanchez C, Canals A. Comparison between Haemophilus parasuis infection in colostrums-deprived and sow-reared piglets. Vet Microbiol 2004;103:21-7.
- [4] Kielstein P, Rapp-Gabrielson VJ. Designation of 15 serovars of Haemophilus parasuis on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts. J Clin Microbiol 1992;30:862-5.
- [5] Tadjine M, Mittal KR, Bourdon S, Gottschalk M. Development of a new serological test for serotyping Haemophilus parasuis isolates and determination of their prevalence in North America. J Clin Microbiol 2004;42:839-40.
- [6] Morozumi T, Nicolet J. Some antigenic properties of Haemophilus parasuis and a proposal for serological classification. J Clin Microbiol 1986;23:1022-5.
- [7] Angen O, Svensmark B, Mittal KR. Serological characterization of Danish Haemophilus parasuis isolates. Vet Microbiol 2004;103:255-8.
- [8] Cai X, Chen H, Blackall PJ, Yin Z, Wang L, Liu Z, et al. Serological characterization of Haemophilus parasuis isolates from China. Vet Microbiol 2005;111:231-6.

- [9] Rubies X, Kielstein P, Costa L, Riera P, Artigas C, Espuna E. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars isolated in Spain from 1993 to 1997. *Vet Microbiol* 1999;66:245-8.
- [10] Khair OA, Davies RJ, Devalia JL. Bacterial-induced release of inflammatory mediators by bronchial epithelial cells. *Eur Respir J* 1996;9:1913-22.
- [11] Bannerman DD, Tupper JC, Erwert RD, Winn RK, Harlan JM. Divergence of bacterial lipopolysaccharide pro-apoptotic signaling downstream of IRAK-1. *J Biol Chem* 2002;277:8048-53.
- [12] Alfa MJ, DeGagne P. Attachment of *Haemophilus ducreyi* to human foreskin fibroblasts involves LOS and fibronectin. *Microb Pathog* 1997;22:39-46.
- [13] Sylte MJ, Corbeil LB, Inzana TJ, Czuprynski CJ. *Haemophilus somnus* induces apoptosis in bovine endothelial cells in vitro. *Infect Immun* 2001;69:1650-60.
- [14] Swords WE, Buscher BA, Ver Steeg li K, Preston A, Nichols WA, Weiser JN, et al. Non-typeable *Haemophilus influenzae* adhere to and invade human bronchial epithelial cells via an interaction of lipooligosaccharide with the PAF receptor. *Mol Microbiol* 2000;37:13-27.
- [15] Chin AC, Flynn AN, Fedwick JP, Buret AG. The role of caspase-3 in lipopolysaccharide-mediated disruption of intestinal epithelial tight junctions. *Can J Physiol Pharmacol* 2006;84:1043-50.
- [16] Amano H, Shibata M, Takahashi K, Sasaki Y. Effects on endotoxin pathogenicity in pigs with acute septicemia of *Haemophilus parasuis* infection. *J Vet Med Sci* 1997;59:451-5.
- [17] Amano H, Shibata M, Kajio N, Morozumi T. Pathologic observations of pigs intranasally inoculated with serovar 1, 4 and 5 of *Haemophilus parasuis* using immunoperoxidase method. *J Vet Med Sci* 1994;56:639-44.
- [18] Segales J, Domingo M, Solano GI, Pijoan C. Immunohistochemical detection of *Haemophilus parasuis* serovar 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of experimentally infected swine. *J Vet Diagn Invest* 1997;9:237-43.
- [19] Vahle JL, Haynes JS, Andrews JJ. Interaction of *Haemophilus parasuis* with nasal and tracheal mucosa following intranasal inoculation of cesarean derived colostrum deprived (CDCD) swine. *Can J Vet Res* 1997;61:200-6.

- [20] Vahle JL, Haynes JS, Andrews JJ. Experimental reproduction of *Haemophilus parasuis* infection in swine: clinical, bacteriological, and morphologic findings. *J Vet Diagn Invest* 1995;7:476-80.
- [21] Auger E. Study of the adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to immortalized porcine epithelial cells Master of Science 2006.
- [22] St Geme JW, 3rd, Falkow S. *Haemophilus influenzae* adheres to and enters cultured human epithelial cells. *Infect Immun* 1990;58:4036-44.
- [23] Fakhri MG, Murphy TF, Pattoli MA, Berenson CS. Specific binding of *Haemophilus influenzae* to minor gangliosides of human respiratory epithelial cells. *Infect Immun* 1997;65:1695-700.
- [24] Bouchet B, Vanier G, Jacques M, Gottschalk M. Interactions of *Haemophilus parasuis* and its LOS with Porcine Brain Microvascular Endothelial Cells. *Vet Res* 2008;39:42.
- [25] Jacques M, Paradis SE. Adhesin-receptor interactions in Pasteurellaceae. *FEMS Microbiol Rev* 1998;22:45-59.
- [26] St Geme JW, 3rd. Molecular and cellular determinants of non-typeable *Haemophilus influenzae* adherence and invasion. *Cell Microbiol* 2002;4:191-200.
- [27] Vanier G, Szczotka A, Friedl P, Lacouture S, Jacques M, Gottschalk M. *Haemophilus parasuis* invades porcine brain microvascular endothelial cells. *Microbiology* 2006;152:135-42.
- [28] Sylte MJ, Leite FP, Kuckleburg CJ, Inzana TJ, Czuprynski CJ. Caspase activation during *Haemophilus somnus* lipooligosaccharide-mediated apoptosis of bovine endothelial cells. *Microb Pathog* 2003;35:285-91.
- [29] Wising C, Azem J, Zetterberg M, Svensson LA, Ahlman K, Lagergard T. Induction of apoptosis/necrosis in various human cell lineages by *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin. *Toxicon* 2005;45:767-76.
- [30] Wesson CA, Deringer J, Liou LE, Bayles KW, Bohach GA, Trumble WR. Apoptosis induced by *Staphylococcus aureus* in epithelial cells utilizes a mechanism involving caspases 8 and 3. *Infect Immun* 2000;68:2998-3001.
- [31] Kaufman MR, Jia J, Zeng L, Ha U, Chow M, Jin S. *Pseudomonas aeruginosa* mediated apoptosis requires the ADP-ribosylating activity of *exoS*. *Microbiology* 2000;146 (Pt 10):2531-41.

- [32] Chin AC, Teoh DA, Scott KG, Meddings JB, Macnaughton WK, Buret AG. Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. *Infect Immun* 2002;70:3673-80.
- [33] Weinrauch Y, Zychlinsky A. The induction of apoptosis by bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol* 1999;53:155-87.
- [34] Bojarski C, Weiske J, Schoneberg T, Schroder W, Mankertz J, Schulzke JD, et al. The specific fates of tight junction proteins in apoptotic epithelial cells. *J Cell Sci* 2004;117:2097-107.
- [35] Gregorc U, Ivanova S, Thomas M, Turk V, Banks L, Turk B. hDLG/SAP97, a member of the MAGUK protein family, is a novel caspase target during cell-cell detachment in apoptosis. *Biol Chem* 2005;386:705-10.
- [36] Yu LC, Flynn AN, Turner JR, Buret AG. SGLT-1-mediated glucose uptake protects intestinal epithelial cells against LPS-induced apoptosis and barrier defects: a novel cellular rescue mechanism? *Faseb J* 2005;19:1822-35.
- [37] Clemans DL, Bauer RJ, Hanson JA, Hobbs MV, St Geme JW, 3rd, Marrs CF, et al. Induction of proinflammatory cytokines from human respiratory epithelial cells after stimulation by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 2000;68:4430-40.
- [38] Henderson B, Poole S, Wilson M. Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microbiol Rev* 1996;60:316-41.
- [39] Svanborg C, Godaly G, Hedlund M. Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. *Curr Opin Microbiol* 1999;2:99-105.
- [40] Kagnoff MF, Eckmann L. Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J Clin Invest* 1997;100:6-10.
- [41] Wilson M, Seymour R, Henderson B. Bacterial perturbation of cytokine networks. *Infect Immun* 1998;66:2401-9.
- [42] Wang B, Cleary PP, Xu H, Li JD. Up-regulation of interleukin-8 by novel small cytoplasmic molecules of nontypeable *Haemophilus influenzae* via p38 and extracellular signal-regulated kinase pathways. *Infect Immun* 2003;71:5523-30.

- [43] Rastogi D, Ratner AJ, Prince A. Host-bacterial interactions in the initiation of inflammation. *Paediatr Respir Rev* 2001;2:245-52.
- [44] Berenson CS, Murphy TF, Wrona CT, Sethi S. Outer membrane protein P6 of nontypeable *Haemophilus influenzae* is a potent and selective inducer of human macrophage proinflammatory cytokines. *Infect Immun* 2005;73:2728-35.
- [45] Amano H, Shibata M, Kajio N, Morozumi T. Pathogenicity of *Haemophilus parasuis* serovars 4 and 5 in contact-exposed pigs. *J Vet Med Sci* 1996;58:559-61.
- [46] Rapp-Gabrielson VJ, Gabrielson DA, Schamber GJ. Comparative virulence of *Haemophilus parasuis* serovars 1 to 7 in guinea pigs. *Am J Vet Res* 1992;53:987-94.
- [47] Morozumi T, Nicolet J. Morphological variations of *Haemophilus parasuis* strains. *J Clin Microbiol* 1986;23:138-42.
- [48] Darveau RP, Hancock RE. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains. *J Bacteriol* 1983;155:831-8.
- [49] Ferrari M, Scalvini A, Losio MN, Corradi A, Soncini M, Bignotti E, et al. Establishment and characterization of two new pig cell lines for use in virological diagnostic laboratories. *J Virol Methods* 2003;107:205-12.

IV. DISCUSSION

Les connaissances sur la pathogenèse de l'infection causée par *Haemophilus parasuis* demeurent limitées. Les mécanismes par lesquels la bactérie colonise le tractus respiratoire supérieur pour accéder à la circulation sanguine sont inconnus, de même que les outils utilisés pour accéder au système nerveux central et causer la méningite.

H. parasuis doit être capable de traverser une première barrière mécanique constituée par l'épithélium trachéal pour accéder à la circulation sanguine. La bactérie doit être présente en assez grande quantité pour contourner les mécanismes de l'immunité innée pour causer la septicémie. On peut penser que *H. parasuis* y parvient en résistant à la phagocytose. On ne connaît rien des interactions entre *H. parasuis* et les polymorphonucléaires ou les monocytes du sang, mais en revanche, on peut supposer que la bactérie pourrait résister aux phagocytes du sang puisqu'il a déjà été démontré que ce pathogène est capable de résister à la phagocytose par des macrophages alvéolaires porcins [102]. La bactérie doit ensuite traverser une autre barrière physiologique, la BBB, pour se rendre au cerveau et provoquer la méningite. Les interactions de la bactérie avec l'épithélium trachéal dans les premières phases de l'infection à *H. parasuis* pourraient donc constituer une étape critique de la pathogenèse de cette bactérie. De même, le contact entre *H. parasuis* et les cellules de la BBB semble représenter le point d'entrée de la bactérie pour accéder au cerveau [127], et semble ainsi être une étape clé pour le développement de la méningite.

Malgré les études réalisées pour identifier les facteurs de virulence de *H. parasuis*, on ignore quels sont ceux responsables de la colonisation du tractus respiratoire supérieur du porc. On ignore également quels sont les facteurs de virulence impliqués dans les interactions entre la bactérie et les cellules de la BBB. Le but de cette étude était donc d'évaluer différents types d'interactions entre *H. parasuis* et des cellules de trachée (NPTr) et de microvaisseaux cérébraux (PBMEC). Puisque le LOS/LPS de nombreuses bactéries à Gram négatif est reconnu comme étant un facteur de virulence important, nous avons également voulu déterminer si le LOS de *H. parasuis* était impliqué dans les interactions avec ces cellules. Le rôle du LOS dans l'adhésion aux NPTr, et aux PBMEC a donc été évalué. Le but de cette étude était également de déterminer si *H. parasuis* et son

LOS étaient capables d'induire l'apoptose des NPTr et des PBMEC, et de provoquer le relâchement de cytokines et de chimiokines par ces cellules.

Bien que peu de renseignements soient disponibles concernant la pathogenèse de l'infection par *H. parasuis*, il a récemment été démontré que la bactérie adhère à des cellules épithéliales de trachée, les NPTr [8]. Il a également été établi que *H. parasuis* était capable d'adhérer à et d'envahir des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux, les PBMEC [127]. Bien que l'invasion de *H. parasuis* aux PBMEC ait été partiellement caractérisée [127], aucune étude n'a été menée pour déterminer quelles sont les adhésines de *H. parasuis*.

Pour déterminer si le LOS est impliqué dans l'adhésion de *H. parasuis* aux NPTr et aux PBMEC, du LOS purifié et la bactérie vivante ont été utilisés dans un test compétitif. L'adhésion de *H. parasuis* aux cellules des deux lignées était significativement affectée en présence de LOS. Les résultats indiquent donc que le LOS semble jouer un rôle important dans l'adhésion. Cependant, l'inhibition de l'adhésion n'était pas complète en présence de LOS. Nous avons pu observer une inhibition de l'adhésion plus forte pour les NPTr (91%) que pour les PBMEC (62%), bien que la concentration bactérienne et le temps de contact étaient plus importants avec les NPTr. Nos résultats semblent suggérer que l'adhésion de *H. parasuis* aux NPTr serait médiée principalement par le LOS, alors qu'il semble être responsable seulement en partie de l'adhésion aux PBMEC. Ceci indique donc que l'adhésion de *H. parasuis*, en particulier aux PBMEC, pourrait impliquer d'autres adhésines. En effet, il est clairement établi que pour d'autres bactéries de la famille des *Pasteurellaceae*, le LOS n'est pas la seule composante bactérienne jouant un rôle dans l'adhésion. Ainsi, des fimbriae, fibrilles, capsule ou autres composantes de nature protéique sont autant de structures de surface exprimées par les bactéries pour multiplier les sites de contact avec la cellule hôte et assurer un fort attachement [2, 47, 107, 111]. Même si les protéines ne semblent pas intervenir dans l'invasion des PBMEC par *H. parasuis* [127], leur implication dans l'adhésion ne peut pas être écartée. Ainsi l'étude d'autres structures de surface de *H. parasuis*, particulièrement les protéines, pour découvrir d'autres adhésines de ce pathogène, serait une avenue intéressante.

Il est connu que certains pathogènes provoquent des dommages aux cellules hôte en induisant de la cytotoxicité. En effet il a été démontré que *H. influenzae* et son LPS étaient capables de détruire les cellules d'une monocouche de BMEC bovines [87], et d'altérer la perméabilité de la BBB dans un modèle de méningite utilisant des BMEC de rat [120]. Le potentiel toxique de *H. parasuis* envers les NPTr et les PBMEC a été évalué à l'aide d'un test mesurant le relâchement de LDH. Nous avons confirmé que ni *H. parasuis*, ni son LOS n'étaient toxiques pour les PBMEC. Nos résultats indiquent également que *H. parasuis* et son LOS n'induisent pas d'effets cytotoxiques envers les NPTr.

Puisque la toxicité ne semble pas être un mécanisme utilisé par *H. parasuis* pour endommager l'épithélium trachéal et la BBB, sa capacité à induire de l'apoptose a été vérifiée. En effet, tout comme la cytotoxicité, l'induction de l'apoptose peut être un moyen utilisé par les bactéries pathogènes pour détruire les cellules hôtes et endommager les barrières naturelles de l'hôte [112], ou pour fuir la phagocytose en éliminant les cellules phagocytaires [134]. Il a également été observé que *H. ducreyi* était capable d'induire l'apoptose de divers types cellulaires grâce à la "cytolethal distending toxin" [40, 132], et que *H. somnus* était capable d'induire l'apoptose de cellules endothéliales bovines *in vitro* [112]. Bien que *H. parasuis* ne soit pas toxique envers chacune des 2 lignées cellulaires testées, la présente étude révèle pour la première fois que ce pathogène a la capacité d'induire l'apoptose des NPTr et des PBMEC tel qu'indiqué par l'activation de la caspase-3.

Chez les organismes multicellulaires, épithélium et endothélium représentent les frontières entre les différents compartiments. Ceci requiert l'établissement de contacts cellule-cellule stables entre les cellules adjacentes pour résister au stress mécanique et prévenir la diffusion des solutés par flux paracellulaire [21]. Les jonctions adhérentes et les desmosomes forment le lien mécanique principal entre les cellules voisines, alors que les jonctions serrées forment le ciment intercellulaire qui est d'une importance majeure pour le maintien de la polarité des cellules endothéliales et épithéliales. Durant l'apoptose, une perte de la polarisation peut être observée. Ceci est dû en partie à la destruction des contacts cellule-cellule médiés par les cadhérines et les desmosomes. La

destruction régulée des jonctions serrées, jonctions adhérentes et desmosomes semble représenter une étape cruciale lors de l'extrusion de cellules apoptotiques des couches de cellules endothéliales et épithéliales. Spécialement lorsque la cellule apoptotique perd ses contacts avec les cellules voisines et se détache, il est capital que les cellules restantes établissent de nouveaux contacts pour maintenir la fonction de la barrière et ainsi éviter l'infiltration d'agents étrangers [21].

En plus de son effet destructeur sur les cellules, l'apoptose a pour effet de diminuer la résistance électrique trans-endothéliale et trans-épithéliale [21]. De plus il a été montré que les protéines desmosomales étaient ciblées par les caspases. Les caspases clivent également les occludine et claudine-2. En plus des protéines membranaires intégrales des jonctions serrées, les protéines adaptatrices cytoplasmiques ZO-1 et ZO-2 sont fragmentées par les caspases. Les conséquences sont une destruction complète des structures de jonctions serrées après induction de l'apoptose [21].

H. parasuis pourrait donc utiliser tous ces mécanismes pour se frayer un chemin à travers les différentes barrières mécaniques de l'organisme, soit en détruisant directement les cellules, soit en affaiblissant les liens entre les cellules via l'activité des caspases. Ainsi, *H. parasuis* pourrait franchir la barrière du tractus respiratoire supérieur en détruisant les cellules de l'épithélium trachéal et pourrait ainsi avoir accès aux capillaires sous-jacents pour pénétrer dans la circulation sanguine. Il semble également que *H. parasuis* pourrait adopter cette stratégie pour accéder au SNC. En effet, la bactérie ayant rejoint la circulation sanguine, elle peut voyager jusqu'à la BBB. Elle pourrait alors détruire les cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux en induisant leur apoptose pour traverser des capillaires jusque dans le cerveau, et ainsi provoquer la méningite.

Evidemment, il serait intéressant de tester ces hypothèses à l'aide d'un modèle de transwell et/ou d'un modèle *in vivo*. De plus, toutes les expériences de cette étude ont été réalisées avec la souche Nagasaki considérée comme étant une souche virulente de *H. parasuis*, il serait donc intéressant d'observer le comportement de souches virulentes et avirulentes et de comparer leur capacité à induire l'apoptose de cellules porcines.

Le rôle du LOS de *H. parasuis* dans l'induction de l'apoptose a également été éclairci. Contrairement à ce qui a déjà été démontré pour le LOS de *H. somnus*

[113], le LOS de *H. parasuis* ne semble jouer aucun rôle dans l'induction de l'apoptose des NPTr et des PBMEC. En effet, aucune différence dans les niveaux d'apoptose n'a été observée entre le LOS et le contrôle négatif de cellules seules. Ainsi, d'autres composantes bactériennes serraient probablement impliquées dans l'induction de la mort cellulaire par *H. parasuis*. Comme il a été observé chez *H. ducreyi*, la "cytolethal distending toxin" semble être responsable de l'induction de l'apoptose. Cependant, à ce jour, aucune toxine de *H. parasuis* n'a été décrite [127]. La compréhension complète du phénomène d'induction de l'apoptose par *H. parasuis* nécessite des études complémentaires pour déterminer quelles sont les composantes bactériennes entrant en jeu lors de ce processus.

Les cytokines sont des protéines pouvant être sécrétées par presque toutes les cellules de l'organisme excepté les érythrocytes, et qui peuvent se lier à et activer un grand éventail de types cellulaires [42]. Elles sont primordiales pour le bon fonctionnement de l'organisme car elles interviennent à de nombreux niveaux, et exercent des actions spécifiques très différentes selon la situation. Parmi les actions biologiques variées des cytokines, on peut noter la chimiotaxie, l'activation métabolique, l'inhibition ou activation de la prolifération, la différenciation ou encore l'apoptose des cellules. Les cytokines ont également comme rôle principal le bon fonctionnement du système immunitaire [42]. Certaines bactéries ciblent les cellules de l'hôte et les stimulent à produire des médiateurs inflammatoires, alors que d'autres traversent les muqueuses et activent macrophages et cellules dendritiques. Bien que le relâchement systémique de médiateurs inflammatoires cause de nombreux symptômes et signes d'infection, la production locale de chimiokines à pour but de recruter des cellules inflammatoires et des lymphocytes qui participent directement à l'élimination des bactéries des sites muqueux [110].

Les surfaces muqueuses continuent là où la peau s'arrête, et constituent le lien entre l'environnement et les tissus à l'intérieur du corps. L'inflammation est habituellement la spécialité des cellules spécialisées comme les macrophages, et les neutrophiles [110]. On sait maintenant que les cellules épithéliales répondent à des dangers extérieurs et qu'elles sont également capables de produire un éventail de médiateurs qui transmettent les signaux à travers la barrière muqueuse. L'inflammation muqueuse peut être induite par une interaction directe du pathogène

avec les cellules épithéliales ou avec les cellules inflammatoires spécialisées après que la bactérie ai traversé l'épithélium serré jusqu'à la lamina propria [110].

L'endothélium microvasculaire cérébral est quand à lui une barrière avec un faible niveau d'endocytose des fluides, et présentant une haute résistance à la circulation des macromolécules [126]. Les cellules endothéliales de cerveau constituent une part importante de l'axe neuro-immun [128]. Elles sont capables de transporter et de sécréter des substances neuro-immunes, incluant des cytokines [128]. Les cellules endothéliales de cerveau ont la capacité de recevoir des signaux d'un compartiment, par exemple le sang, et de sécréter des médiateurs dans l'autre, par exemple dans le cerveau [128]. Elles sont exposées à des substances neuromodulatrices, des cellules immunitaires, des neurotransmetteurs et des hormones, des stress environnementaux, et des composés potentiellement toxiques, endogènes et exogènes, tant par la face exposée au cerveau que celle exposée au sang [128]. Diverses composantes bactériennes dans le sang ou le fluide cérébrospinal peuvent engager les récepteurs Toll-like de l'endothélium, et activer les cascades de signalisation en aval [126]. Les cellules endothéliales relâchent alors des médiateurs qui augmentent la perméabilité endothéliale [126].

Les bactéries virulentes ainsi que les membres de la microflore indigène contiennent des molécules qui peuvent induire de l'inflammation, mais seulement les pathogènes provoquent une forte réponse de l'hôte [110]. Il est communément accepté que les bactéries les plus virulentes causent les symptômes aigus et effets à long terme les plus sévères, mais les connaissances sont limitées sur comment les composantes bactériennes spécifiques induisent des manifestations aiguës de la maladie chez l'hôte [110].

Nous avons démontré pour la première fois dans cette étude que *H. parasuis* était capable d'induire la production de IL-6 et IL-8 par les cellules épithéliales de trachée. IL-6 est une cytokine multifonctionnelle avec des effets immunorégulateurs et pro-inflammatoires. Dans le compartiment mucosal, IL-6 semble accroître la maturation des lymphocytes B de la muqueuse en cellules plasmatiques productrices d'IgA [110]. Au niveau systémique, les effets de IL-6 incluent l'induction de la phase aigue et de la fièvre. IL-6 peut également agir comme messenger, des sites locaux aux sites systématiques [110]. Quand à IL-8, c'est

un puissant chimioattractant et activateur pour les leucocytes polymorphonucléaires. Il a également été démontré qu'une augmentation du niveau de cytokines pouvait résulter en une diminution de la résistance électrique trans-épithéliale et en l'altération de la formation des jonctions serrées, menant à une augmentation de la perméabilité de la barrière [21].

Nous avons également pu observer que les PBMEC stimulées par *H. parasuis* produisaient aussi IL-6 et IL-8. IL-6 est un médiateur clé de la réponse inflammatoire des infections chez le porc, et est considéré comme un des meilleurs marqueurs de méningite [34-36]. Il semble que IL-6 soit également capable de modifier la résistance électrique trans-endothéliale de cellules endothéliales de cerveau, ce qui pourrait mener à une augmentation de la perméabilité de la BBB [29]. Le rôle de IL-8 est de recruter des cellules inflammatoires comme les neutrophiles et les cellules T activées au site de l'infection. IL-8 semble également initier la translocation des leucocytes adhérents à travers la BBB [108].

La stimulation par *H. parasuis* a induit les NPTr et les PBMEC à relâcher de l'IL-8. Comme mentionné ci-dessus, cette chimiokine a pour rôle de recruter les leucocytes. Or, les leucocytes eux-mêmes peuvent relâcher une variété de produits potentiellement dangereux, capables de causer des dommages à l'hôte, comme des radicaux libres, des métalloprotéases, de l'acide perchlorique, et des eicosanoides [33, 94, 108]. En effet, lors d'une étude *in vivo*, les porcs infectés avec *H. parasuis* présentaient les lésions les plus sévères dans les régions adjacentes à des infiltrations significatives de neutrophiles [124].

H. parasuis pourrait donc profiter des dommages causés par les leucocytes eux-mêmes et des effets des cytokines sur la perméabilité de l'épithélium trachéale ou de l'endothélium cérébrale pour traverser ces barrières biologiques fragilisées. Bien que des études complémentaires soient nécessaires pour établir avec certitude les mécanismes utilisés par *H. parasuis*, on peut penser que la bactérie pourrait également profiter de la translocation des leucocytes pour traverser les différentes barrières de l'organisme.

De même que pour l'apoptose, le rôle du LOS de *H. parasuis* dans la stimulation du relâchement de cytokines restait inconnu. De façon générale, le LPS/LOS provoque une large gamme de réponses de la part des cellules

endothéliales et épithéliales et est souvent proposé comme facteur de virulence des bactéries à Gram négatif [44, 57, 68]. Il a la capacité de stimuler bon nombre de cellules hôtes à produire et à relâcher une grande variété de médiateurs, incluant TNF- α , IL-1 β , IL-6, et IL-8 [50]. Le LOS de *H. parasuis* semble, quand à lui, avoir un rôle limité dans la stimulation des NPTr et des PBMEC. En effet, on a pu observer que le LOS induisait la production de IL-8 et d'une très faible quantité de IL-6 par les NPTr, et qu'il stimulait les PBMEC à produire les mêmes cytokines. Cependant, les résultats ont montré que le LOS était responsable d'une petite partie seulement de la production de cytokines induites par *H. parasuis*. Nos résultats sont en accord avec le fait qu'il est maintenant reconnu que le LPS n'est pas la seule composante bactérienne capable d'induire des cellules eucaryotes à produire des cytokines. Plusieurs classes de composantes bactériennes de surface ou de produits de sécrétion comme des protéines, carbohydrates, pili, flagelles et lipides sont connus pour stimuler le relâchement de cytokines par les cellules hôtes [16, 27, 94, 110, 129, 131]. D'autres études sont cependant nécessaires pour caractériser les structures bactériennes responsables, avec le LOS, de la stimulation des cytokines par *H. parasuis*.

Bien que d'autres cytokines soient importantes dans l'inflammation mucosale et au niveau de la BBB, aucune autre cytokine n'a pu être détectée. En effet, les NPTr stimulée par *H. parasuis* ne produisent pas de TNF- α , IL-1 β , IFN- γ et TGF- β 1. De même, les PBMEC ne relâchent pas de TNF- α , IL-1 β et TGF- β 1. Des résultats négatifs ont également pu être observés avec le LPS de *E. coli* utilisé comme contrôle positif, suggérant que les lignées cellulaires étudiées n'ont pas la capacité à produire ces cytokines.

Les sérotypes 4 et 5 de *H. parasuis* sont considérés prédominants parmi les isolats retrouvés chez des animaux malades dans plusieurs pays [6, 22, 98, 114]. Des souches de chacun de ces sérotypes ont déjà été comparées dans des études de virulence *in vivo*, et les souches de sérotypes 5 semblent être plus virulentes que les souches de sérotype 4 [3, 4]. Nous avons donc comparé des souches de champ de ces 2 sérotypes, isolées d'animaux malades ou sains, pour leur capacité à induire le relâchement de cytokines par les NPTr et PBMEC, de

façon à établir un lien entre la virulence des souches et le profil de stimulation des cytokines par ces 2 lignées cellulaires.

Les quantités de IL-6 et IL-8 produites par les NPTr ont été mesurées après stimulation par des souches de sérotypes 4 et 5 provenant d'animaux malades, et nous avons observé que les souches de sérotype 4 induisaient une plus grande quantité de cytokines. Les PBMEC ont été stimulées avec des souches de sérotypes 4 et 5 provenant d'animaux malades, et des souches de sérotypes 4 provenant d'animaux sains. Contrairement à ce qu'on a pu observer avec les NPTr, les quantités de cytokines produites par les 3 groupes de souches n'étaient pas significativement différentes. En revanche, pour les NPTr comme pour les PBMEC, on observe une grande hétérogénéité entre les souches à l'intérieur d'un même groupe, en particulier à l'intérieur du groupe de souches de sérotypes 4 provenant d'animaux malades. Ce faisant, pour les 2 lignées cellulaires, et même si les différences ne sont pas significatives, on observe que les souches de sérotypes 4 provenant d'animaux malades sont celles qui semblent induire les plus grandes quantités de IL-6 et IL-8, bien que les souches de sérotype 5 soient considérées comme les plus virulentes [3, 4, 62].

D'après les connaissances actuelles sur la virulence de *H. parasuis*, nos résultats semblent indiquer que la capacité à induire la production de cytokines ne reflète pas forcément la virulence des souches *in vivo*. En effet, il est possible que certaines souches considérées comme étant moins virulentes induisent une grande quantité de cytokines *in vitro*, mais que ces souches ne soient pas capables de survivre *in vivo*.

D'autre part, les études de virulence *in vivo* menées jusqu'à maintenant ont comparé les souches de référence des sérotypes 4 et 5 [3, 4, 92]. La souche SW 124 de référence du sérotype 4 a été isolée d'un animal sain, alors que la souche Nagasaki de référence du sérotype 5 provient d'un animal malade. Ceci pourrait expliquer que certaines souches de champ de sérotype 4 soient plus virulentes que la souche SW 124 et que certaines souches de sérotype 5.

V. CONCLUSIONS GENERALES

Cette étude a permis d'apporter de nouvelles connaissances quand aux relations entre *H. parasuis* et son hôte. Nous avons d'abord démontré que *H. parasuis* est capable d'induire l'apoptose de cellules épithéliales de trachée et de cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux.

Nous avons également établi que *H. parasuis* stimule différents types cellulaires (NPTr et PBMEC) à produire les cytokines et chimiokines IL-6 et IL-8 et que différentes souches de sérotype 4 et 5 de *H. parasuis* ont toutes la capacité à induire la production de ces cytokines par les NPTr et les PBMEC.

Enfin, nous avons prouvé que le LOS de *H. parasuis* joue un rôle important dans l'adhésion de la bactérie aux NPTr et aux PBMEC. De plus, le LOS de *H. parasuis* compte parmi les composantes bactériennes impliquées dans la stimulation de la production de cytokines et chimiokines, mais il n'intervient pas dans le phénomène d'apoptose.

Une augmentation de l'apoptose, des changements dans les niveaux de cytokines et l'accumulation de polymorphonucléaires au site d'inflammation ont été associés avec une augmentation de la perméabilité d'une barrière. En effet, l'induction de l'apoptose passe par l'activation de caspases qui peuvent altérer les jonctions serrées et ainsi augmenter la perméabilité de l'épithélium trachéal et de la BBB. De plus, les cytokines produites pourraient elles aussi augmenter la perméabilité de l'épithélium trachéal et de la BBB. Elles peuvent également attirer des leucocytes sur le site d'inflammation, qui pourraient participer à augmenter la perméabilité de ces deux barrières biologiques de part l'effet des médiateurs qu'ils peuvent relâcher. Ainsi, *H. parasuis* pourrait profiter de cette augmentation de perméabilité pour traverser l'épithélium trachéal et pénétrer l'organisme de son hôte, ce qui pourrait constituer une des premières étapes de l'infection. De même, la fragilisation de la BBB pourrait être la voie d'accès de la bactérie pour aller atteindre le SNC et causer la méningite.

En revanche, les expériences de cette étude menées pour élucider le rôle du LOS ont révélé que cette composante bactérienne n'intervient qu'en partie dans les interactions de la bactérie avec son hôte. Le LOS participe, certes, à l'attachement de la bactérie à des cellules de trachée et de la BBB mais il ne

participe que faiblement à l'activation de ces cellules-ci, et ne semble pas impliqué directement dans le processus d'apoptose.

Le LOS étant responsable en grande partie de l'adhésion de *H. parasuis* aux cellules de trachée et de la BBB, il participe à une étape clé puisque l'adhésion constitue vraisemblablement une des premières étapes de l'infection d'une cellule. Il est donc raisonnable de supposer que le LOS serait un facteur de virulence mis en jeu dans les étapes d'attachement aux cellules de l'hôte. Ces résultats laissent supposer que d'autres composantes bactériennes interviennent, et donc que d'autres facteurs de virulence sont impliqués dans les autres étapes d'une infection à *H. parasuis*, dont l'apoptose et l'induction de cytokines.

VI. BIBLIOGRAPHIE

- [1] Aarestrup F.M., Seyfarth A.M., Angen O., Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus parasuis* and *Histophilus somni* from pigs and cattle in Denmark, *Vet Microbiol* (2004) 101:143-146.
- [2] Alfa M.J., DeGagne P., Attachment of *Haemophilus ducreyi* to human foreskin fibroblasts involves LOS and fibronectin, *Microb Pathog* (1997) 22:39-46.
- [3] Amano H., Shibata M., Kajio N., Morozumi T., Pathologic observations of pigs intranasally inoculated with serovar 1, 4 and 5 of *Haemophilus parasuis* using immunoperoxidase method, *J Vet Med Sci* (1994) 56:639-644.
- [4] Amano H., Shibata M., Kajio N., Morozumi T., Pathogenicity of *Haemophilus parasuis* serovars 4 and 5 in contact-exposed pigs, *J Vet Med Sci* (1996) 58:559-561.
- [5] Amano H., Shibata M., Takahashi K., Sasaki Y., Effects on endotoxin pathogenicity in pigs with acute septicemia of *Haemophilus parasuis* infection, *J Vet Med Sci* (1997) 59:451-455.
- [6] Angen O., Svensmark B., Mittal K.R., Serological characterization of Danish *Haemophilus parasuis* isolates, *Vet Microbiol* (2004) 103:255-258.
- [7] Atapattu DN., Czuprynski CJ., *Mannheimia haemolytica* leukotoxin induces apoptosis of bovine lymphoblastoid cells (BL-3) via a caspase-9-dependent mitochondrial pathway, *Infect. Immun.* (2005) 73:5504-5513.
- [8] Auger E., Study of the adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to immortalized porcine epithelial cells Master of Science (2006).
- [9] Bak H., Riising H.J., Protection of vaccinated pigs against experimental infections with homologous and heterologous *Haemophilus parasuis*, *Vet Rec* (2002) 151:502-505.

- [10] Bakos K., Nilsson A., Thal E., Untersuchungen über *Haemophilus suis*, Nord. Vet.-Med. (1952) 4:241-255.
- [11] Bakos K., Studien über *Haemophilus suis*, mit besonderer Berücksichtigung der serologischen Differenzierung seiner Stämme, Diss., Stockholm (1955).
- [12] Banks K.E., Humphreys T.L., Li W., Katz B.P., Wilkes D.S., Spinola S.M., *Haemophilus ducreyi* partially activates human myeloid dendritic cells., Infect Immun (2007) 75:5678-5685.
- [13] Bannerman D.D., Tupper J.C., Erwert R.D., Winn R.K., Harlan J.M., Divergence of bacterial lipopolysaccharide pro-apoptotic signaling downstream of IRAK-1, J Biol Chem (2002) 277:8048-8053.
- [14] Baumann G., Bilkei G., Effect of vaccinating sows and their piglets on the development of Glasser's disease induced by a virulent strain of *Haemophilus parasuis* serovar 5, Vet Rec (2002) 151:18-21.
- [15] Belanger M., Dubreuil D., Harel J., Girard C., Jacques M., Role of lipopolysaccharides in adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal rings, Infect Immun (1990) 58:3523-3530.
- [16] Berenson C.S., Murphy T.F., Wrona C.T., Sethi S., Outer membrane protein P6 of nontypeable *Haemophilus influenzae* is a potent and selective inducer of human macrophage proinflammatory cytokines, Infect Immun (2005) 73:2728-2735.
- [17] Biberstein E.L., White D.C., A proposal for the establishment of two new *Haemophilus* species, J Med Microbiol (1969) 2:75-78.
- [18] Bienhoff S.E., Allen G.K., Berg J.N., Release of tumor necrosis factor-alpha from bovine alveolar macrophages stimulated with bovine respiratory

viruses and bacterial endotoxins, *Vet Immunol Immunopathol* (1992) 30:341-357.

- [19] Blackall P.J., Rapp-Gabrielson V.J., Hampson D.J., Serological characterisation of *Haemophilus parasuis* isolates from Australian pigs, *Aust Vet J* (1996) 73:93-95.
- [20] Blanco I., Galina-Pantoja L., Oliveira S., Pijoan C., Sanchez C., Canals A., Comparison between *Haemophilus parasuis* infection in colostrums-deprived and sow-reared piglets, *Vet Microbiol* (2004) 103:21-27.
- [21] Bojarski C., Weiske J., Schoneberg T., Schroder W., Mankertz J., Schulzke J.D., Florian P., Fromm M., Tauber R., Huber O., The specific fates of tight junction proteins in apoptotic epithelial cells, *J Cell Sci* (2004) 117:2097-2107.
- [22] Cai X., Chen H., Blackall P.J., Yin Z., Wang L., Liu Z., Jin M., Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from China, *Vet Microbiol* (2005) 111:231-236.
- [23] Cerda-Cuellar M., Aragon V., Serum-resistance in *Haemophilus parasuis* is associated with systemic disease in swine, *Vet J* (2007).
- [24] Charland N., D'Silva C.G., Dumont R.A., Niven D.F., Contact-dependent acquisition of transferrin-bound iron by two strains of *Haemophilus parasuis*, *Can J Microbiol* (1995) 41:70-74.
- [25] Chien M.S., Chan Y.Y., Chen Z.W., Wu C.M., Liao J.W., Chen T.H., Lee W.C., Yeh K.S., Hsuan S.L., *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 10 derived ApxI induces apoptosis in porcine alveolar macrophages, *Vet Microbiol* (2009) 135:327-333.

- [26] Chin A.C., Flynn A.N., Fedwick J.P., Buret A.G., The role of caspase-3 in lipopolysaccharide-mediated disruption of intestinal epithelial tight junctions, *Can J Physiol Pharmacol* (2006) 84:1043-1050.
- [27] Clemans D.L., Bauer R.J., Hanson J.A., Hobbs M.V., St Geme J.W., 3rd, Marrs C.F., Gilsdorf J.R., Induction of proinflammatory cytokines from human respiratory epithelial cells after stimulation by nontypeable *Haemophilus influenzae*, *Infect Immun* (2000) 68:4430-4440.
- [28] Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P., Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, *Science* (1999) 284:1318-1322.
- [29] de Vries H.E., Blom-Roosemalen M.C., van Oosten M., de Boer A.G., van Berkel T.J., Breimer D.D., Kuiper J., The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro, *J Neuroimmunol* (1996) 64:37-43.
- [30] Del Rio M.L., Gutierrez C.B., Rodriguez Ferri E.F., Value of indirect hemagglutination and coagglutination tests for serotyping *Haemophilus parasuis*, *J Clin Microbiol* (2003) 41:880-882.
- [31] del Rio M.L., Gutierrez-Martin C.B., Rodriguez-Barbosa J.I., Navas J., Rodriguez-Ferri E.F., Identification and characterization of the TonB region and its role in transferrin-mediated iron acquisition in *Haemophilus parasuis*, *FEMS Immunol Med Microbiol* (2005) 45:75-86.
- [32] del Rio M.L., Navas J., Martin A.J., Gutierrez C.B., Rodriguez-Barbosa J.I., Rodriguez Ferri E.F., Molecular characterization of *Haemophilus parasuis* ferric hydroxamate uptake (*fhu*) genes and constitutive expression of the FhuA receptor, *Vet Res* (2006) 37:49-59.
- [33] Diab A., Zhu J., Lindquist L., Wretling B., Link H., Bakhiet M., Cytokine mRNA profiles during the course of experimental *Haemophilus influenzae* bacterial meningitis, *Clin Immunol Immunopathol* (1997) 85:236-245.

- [34] Fida N.M., Al-Mughales J., Farouq M., Interleukin-1alpha, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels in children with sepsis and meningitis, *Pediatr Int* (2006) 48:118-124.
- [35] Fida N.M., Al-Mughales J.A., Fadelallah M.F., Serum concentrations of interleukin-1 alpha, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in neonatal sepsis and meningitis, *Saudi Med J* (2006) 27:1508-1514.
- [36] Fossum C., Wattring E., Fuxler L., Jensen K.T., Wallgren P., Evaluation of various cytokines (IL-6, IFN-alpha, IFN-gamma, TNF-alpha) as markers for acute bacterial infection in swine--a possible role for serum interleukin-6, *Vet Immunol Immunopathol* (1998) 64:161-172.
- [37] Frick A.G., Joseph T.D., Pang L., Rabe A.M., St Geme J.W., 3rd, Look D.C., *Haemophilus influenzae* stimulates ICAM-1 expression on respiratory epithelial cells, *J Immunol* (2000) 164:4185-4196.
- [38] Galdiero M., D'Amico M., Gorga F., Di Filippo C., D'Isanto M., Vitiello M., Longanella A., Tortora A., *Haemophilus influenzae* porin contributes to signaling of the inflammatory cascade in rat brain, *Infect Immun* (2001) 69:221-227.
- [39] Galdiero M., Galdiero M., Finamore E., Rossano F., Gambuzza M., Catania M.R., Teti G., Midiri A., Mancuso G., *Haemophilus influenzae* porin induces Toll-like receptor 2-mediated cytokine production in human monocytes and mouse macrophages, *Infect Immun* (2004) 72:1204-1209.
- [40] Gelfanova V., Hansen E.J., Spinola S.M., Cytolethal distending toxin of *Haemophilus ducreyi* induces apoptotic death of Jurkat T cells, *Infect Immun* (1999) 67:6394-6402.

- [41] Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P., Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases, *Nat Rev Microbiol* (2004) 2:95-108.
- [42] Henderson B., Poole S., Wilson M., Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis, *Microbiol Rev* (1996) 60:316-341.
- [43] Hill C.E., Metcalf D.S., MacInnes J.I., A search for virulence genes of *Haemophilus parasuis* using differential display RT-PCR, *Vet Microbiol* (2003) 96:189-202.
- [44] Humphries H.E., Triantafilou M., Makepeace B.L., Heckels J.E., Triantafilou K., Christodoulides M., Activation of human meningeal cells is modulated by lipopolysaccharide (LPS) and non-LPS components of *Neisseria meningitidis* and is independent of Toll-like receptor (TLR)4 and TLR2 signalling, *Cell Microbiol* (2005) 7:415-430.
- [45] Iovane G., Pagnini P., Galdiero M., Cipollaro de l'Ero G., Vitiello M., D'Isanto M., Marcatili A., Role of *Pasteurella multocida* porin on cytokine expression and release by murine splenocytes, *Vet Immunol Immunopathol* (1998) 66:391-404.
- [46] Jacques M., Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence, *Trends Microbiol* (1996) 4:408-409.
- [47] Jacques M., Paradis S.E., Adhesin-receptor interactions in *Pasteurellaceae*, *FEMS Microbiol Rev* (1998) 22:45-59.
- [48] Jin H., Zhou R., Kang M., Luo R., Cai X., Chen H., Biofilm formation by field isolates and reference strains of *Haemophilus parasuis*, *Vet Microbiol* (2006) 118:117-123.

- [49] Jung K., Ha Y., Kim S.H., Chae C., Development of polymerase chain reaction and comparison with in situ hybridization for the detection of *Haemophilus parasuis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues, *J Vet Med Sci* (2004) 66:841-845.
- [50] Khair O.A., Davies R.J., Devalia J.L., Bacterial-induced release of inflammatory mediators by bronchial epithelial cells, *Eur Respir J* (1996) 9:1913-1922.
- [51] Kielstein P., Rosner H., Muller W., Typing of heat-stable soluble *Haemophilus parasuis* antigen by means of agar gel precipitation and the dot-blot procedure, *Zentralbl Veterinarmed B* (1991) 38:315-320.
- [52] Kielstein P., Rapp-Gabrielson V.J., Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts, *J Clin Microbiol* (1992) 30:862-865.
- [53] Kielstein V.P., Zur Glässerschen Krankheit des Schweines Untersuchungen über Zusammenhänge zwischen serologischen Eigenschaften, Kapselausbildung und Virulenz von *Haemophilus-parasuis*-Stämmen, *Mh. Vet.-Med.* (1991) 46:137-142.
- [54] Kirkwood R.N., Rawluk S.A., Cegielski A.C., Otto A.J., Effect of pig age and autogenous sow vaccination on nasal mucosal colonization of pigs by *Haemophilus parasuis*, *J. Swine. Health. Prod.* (2001) 9:77-79.
- [55] Krieg N.R., Holt J.G., *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Williams & Wilkins, Baltimore, USA (1984) p. 568.
- [56] Kuckleburg C.J., McClenahan D.J., Czuprynski C.J., Platelet activation by *Histophilus somni* and its lipooligosaccharide induces endothelial cell proinflammatory responses and platelet internalization, *Shock* (2008) 29:189-196.

- [57] Kuckleburg C.J., Sylte M.J., Inzana T.J., Corbeil L.B., Darien B.J., Czuprynski C.J., Bovine platelets activated by *Haemophilus somnus* and its LOS induce apoptosis in bovine endothelial cells, *Microb Pathog* (2005) 38:23-32.
- [58] Langford P.R., Szabo M., Moxon E.R., In vitro cytotoxicity of *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharides for bovine aortal endothelial cells, *FEMS Microbiol Lett* (1991) 65:161-164.
- [59] Lichtensteiger C.A., Vimr E.R., Neuraminidase (sialidase) activity of *Haemophilus parasuis*, *FEMS Microbiol Lett* (1997) 152:269-274.
- [60] Lindemann R.A., Economou J.S., Rothermel H., Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human peripheral monocytes activated by periodontal bacteria and extracted lipopolysaccharides, *J Dent Res* (1988) 67:1131-1135.
- [61] MacInnes J.I., Borr J.D., The family *Pasteurellaceae*: modern approaches to taxonomy, *Can J Vet Res* (1990) 54 Suppl:S6-11.
- [62] MacInnes J.I., Desrosiers R., Agents of the "suis-ide diseases" of swine: *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, and *Streptococcus suis*, *Can J Vet Res* (1999) 63:83-89.
- [63] Malazdrewich C., Thumbikat P., Abrahamsen M.S., Maheswaran S.K., Pharmacological inhibition of *Mannheimia haemolytica* lipopolysaccharide and leukotoxin-induced cytokine expression in bovine alveolar macrophages, *Microb Pathog* (2004) 36:159-169.
- [64] McClenahan D., Hellenbrand K., Atapattu D., Aulik N., Carlton D., Kapur A., Czuprynski C., Effects of lipopolysaccharide and *Mannheimia haemolytica* leukotoxin on bovine lung microvascular endothelial cells and alveolar epithelial cells, *Clin Vaccine Immunol* (2007).

- [65] McVicker J.K., Tabatabai L.B., Isolation and characterization of the P5 adhesin protein of *Haemophilus parasuis* serotype 5, Prep Biochem Biotechnol (2006) 36:363-374.
- [66] Melnikow E., Dornan S., Sargent C., Duszenko M., Evans G., Gunkel N., Selzer P.M., Ullrich H.J., Microarray analysis of *Haemophilus parasuis* gene expression under in vitro growth conditions mimicking the in vivo environment, Vet Microbiol (2005) 110:255-263.
- [67] Metcalf D.S., MacInnes J.I., Differential expression of *Haemophilus parasuis* genes in response to iron restriction and cerebrospinal fluid, Can J Vet Res (2007) 71:181-188.
- [68] Metkar S., Awasthi S., Denamur E., Kim K.S., Gangloff S.C., Teichberg S., Haziot A., Silver J., Goyert S.M., Role of CD14 in responses to clinical isolates of *Escherichia coli*: effects of K1 capsule expression, Infect Immun (2007).
- [69] Miniats O.P., Smart N.L., Ewert E., Vaccination of gnotobiotic primary specific pathogen-free pigs against *Haemophilus parasuis*, Can J Vet Res (1991) 55:33-36.
- [70] Miniats O.P., Smart N.L., Rosendal S., Cross protection among *Haemophilus parasuis* strains in immunized gnotobiotic pigs, Can J Vet Res (1991) 55:37-41.
- [71] Morikoshi T., Kobayashi K., Kamino T., Owaki S., Hayashi S., Hirano S., Characterization of *Haemophilus parasuis* isolated in Japan, Nippon Juigaku Zasshi (1990) 52:667-669.
- [72] Morozumi T., Nicolet J., Morphological variations of *Haemophilus parasuis* strains, J Clin Microbiol (1986) 23:138-142.

- [73] Morozumi T., Nicolet J., Some antigenic properties of *Haemophilus parasuis* and a proposal for serological classification, J Clin Microbiol (1986) 23:1022-1025.
- [74] Morton D.J., Williams P., Utilization of transferrin-bound iron by *Haemophilus* species of human and porcine origins, FEMS Microbiol Lett (1989) 53:123-127.
- [75] Munch S., Grund S., Kruger M., Fimbriae and membranes on *Haemophilus parasuis*, Zentralbl Veterinarmed B (1992) 39:59-64.
- [76] Nicolet J., Paroz P.H., Krawinkler M., Polyacrylamide gel electrophoresis of whole-cell proteins of porcine strains of *Haemophilus*, Int. J. Syst. Bacteriol. (1980) 30:69-76.
- [77] Nicolet J., Morozumi T., Bloch I., Porposal for a serological classification of *H. parasuis*, Proc. 9th Int. Pig. Vet. Soc. Congr. Barcelona, Spain (1986) 260.
- [78] Nielsen R., Pathogenicity and immunity studies of *Haemophilus parasuis* serotypes, Acta Vet Scand (1993) 34:193-198.
- [79] Nielsen R., Danielsen V., An outbreak of Glässer's disease. Studies on etiology, serology and the effect of vaccination, Nord Vet Med (1975) 27:20-25.
- [80] Nuñez G. B.M.A., Hu Y., Inohara N., Caspases: the proteases of the apoptotic pathway, Oncogene (1998) 17:3237-3245.
- [81] Ogikubo Y., Norimatsu M., Kojima A., Sasaki Y., Tamura Y., Biological activities of lipopolysaccharides extracted from porcine vaccine strains, J Vet Med Sci (1999) 61:1265-1269.

- [82] Oliveira S., Galina L., Pijoan C., Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections, *J Vet Diagn Invest* (2001) 13:495-501.
- [83] Oliveira S., Galina L., Blanco I., Canals A., Pijoan C., Naturally-farrowed, artificially-reared pigs as an alternative model for experimental infection by *Haemophilus parasuis*, *Can J Vet Res* (2003) 67:146-150.
- [84] Oliveira S., Pijoan C., *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control, *Vet Microbiol* (2004) 99:1-12.
- [85] Oscarsson J., Karched M., Thay B., Chen C., Asikainen S., Proinflammatory effect in whole blood by free soluble bacterial components released from planktonic and biofilm cells, *BMC Microbiol* (2008) 8:206.
- [86] Paradis S.E., Dubreuil J.D., Gottschalk M., Archambault M., Jacques M., Inhibition of adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract cells by monoclonal antibodies directed against LPS and partial characterization of the LPS receptors, *Curr Microbiol* (1999) 39:313-0320.
- [87] Patrick D., Betts J., Frey E.A., Prameya R., Dorovini-Zis K., Finlay B.B., *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide disrupts confluent monolayers of bovine brain endothelial cells via a serum-dependent cytotoxic pathway, *J Infect Dis* (1992) 165:865-872.
- [88] Peet R.L., Fry J., Lloyd J., Henderson J., Curran J., Moir D., *Haemophilus parasuis* septicaemia in pigs, *Aust Vet J* (1983) 60:187.
- [89] Rafiee M., Blackall P.J., Establishment, validation and use of the Kielstein-Rapp-Gabrielson serotyping scheme for *Haemophilus parasuis*, *Aust Vet J* (2000) 78:172-174.

- [90] Rapp-Gabrielson V.J., A. G.D., M. M.J., Phenotypic and genotypic diversity of *Haemophilus parasuis*, 12th Int. Congr. Pig Veterinary Society (IPVS). Proc. (1992) p. 334.
- [91] Rapp-Gabrielson V.J., Gabrielson D.A., Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine, Am J Vet Res (1992) 53:659-664.
- [92] Rapp-Gabrielson V.J., Gabrielson D.A., Schamber G.J., Comparative virulence of *Haemophilus parasuis* serovars 1 to 7 in guinea pigs, Am J Vet Res (1992) 53:987-994.
- [93] Rapp-Gabrielson V.J., J. K.G., T. C.J., K. M.S., *Haemophilus parasuis* : Immunity in swine after vaccination, Vet. Med. (1997) 83-90.
- [94] Rastogi D., Ratner A.J., Prince A., Host-bacterial interactions in the initiation of inflammation, Paediatr Respir Rev (2001) 2:245-252.
- [95] Riising H.J., Prevention of Glasser's disease through immunity to *Haemophilus parasuis*, Zentralbl Veterinarmed B (1981) 28:630-638.
- [96] Rosendal S., Frandsen P.L., Nielsen J.P., Gallily R., *Pasteurella multocida* toxin induces IL-6, but not IL-1 alpha or TNF alpha in fibroblasts, Can J Vet Res (1995) 59:154-156.
- [97] Rosner H., Kielstein P., Muller W., Rohrmann B., [Relationship between serotype, virulence and SDS-PAGE protein patterns of *Haemophilus parasuis*], Dtsch Tierarztl Wochenschr (1991) 98:327-330.
- [98] Rubies X., Kielstein P., Costa L., Riera P., Artigas C., Espuna E., Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars isolated in Spain from 1993 to 1997, Vet Microbiol (1999) 66:245-248.

- [99] Ruiz A., Oliveira S., Torremorell M., Pijoan C., Outer membrane proteins and DNA profiles in strains of *Haemophilus parasuis* recovered from systemic and respiratory sites, *J Clin Microbiol* (2001) 39:1757-1762.
- [100] Schimmel D., Kielstein P., Hass R., Zur serologische Typisierung von *Haemophilus parasuis*, *Arch. Exper. Vet. Med.* (1985) 39:944-947.
- [101] Segales J., Domingo M., Solano G.I., Pijoan C., Immunohistochemical detection of *Haemophilus parasuis* serovar 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of experimentally infected swine, *J Vet Diagn Invest* (1997) 9:237-243.
- [102] Segales J., Domingo M., Balasch M., Solano G.I., Pijoan C., Ultrastructural study of porcine alveolar macrophages infected in vitro with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus, with and without *Haemophilus parasuis*, *J Comp Pathol* (1998) 118:231-243.
- [103] Shenker B.J., Hoffmaster R.H., Zekavat A., Yamaguchi N., Lally E.T., Demuth D.R., Induction of apoptosis in human T cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin is a consequence of G2 arrest of the cell cycle., *J Immunol* (2001) 167:435-441.
- [104] Skerrett S.J., Liggitt H.D., Hajjar A.M., Ernst R.K., Miller S.I., Wilson C.B., Respiratory epithelial cells regulate lung inflammation in response to inhaled endotoxin, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2004) 287:L143-152.
- [105] Smart N.L., Miniats O.P., Preliminary assessment of a *Haemophilus parasuis* bacterin for use in specific pathogen free swine, *Can J Vet Res* (1989) 53:390-393.
- [106] Solano-Aguilar G.I., Pijoan C., Rapp-Gabrielson V., Collins J., Carvalho L.F., Winkelmann N., Protective role of maternal antibodies against *Haemophilus parasuis* infection, *Am J Vet Res* (1999) 60:81-87.

- [107] St Geme J.W., 3rd, Molecular and cellular determinants of non-typeable *Haemophilus influenzae* adherence and invasion, *Cell Microbiol* (2002) 4:191-200.
- [108] Stanimirovic D., Satoh K., Inflammatory mediators of cerebral endothelium: a role in ischemic brain inflammation, *Brain Pathol* (2000) 10:113-126.
- [109] Suzuki T., Kobayashi M., Isatsu K., Nishihara T., Aiuchi T., Nakaya K., Hasegawa K., Mechanisms involved in apoptosis of human macrophages induced by lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the presence of cycloheximide., *Infect Immun* (2004) 72:1856-1865.
- [110] Svanborg C., Godaly G., Hedlund M., Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence, *Curr Opin Microbiol* (1999) 2:99-105.
- [111] Swords W.E., Buscher B.A., Ver Steeg li K., Preston A., Nichols W.A., Weiser J.N., Gibson B.W., Apicella M.A., Non-typeable *Haemophilus influenzae* adhere to and invade human bronchial epithelial cells via an interaction of lipooligosaccharide with the PAF receptor, *Mol Microbiol* (2000) 37:13-27.
- [112] Sylte M.J., Corbeil L.B., Inzana T.J., Czuprynski C.J., *Haemophilus somnus* induces apoptosis in bovine endothelial cells in vitro, *Infect Immun* (2001) 69:1650-1660.
- [113] Sylte M.J., Leite F.P., Kuckleburg C.J., Inzana T.J., Czuprynski C.J., Caspase activation during *Haemophilus somnus* lipooligosaccharide-mediated apoptosis of bovine endothelial cells, *Microb Pathog* (2003) 35:285-291.

- [114] Tadjine M., Mittal K.R., Bourdon S., Gottschalk M., Development of a new serological test for serotyping *Haemophilus parasuis* isolates and determination of their prevalence in North America, *J Clin Microbiol* (2004) 42:839-840.
- [115] Tadjine M., Mittal K.R., Bourdon S., Gottschalk M., Production and characterization of murine monoclonal antibodies against *Haemophilus parasuis* and study of their protective role in mice, *Microbiology* (2004) 150:3935-3945.
- [116] Takahashi K., Naga S., Yagihashi T., Ikehata T., Nakano Y., Senna K., Maruyama T., Murofushi J., A cross-protection experiment in pigs vaccinated with *Haemophilus parasuis* serovars 2 and 5 bacterins, and evaluation of a bivalent vaccine under laboratory and field conditions, *J Vet Med Sci* (2001) 63:487-491.
- [117] Tani Y., Tani M., Kato I., Extracellular 37-kDa antigenic protein from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* induces TNF-alpha, IL-1 beta, and IL-6 in murine macrophages, *J Dent Res* (1997) 76:1538-1547.
- [118] Thornberry N.A., Caspases: key mediators of apoptosis, *Chem Biol* (1998) 5:R97-103.
- [119] Thornberry N.A., Lazebnik Y., Caspases: enemies within, *Science* (1998) 281:1312-1316.
- [120] Tunkel A.R., Rosser S.W., Hansen E.J., Scheld W.M., Blood-brain barrier alterations in bacterial meningitis: development of an *in vitro* model and observations on the effects of lipopolysaccharide, *In Vitro Cell Dev Biol* (1991) 27 A:113-120.
- [121] Tunkel A.R., Scheld W.M., Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis, *Annu Rev Med* (1993) 44:103-120.

- [122] Turni C., Blackall P.J., Comparison of the indirect haemagglutination and gel diffusion test for serotyping *Haemophilus parasuis*, *Vet Microbiol* (2005) 106:145-151.
- [123] Vahle J.L., Haynes J.S., Andrews J.J., Experimental reproduction of *Haemophilus parasuis* infection in swine: clinical, bacteriological, and morphologic findings, *J Vet Diagn Invest* (1995) 7:476-480.
- [124] Vahle J.L., Haynes J.S., Andrews J.J., Interaction of *Haemophilus parasuis* with nasal and tracheal mucosa following intranasal inoculation of cesarean derived colostrum deprived (CDCD) swine, *Can J Vet Res* (1997) 61:200-206.
- [125] Van Amersfoort E.S., Van Berkel T.J., Kuiper J., Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock, *Clin Microbiol Rev* (2003) 16:379-414.
- [126] van der Flier M., Geelen S.P., Kimpen J.L., Hoepelman I.M., Tuomanen E.I., Reprogramming the host response in bacterial meningitis: how best to improve outcome?, *Clin Microbiol Rev* (2003) 16:415-429.
- [127] Vanier G., Szczotka A., Friedl P., Lacouture S., Jacques M., Gottschalk M., *Haemophilus parasuis* invades porcine brain microvascular endothelial cells, *Microbiology* (2006) 152:135-142.
- [128] Verma S., Nakaoka R., Dohgu S., Banks W.A., Release of cytokines by brain endothelial cells: A polarized response to lipopolysaccharide, *Brain Behav Immun* (2006) 20:449-455.
- [129] Wang B., Cleary P.P., Xu H., Li J.D., Up-regulation of interleukin-8 by novel small cytoplasmic molecules of nontypeable *Haemophilus influenzae* via

p38 and extracellular signal-regulated kinase pathways, *Infect Immun* (2003) 71:5523-5530.

- [130] Weinrauch Y., Zychlinsky A., The induction of apoptosis by bacterial pathogens, *Annu Rev Microbiol* (1999) 53:155-187.
- [131] Wilson M., Seymour R., Henderson B., Bacterial perturbation of cytokine networks, *Infect Immun* (1998) 66:2401-2409.
- [132] Wising C., Azem J., Zetterberg M., Svensson L.A., Ahlman K., Lagergard T., Induction of apoptosis/necrosis in various human cell lineages by *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin, *Toxicon* (2005) 45:767-776.
- [133] Wissing A., Nicolet J., Boerlin P., [The current antimicrobial resistance situation in Swiss veterinary medicine], *Schweiz Arch Tierheilkd* (2001) 143:503-510.
- [134] Yang Y.F., Sylte M.J., Czuprynski C.J., Apoptosis: a possible tactic of *Haemophilus somnus* for evasion of killing by bovine neutrophils?, *Microb Pathog* (1998) 24:351-359.
- [135] Zaretzky F.R., Kawula T.H., Examination of early interactions between *Haemophilus ducreyi* and host cells by using cocultured HaCaT keratinocytes and foreskin fibroblasts, *Infect Immun* (1999) 67:5352-5360.
- [136] Zucher B., Kruger M., Rehak E., Horsch F., The lipopolysaccharide structure of *Haemophilus parasuis* strains in SDS-PAGE, *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* (1994) 107:78-81.