

MARIE-EVE CHAMPAGNE

**RÉ-INFECTIONS AVEC *STREPTOCOCCUS  
PNEUMONIAE* : EFFET SUR LES RÉPONSES  
IMMUNES INNÉE ET ACQUISE LORS D'UNE  
PNEUMONIE À PNEUMOCOQUE**

Mémoire présenté  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de maîtrise en Microbiologie-Immunologie  
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE MÉDICALE  
FACULTÉ DE MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2007

## Résumé

L'invasion des voies respiratoires par *Streptococcus pneumoniae* engendre une réponse immunitaire complexe. Les événements microbiologiques et inflammatoires qui caractérisent le développement d'une pneumonie à pneumocoque chez la souris ont été évalués par plusieurs groupes de recherche. Or, il existe encore des lacunes dans la compréhension de l'orchestration de la défense de l'hôte contre le pneumocoque, au niveau de l'immunité innée et acquise. Le but de ce projet était d'étudier l'effet de l'immunité acquise développée après une primo-infection sur l'efficacité de la réponse immune précoce et tardive après une ré-infection. Nous avons démontré que la réponse immunitaire induite après la ré-infection était plus efficace et plus rapide et ce, en dépit d'une diminution du recrutement des neutrophiles aux poumons et de production de chimiokines. Un recrutement plus important de cellules T CD4+ aux poumons et une augmentation de production d'IgG anti-pneumococcique semble avoir contribué à l'amélioration de la réponse immune.

## **Avant-Propos**

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans la coopération avec les diverses personnes qui m'ont côtoyée pendant ces deux dernières années. Je profite de cette occasion pour remercier chaleureusement les gens qui m'ont encouragé et appuyé tant au niveau technique, scientifique que moral.

Je remercie tout d'abord Dr Michel G. Bergeron, mon directeur de maîtrise, de m'avoir donné la chance de réaliser ma maîtrise dans un milieu aussi enrichissant qu'est le centre de recherche en infectiologie.

Également, je tiens à remercier mes coéquipiers Marie-Christine Dumas et Jean-François Gauthier non seulement pour leur aide technique précieuse, mais aussi pour leur amitié. Merci de m'avoir permis de partager plusieurs moments heureux avec vous et de m'avoir supportée pendant les obstacles.

Finalement, je tiens à souligner l'importance de l'implication d'Yves Bergeron et d'Andrée Fortin dans ce travail. Je suis très reconnaissante des conseils et de l'encadrement que vous m'avez donnés et qui m'ont permis de rendre à terme ce projet.

# Table des matières

<b>Résumé .....</b>	<b>i</b>
<b>Avant-Propos .....</b>	<b>ii</b>
<b>Table des matières .....</b>	<b>iii</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>v</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>vi</b>
<b>CHAPITRE I Revue de littérature .....</b>	<b>vii</b>
<b>1.1. La pneumonie à pneumocoque.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1.1. Historique.....</b>	<b>8</b>
1.1.1.1. La microbiologie... d'hier à aujourd'hui .....	8
1.1.1.2. Les maladies infectieuses .....	9
<b>1.1.2. Le pneumocoque .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1.3. Facteurs de virulence .....</b>	<b>10</b>
<b>1.1.4. La pathogenèse.....</b>	<b>12</b>
<b>1.2. Immunologie : réponse de l'hôte .....</b>	<b>14</b>
<b>1.2.1. Cellules immunes .....</b>	<b>14</b>
1.2.1.1. Les neutrophiles .....	14
1.2.1.2. Monocytes et macrophages .....	15
1.2.1.3. Lymphocytes .....	17
<b>1.2.2. Système immunitaire : immunité naturelle et acquise .....</b>	<b>21</b>
1.2.2.1. Immunité naturelle .....	21
1.2.2.2. Immunité acquise .....	22
<b>1.3. Médiateurs solubles de l'inflammation.....</b>	<b>25</b>
<b>1.3.1 Le complément.....</b>	<b>25</b>
<b>1.3.2. Médiateurs lipidiques .....</b>	<b>26</b>
1.3.2.1 Les prostaglandines.....	26
1.3.2.2. Les leucotriènes .....	27
1.3.2.3. Le facteur d'activation plaquettaire (PAF).....	27
<b>1.3.3. Médiateurs protéiques : les cytokines .....</b>	<b>27</b>
1.3.3.1. Interféron-gamma .....	28
1.3.3.2. Facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ) .....	28
1.3.3.3. Interleukine-4.....	29
1.3.3.4. Interleukine-10.....	29
1.3.3.5. Interleukine-12.....	29
<b>1.3.4. Médiateurs protéiques : les chimiokines.....</b>	<b>30</b>
1.3.4.1. Protéine inflammatoire du macrophage 2 (MIP-2).....	30
1.3.4.2. TARC .....	30

1.3.4.3. Protéine-10-inductible par l'interferon-gamma (IP-10).....	31
1.3.4.4. Protéine chimioattractive des monocytes-1 (MCP-1).....	31
<b>1.3.5. Les radicaux oxygène.....</b>	<b>31</b>
<b>1.3.6. Le monoxyde d'azote.....</b>	<b>32</b>
<b>1.4. Prophylaxie et traitement de la pneumonie à pneumocoque.....</b>	<b>33</b>
1.4.1 Les vaccins.....	33
1.4.2. Les antibiotiques.....	33
1.4.3. Les immunomodulateurs.....	34
<b>CHAPITRE II Introduction à la deuxième partie.....</b>	<b>36</b>
2.1. Hypothèse et objectifs.....	37
<b>Chapitre III Interaction de l'immunité innée et acquise lors de la réponse immunitaire pulmonaire à la suite d'une ré-infection avec <i>Streptococcus pneumoniae</i>.....</b>	<b>39</b>
3.1. Résumé.....	40
3.2. Abstract.....	42
3.3. Introduction.....	43
3.4. Material and methods.....	46
3.5. Results.....	52
3.6. Discussion.....	56
3.7. Acknowledgments.....	61
3.8. References.....	62
3.9. Figure legends.....	68
3.10. Figures.....	71
<b>CHAPITRE IV Conclusion.....</b>	<b>79</b>
<b>CHAPITRE V Références.....</b>	<b>85</b>

# Liste des figures

## CHAPITRE I Revue de littérature

Figure 1. Immunité acquise médiée par les cellules T helper.....20

## CHAPITRE III Interaction de l'immunité innée et acquise lors de la réponse immunitaire pulmonaire à la suite d'une ré-infection avec *Streptococcus pneumoniae*

Figure 1. Protocole expérimental.....71

Figure 2. Concentration bactérienne dans le tissu pulmonaire.....72

Figure 3. Concentration des leucocytes dans le lavage broncho-alvéolaire.....73

Figure 4. Concentration lymphocytaire dans le lavage broncho-alvéolaire.....74

Figure 5. Niveaux de TNF-alpha, IL-12p40, IFN-gamma, MCP-1, MIP-2 et IL-10 dans le tissu pulmonaire à des temps précoces.....75

Figure 6. Niveaux de TNF-alpha, IL-12p40, IFN-gamma, MCP-1, MIP-2 et IL-10 dans le tissu pulmonaire à des temps tardifs.....76

Figure 7. Niveaux sériques d'anticorps IgG spécifiques au *S.pneumoniae*.....77

Figure 8. Microscopie électronique du tissu pulmonaire.....78

## Liste des abréviations

AM	«alveolar macrophage» (macrophage alvéolaire)
CbpA	protéine pneumococcique A
CTX	ceftriaxone
UFC	unité formatrice de colonie
C5a	fragment du complément C5a
ELISA	«Enzyme-linked immunosorbent assay»
G-CSF	«Granulocyte colony-stimulating factor»
GM-CSF	«Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor»
IFN	interféron
IL	interleukine
IP-10	«Interferon_γ-induced protein-10»
LBA/BAL	«bronchoalveolar lavage» (lavage bronchoalvéolaire)
MCP	protéine chimioattractante du monocyte ( <i>monocyte chemoattractant protein</i> )
MIP	protéine inflammatoire du macrophage ( <i>macrophage inflammatory protein</i> )
NO	oxyde nitrique
PAF	platelet-activating factor
PAMPS	antigènes de surface communs non-spécifiques
PBS	tampon phosphate-saline ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
PMN	polymorphonucléaire
SEM	erreur standard à la moyenne
TARC	«Thymus and activated related chemokine»
TNF	facteur de nécrose tumorale ( <i>tumor necrosis factor</i> )

## **CHAPITRE I Revue de littérature**

# **1.1. La pneumonie à pneumocoque**

## **1.1.1. Historique**

### **1.1.1.1. La microbiologie... d'hier à aujourd'hui**

On ne peut que souligner l'importance de la microbiologie dans la vie quotidienne. Les micro-organismes apportent de nombreux avantages à la société. Ils sont importants dans la fabrication de plusieurs produits alimentaires, des antibiotiques, des vaccins et ils sont utiles à la santé humaine, animale et végétale de même qu'à l'équilibre environnemental, humanitaire et sociétaire. Par contre, les microbes causent également des problèmes depuis le début des temps. Les maladies infectieuses ont joué assurément un rôle majeur dans certains événements historiques. Par exemple, en l'an 1347, la peste frappa l'Europe et la décima du tiers de sa population, soit à peu près 25 millions de personnes (26). Pendant les 80 années qui suivirent, la maladie sévit et tua encore 75% de la population. Selon des historiens, cet événement changea la culture européenne et ouvrit la porte à la Renaissance.

Avant même la découverte des micro-organismes, des chercheurs tels que le philosophe romain Lucrèce (98-55 av. J-C) suspectaient l'existence et le rôle de ceux-ci dans diverses maladies. Toutefois, la première démonstration directe du rôle des bactéries dans l'étiologie des maladies revient à Louis Pasteur (1822-1895). En 1861, celui-ci fut également la première personne à démontrer que les micro-organismes ne provenaient pas d'une génération spontanée (26). À partir de ce temps, plusieurs autres microbiologistes avancèrent les connaissances touchant les maladies infectieuses. Entre autres, l'allemand Robert Koch élaborait les critères pour établir les relations causales entre un micro-organisme et une maladie spécifique mieux connues sous le nom de postulats de Koch (26).

En 1929, Alexander Fleming découvre la pénicilline et ses propriétés bactéricides, ouvrant ainsi la voie au traitement des maladies infectieuses par les antibiotiques. Elle

sera utilisée pour la première fois en 1941 pour traiter un patient atteint d'une septicémie à staphylocoque (26).

Bien qu'il y ait eu des progrès spectaculaires dans les domaines de la microbiologie, de l'immunologie, de la biologie moléculaire, dans l'amélioration des techniques de diagnostic, en épidémiologie, dans l'hygiène et la médecine préventive, les maladies infectieuses prévalent encore dans les pays en voie de développement et même dans les pays industrialisés (26).

### 1.1.1.2. Les maladies infectieuses

Grippe, hépatites, sida, tuberculose, paludisme... Annuellement, les maladies infectieuses induisent plus du tiers des décès à l'échelle mondiale. À travers le monde, les infections aiguës des voies respiratoires inférieures constituent la cause la plus courante de décès attribuable à un microbe. Par ailleurs, le germe *Streptococcus pneumoniae* est responsable d'environ 30% de tous les cas de pneumonie extra-hospitalière (15). Dans les pays en voie de développement, au moins un million d'enfants meurent chaque année de la pneumonie à pneumocoque avant l'âge de cinq ans. L'incidence annuelle de bactériémie due au pneumocoque en Amérique du Nord et en Europe est d'environ 10-20 par 100 000 habitants. En plus de causer la pneumonie, *S. pneumoniae* est également le plus important pathogène responsable de la méningite bactérienne, de l'otite et de la sinusite (16).

### 1.1.2. Le pneumocoque

Le *Streptococcus pneumoniae* est aussi appelé pneumocoque dans le langage médical, faisant référence à sa morphologie et à sa grande incidence comme agent causal de la pneumonie. Cette bactérie en forme de coques appariées (diplocoques) est Gram-positif, ne forme pas de spore et est non-mobile. On la cultive à 37°C dans un environnement contenant 5% de dioxyde de carbone sur un milieu possédant une source de catalase

(comme le sang) afin de neutraliser la grande quantité de peroxyde d'hydrogène qu'elle produit. Puisqu'elle est aéro-tolérante, on peut la soumettre à des conditions aérobies pour la faire croître. Dans ces conditions, on peut observer l'hémolyse alpha qu'elle produit sur gélose sang.

Le *S. pneumoniae* est une bactérie fragile puisqu'elle contient une enzyme appelée autolysine qui peut désintégrer la cellule. Cette enzyme est normalement inactive mais lorsque la biosynthèse intracellulaire arrête par manque de nutriments ou à la suite d'un traitement à la pénicilline, l'enzyme est alors activée et cause la lyse de toute la population bactérienne (22). À des conditions optimales, l'autolysine s'active entre 18 et 24 heures après l'initiation de la croissance bactérienne, lorsque la croissance en est à la phase stationnaire et qu'il n'y a plus de multiplication bactérienne.

Le pneumocoque est enveloppé d'une capsule composée de polysaccharides. Quarante-dix différentes capsules ont été identifiées à ce jour chez le *S. pneumoniae*. Cette structure confère un avantage protecteur au pneumocoque puisqu'elle prévient l'opsonisation par le complément et la phagocytose par les leucocytes. Quant à la paroi cellulaire, elle est composée de peptidoglycan et d'acide teichoïque. L'acide lipoteichoïque contient de la phosphorylcholine, ce qui constitue un élément important dans la biologie du *S. pneumoniae* puisque la choline adhère spécifiquement à des récepteurs localisés pratiquement sur toutes les cellules humaines, favorisant ainsi le potentiel invasif du germe (33).

### 1.1.3. Facteurs de virulence

Le pneumocoque possède plusieurs facteurs de virulence capables de jouer un rôle-clé dans la pathogenèse de la pneumonie. Les plus connus sont la capsule polysaccharidique, le complexe peptidoglycan/ acide teichoïque, la protéine pneumococcique de surface A, l'adhésine pneumococcique de surface A, la pneumolysine, l'autolysine, la neuraminidase et la hyaluronidase.

La capsule est le facteur de virulence le plus important, car elle protège la bactérie contre l'ingestion par les phagocytes. En fait, cette résistance serait due à l'interférence de la liaison du fragment C3b du complément à la surface cellulaire. Même s'il a déjà été prouvé que la capsule est non-toxique, il reste que dans l'invasion de la surface mucoale, les souches encapsulées sont 100 000 fois plus virulentes que les souches qui ne possèdent pas de capsule (33). La réponse humorale est cruciale pour la défense contre les infections à pneumocoque. En effet, la liaison d'anticorps anti-capsulaires spécifiques change la structure de la surface cellulaire et facilite la phagocytose (16). Les déterminants antigéniques des polysaccharides de la capsule ont été utilisés pour identifier 90 différents sérotypes de *Streptococcus pneumoniae*. Par contre, seulement 23 de ces sérotypes induisent plus de 90% des cas de pneumonies (4).

Certains composés de la paroi cellulaire font également partie des facteurs de virulence du *S. pneumoniae*. Tel que mentionné auparavant, la phosphorylcholine de l'acide teichoïque et de l'acide lipoteichoïque est une molécule clé de l'invasion en jouant le rôle d'adhésine. De plus, le complexe peptidoglycan/acide teichoïque stimule la sécrétion du facteur de nécrose tumorale-alpha (TNF- $\alpha$ ), d'interleukine-1 et d'oxyde nitrique en plus de contribuer à l'œdème pulmonaire (4). Aussi, la protéine pneumococcique de surface A lie la lactoferrine et inhibe l'activation du complément par le pneumocoque (22). Ce dernier contient également de l'adhésine pneumococcique A, laquelle permet l'adhérence de la bactérie aux pneumocytes de type II du parenchyme pulmonaire.

Quant à la pneumolysine, il s'agit d'une protéine intracellulaire retrouvée dans tous les sérotypes de pneumocoque. Elle est relâchée lors de la lyse bactérienne et peut créer des pores transmembranaires dans les couches bi-lipidiques de pratiquement tous les types cellulaires pulmonaires. La pneumolysine stimule la sécrétion de TNF, d'IL-1 et reproduit les caractéristiques histologiques de la pneumonie lorsque injectée dans les poumons chez les modèles animaux (4).

Le *Streptococcus pneumoniae* contient aussi l'autolysine, une enzyme se situant au niveau de sa paroi cellulaire. L'autolysine fait partie des facteurs de virulence puisqu'en induisant la lyse des bactéries, elle permet la libération de produits dégradés de la paroi cellulaire, incluant le peptidoglycan et l'acide teichoïque. Ces débris cellulaires causent l'inflammation. De plus, l'autolysine permet le relâchement de constituants intracellulaires incluant des toxines comme la pneumolysine (22). La neuraminidase et l'hyaluronidase sont également deux autres enzymes jouant un rôle dans la pathogenèse de l'infection à pneumocoque. Elles contribuent à la colonisation et à la bactériémie en altérant, respectivement, les acides sialiques et hyaluroniques chez les cellules hôtes (4).

#### 1.1.4. La pathogenèse

Le *S. pneumoniae* se retrouve normalement dans les voies respiratoires supérieures des humains. En fait, la colonisation du nasopharynx par cette bactérie se produit approximativement chez 40% de la population. Le pneumocoque adhère à l'épithélium du nasopharynx, ce qui entrave chez la plupart des gens une réponse immunitaire à médiation spécifique, tel qu'il sera discuté plus loin (33). Cette colonisation du nasopharynx facilite la dissémination de ce pathogène dans la communauté. Généralement, les porteurs sains bénéficient d'une colonisation asymptomatique, mais dans certains cas, l'invasion des poumons cause une pneumonie.

La colonisation par le *S. pneumoniae* requiert son adhérence préalable aux hydrates de carbone de la surface cellulaire de l'épithélium. Cette adhérence se fait via les protéines ancrées à la paroi cellulaire du pneumocoque, telle que l'adhésine A. La conversion de la colonisation asymptomatique à la maladie requiert la sécrétion d'agents inflammatoires tels que l'IL-1 et le TNF. La cascade inflammatoire change le type et le nombre de récepteurs à la surface des cellules épithéliales et endothéliales. Le pneumocoque, grâce à la phosphorylcholine, montre une plus grande affinité pour un des récepteurs, celui du facteur d'agrégation plaquettaire (PAF). La liaison à ce récepteur permet son internalisation et la migration transcellulaire au niveau de l'épithélium respiratoire et de l'endothélium vasculaire. Également, la liaison au PAF

contribue à l'altération de la perméabilité vasculaire, ce qui favorise l'arrivée d'exsudat inflammatoire et l'infiltration leucocytaire (6).

De plus, la protéine pneumococcique A (CbpA) liant la choline montre une plus grande affinité pour l'acide sialique et le lacto-N-néotétraose retrouvé sur les cellules humaines activées. Le CbpA interagit avec les récepteurs de la famille des immunoglobulines, ce qui augmente la migration au travers de la barrière mucoale. Également, cette protéine se lie aux fragments du complément et aux immunoglobulines A, interférant ainsi avec la défense immunitaire (6).

La neuraminidase, une autre enzyme que possède le pneumocoque, joue un rôle dans la colonisation de ce microbe en clivant l'acide N-acétylneuraminique de la mucine, diminuant ainsi la viscosité du mucus. La neuraminidase est aussi reconnue pour cliver les glycolipides, les glycoprotéines et les oligosaccharides, permettant une meilleure disponibilité des récepteurs N-acétyl-glycosamine des cellules épithéliales humaines. La neuraminidase de virus comme l'influenza contribue ainsi à une adhérence plus efficace du pneumocoque lors d'infections virales (6).

En plus de posséder des protéines participant à son évasion dans le système respiratoire, le pneumocoque peut proliférer assez facilement et envahir l'hôte grâce à sa résistance à la phagocytose et donc à la l'élimination par les leucocytes. En fait, une fois que le pneumocoque pénètre dans l'espace alvéolaire, il est partiellement opsonisé et phagocyté par les macrophages alvéolaires déjà sur place. Si la population bactérienne est trop grande pour que ces macrophages puissent éliminer les pathogènes, ils pourront sécréter des chimiokines pro-inflammatoires pour attirer les neutrophiles. Ces derniers aideront les macrophages grâce à leur capacité à phagocyter et vont participer à l'inflammation (28). De plus, les composantes de la paroi cellulaire activent plusieurs cascades de l'inflammation comme la voie alternative du complément, le réseau de cytokines et de chimiokines et la cascade de la coagulation (33). L'infiltration neutrophilique est provoquée par certaines cytokines (TNF, IL-6, IL-1) ainsi que par le fragment C5a du complément que la pneumolysine et les polysaccharides

pneumococciques activent. La réaction inflammatoire qui s'ensuit favorise l'élimination des pathogènes qui se sont infiltrés. Par contre, une fois qu'elle est enclenchée, cette dernière peut causer, de concert avec l'action cytolytique de la pneumolysine, des dommages alvéolaires et de l'œdème interstitiel. Lorsqu'elle survient, les bactéries peuvent quitter les alvéoles et progresser vers la circulation sanguine, créant ainsi la septicémie. Ce sont les changements à la barrière alvéolo-capillaire, créés par la pneumolysine, qui facilitent cette invasion. Toutefois, il est possible que le pneumocoque soit éliminé avant qu'une bactériémie soit induite (par les cellules immunitaires qui arrivent aux poumons ou bien par un antibiotique), restreignant ainsi l'infection et le risque de morbidité et de mortalité (11).

Habituellement, l'immunité cellulaire et humorale agissent ensemble et sont capables de défendre l'hôte contre les infections telle que celles causées par le pneumocoque. Ce sont les diverses composantes de ces réponses immunitaires que nous décrirons maintenant.

## **1.2. Immunologie : réponse de l'hôte**

### **1.2.1. Cellules immunes**

#### **1.2.1.1. Les neutrophiles**

Les leucocytes polymorphonucléaires (PMNs), parmi lesquels on compte les neutrophiles, sont d'importants phagocytes intravasculaires. Ces cellules possèdent un noyau polylobé et des granules neutrophiles. De plus, ils sont essentiels à la défense de l'hôte contre différentes espèces bactériennes. Ces phagocytes patrouillent la circulation périphérique et migrent rapidement aux tissus infectés en réponse à divers stimuli inflammatoires. Chez un individu normal, seulement quelques neutrophiles peuvent être observés dans l'espace pulmonaire, car ces cellules sont normalement absentes des tissus sains. Toutefois, ils

constituent la classe la plus importante de leucocytes dans le sang périphérique humain. La vascularisation parcourant le poumon est très riche en PMNs. En effet, cette région regroupe près de 40% de tous les PMNs du corps humain. Lors d'infections pulmonaires, les neutrophiles sont dès lors rapidement recrutés dans les alvéoles pour renforcer la défense immunitaire assurée par les macrophages alvéolaires. Ces PMNs sont activés grâce à la stimulation par différentes cytokines pro-inflammatoires et d'autres médiateurs relâchés dans les tissus infectés, tels le G-CSF, le TNF- $\alpha$ , l'IL-8 et le MIP-2.

L'activité phagocytaire des neutrophiles est plus efficace que celle des macrophages. Les micro-organismes ingérés sont détruits à la suite de la fusion phagolysosomale. Le contact des granules azurophiles avec le phagolysosome ainsi créé permet l'activation de la myeloperoxydase, laquelle catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène et du chlore pour former l'oxydant HOCl. Ce dernier réagit avec les amines primaires et génère des chloramines très toxiques. Ces substances sont de puissants agents antimicrobiens. Également, les granules azurophiles contiennent plusieurs autres facteurs microbicides tels que le lysozyme qui peut digérer le peptidoglycan de la paroi cellulaire de la plupart des bactéries, les défensines et des protéases. En plus de participer activement à l'élimination des micro-organismes par la phagocytose, les PMNs participent à la régulation de l'immunité par la sécrétion de médiateurs inflammatoires incluant le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-8, le MIP-2, le GM-CSF et le G-CSF (31, 35).

Les neutrophiles vivent peu longtemps, car ils meurent rapidement après avoir accompli un cycle de phagocytose. Les neutrophiles nécrosés sont les composantes majeures du pus, qui se forme lors de certaines infections.

### **1.2.1.2. Monocytes et macrophages**

Même si les neutrophiles constituent une classe de cellules essentielles pour la phagocytose, les microbes qui traversent une barrière épithéliale et commencent à se multiplier dans les tissus sont d'abord reconnus par des phagocytes mononucléaires ou macrophages locaux. Les macrophages sont de grandes cellules phagocytaires,

mononucléaires, importantes dans l'immunité innée (non-spécifique) en tant que cellules présentatrices d'antigène. Ils servent également de cellules effectrices lors de l'activation de l'immunité humorale ou cellulaire. Ils se trouvent dans la plupart des tissus de l'organisme et sont dérivés des monocytes. En fait, les macrophages viennent à maturité de manière continue à partir des monocytes qui quittent la circulation et migrent dans différents tissus. Ils sont présents en nombre important particulièrement dans les tissus conjonctifs associés au tractus gastro-intestinal, dans les poumons (où ils se retrouvent à la fois dans le tissu interstitiel et les alvéoles), le long de certains vaisseaux sanguins du foie (dans lesquels ils se nomment alors cellules de Kupffer), et dispersés dans la rate, où ils éliminent les vieilles cellules sanguines (13).

Les macrophages, tout comme les neutrophiles, reconnaissent les pathogènes au moyen de leurs récepteurs intrinsèques qui distinguent les récepteurs de surface des pathogènes de ceux de l'hôte. Ces récepteurs incluent le récepteur du mannose, présent sur les macrophages mais absent des neutrophiles et des monocytes, les récepteurs éboueurs ou «scavengers», qui fixent les ligands anioniques, et le CD14, un récepteur de lipopolysaccharides bactériens retrouvé surtout sur les monocytes et les macrophages. Les macrophages peuvent également interagir avec les pathogènes grâce au système du complément que nous décrirons un peu plus loin (13).

Tout comme les neutrophiles, les macrophages contiennent des granules appelés lysosomes. Ces derniers sont riches en enzymes et en protéines (ou peptides) participant à la réponse antimicrobienne intracellulaire. Les pathogènes sont éliminés après la fusion du phagosome avec un ou plusieurs lysosomes. Comme le font les PMNs, les macrophages produisent aussi une variété de produits toxiques qui aident à tuer les micro-organismes capturés. Par exemple, il y a le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), et l'oxyde nitrique (NO) (13).

Les macrophages participent à l'immunité pulmonaire par leur activité phagocytaire et leur fonction microbicide, mais également par la sécrétion de divers médiateurs inflammatoires. Par exemple, les macrophages alvéolaires sécrètent des métabolites de l'acide

arachidonique comme le leucotriène B<sub>4</sub>, des peptides chimiotactiques tels que l'IL-8, la protéine inflammatoire du macrophage 2 (MIP-2) et d'autres chimiokines. Toutes ces substances induisent la migration des neutrophiles aux poumons. De plus, les macrophages alvéolaires communiquent avec les autres cellules de l'immunité innée afin d'amorcer une défense immune bien organisée. Pour ce faire, ils produisent des cytokines telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-10, l'IL-12, l'interferon et le G-CSF qui jouent toutes un rôle important dans la défense de l'hôte au niveau des poumons (35).

### 1.2.1.3. Lymphocytes

Les macrophages et les neutrophiles font partie du système de défense appelé immunité innée dont il sera question un peu plus loin. Ils sont efficaces contre de nombreux pathogènes dont ils reconnaissent des antigènes de surface communs non-spécifiques (nommés PAMPS) que possèdent particulièrement les bactéries à développement extracellulaire causant des infections aiguës. Toutefois, cette efficacité est limitée lorsque l'infection est fulgurante, ou causée par des bactéries encapsulées, ou encore des micro-organismes à développement intracellulaire (virus, parasites) causant des infections chroniques et possédant des antigènes de surface autres que les PAMPS. Ces micro-organismes contournent ainsi l'immunité innée. Dans ce cas, des cellules dendritiques (cellules phagocytaires peu nombreuses résidant dans la plupart des tissus et ayant comme rôle de surveiller l'environnement local vis-à-vis des pathogènes) peuvent être alertées par ces types de pathogènes, migrer aux ganglions lymphatiques et présenter des antigènes microbiens aux lymphocytes T afin d'activer une réponse lymphocytaire spécifique.

Il existe deux types principaux de lymphocytes : les lymphocytes B, qui une fois activés se différencient en plasmocytes sécrétant des anticorps (induisant la réponse dite humorale), et les lymphocytes T qui se différencient en deux classes majeures distinguées par leurs antigènes de surface («clusters of differentiation»), les CD4 et les CD8 (qui induisent la réponse immunitaire dite cellulaire). Les lymphocytes ne deviennent fonctionnels qu'après leur rencontre avec l'antigène. Cette étape est nécessaire pour leur prolifération et l'exercice de leurs rôles. Les lymphocytes se caractérisent par leur capacité à répondre de

manière spécifique à n'importe quel antigène étranger. Effectivement, chaque lymphocyte se différencie individuellement et possède un variant unique d'un récepteur à un antigène. De cette façon, l'ensemble de la population des lymphocytes T et B présente un vaste répertoire de récepteurs hautement diversifiés, capables de reconnaître au moins quelques peptides générés à partir de presque tous les pathogènes.

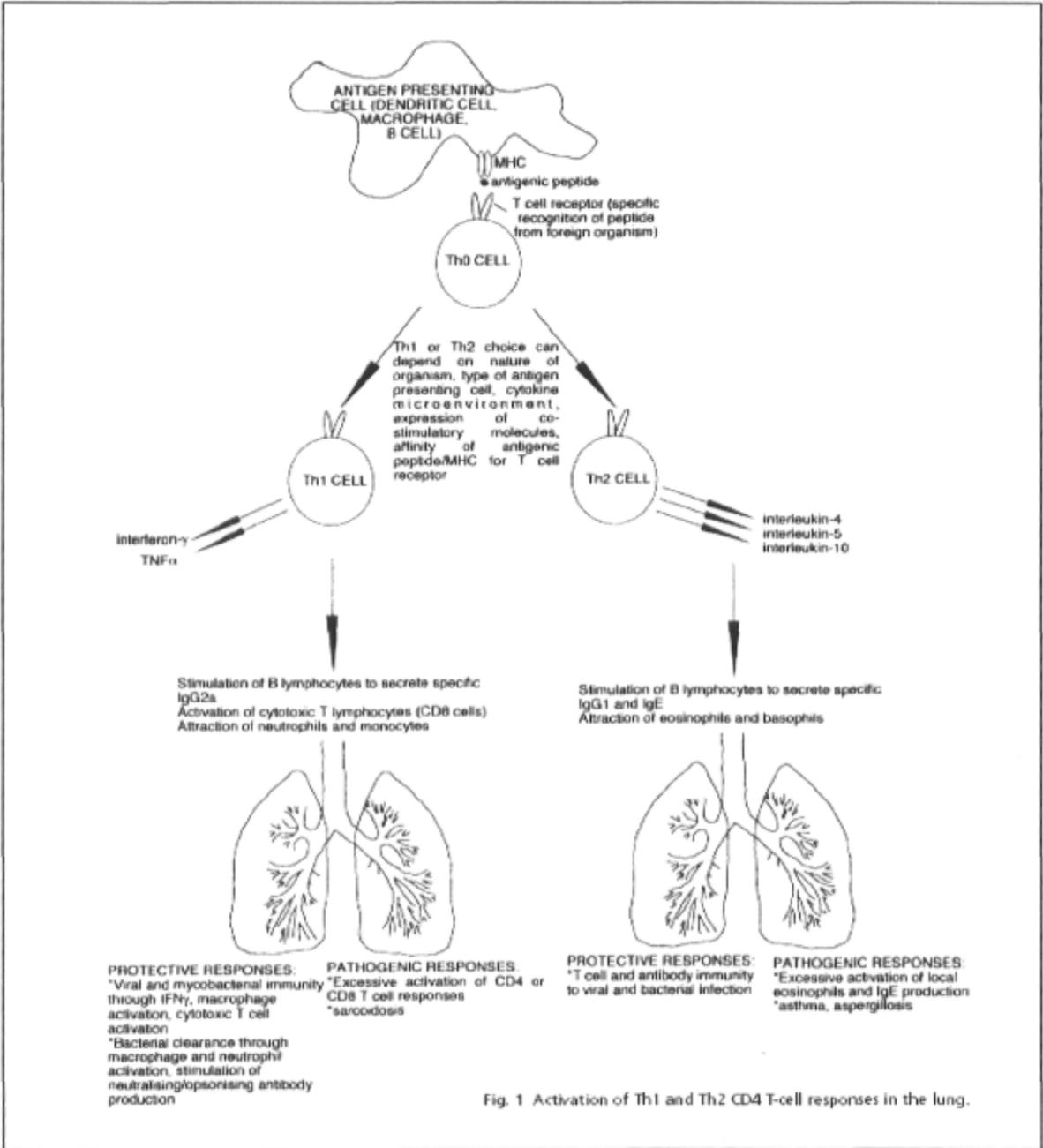
Le récepteur aux antigènes des cellules B (BCR pour «B-cell antigen receptor») est un anticorps lié à la membrane que les cellules B sécrètent une fois activées et différenciées en plasmocytes. Le récepteur aux antigènes des cellules T (TCR pour «T-cell antigen receptor») s'apparente au BCR, mais exerce une fonction très différente. Il détecte spécifiquement les antigènes issus des protéines étrangères et des pathogènes qui ont pénétré dans la cellule hôte.

Les lymphocytes T possédant à leur surface la molécule CD8 sont appelés cellules T cytotoxiques. Ces dernières reconnaissent n'importe quelle cellule de l'organisme infectée par un virus et peuvent contrôler l'infection en tuant la cellule infectée avant que la réplication virale ne soit complète. De la même façon que ces cellules combattent les infections par des virus ou des bactéries qui croissent dans le cytoplasme, les lymphocytes T CD8+ sont également d'importants défenseurs contre les protozoaires. Les cellules T cytotoxiques tuent les cellules cibles par la libération de granules lytiques spécialisés à la suite de la reconnaissance de l'antigène à la surface cellulaire. Ces granules lytiques contiennent au moins deux classes différentes de protéines effectrices : la perforine, qui se polymérise pour former des pores à travers la membrane des cibles, et les granzymes (des protéases à sérine), qui activent l'apoptose après être entrées dans le cytoplasme de la cellule cible.

D'autres lymphocytes se caractérisent par la présence de molécules CD4 à leur surface au lieu de la molécule CD8. Ces cellules sont nommées T auxiliaires et sont réparties en deux ensembles aux fonctions de défense différentes : les cellules dites T<sub>H1</sub> (H pour «helper») et les T<sub>H2</sub>. Les cellules T<sub>H1</sub> jouent un rôle important dans le contrôle des infections bactériennes intracellulaires. Leur principale fonction consiste à activer les macrophages et

les lymphocytes T cytotoxiques. Elles produisent des cytokines et des chimiokines (IL-2, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, TNF- $\beta$ ) qui attirent les macrophages au site de l'infection. L'IL-12 produite par les cellules dendritiques à la suite de l'ingestion de microbes, ainsi que l'IFN- $\gamma$ , stimulent le développement des cellules T<sub>H1</sub>. Ainsi, les cellules T<sub>H1</sub> détruisent les pathogènes intracellulaires en tuant les cellules infectées et en activant les macrophages.

De façon complémentaire, les lymphocytes T<sub>H2</sub> jouent un rôle central dans la destruction des pathogènes extracellulaires, par le biais de l'activation des cellules B. Elles promouvoient la production d'anticorps et sécrètent des cytokines médiatrices comme l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-10 et l'IL-13. Notons que l'IFN- $\gamma$  produit par les cellules T<sub>H1</sub> supprime le développement des cellules T<sub>H2</sub> alors que l'IL-10 et l'IL-4 sécrétées par les cellules T<sub>H2</sub> empêchent le développement des cellules T<sub>H1</sub>. Puisque les deux sous-populations peuvent s'inhiber mutuellement, il est souvent très difficile de réorienter la réponse immunitaire vers l'autre sous-population. Si, dès lors, un type de sous-population est activé en premier, il peut supprimer le développement de l'autre. Ces mécanismes font en sorte que certaines réponses sont dominées par l'immunité à médiation humorale (T<sub>H2</sub>) ou par l'immunité à médiation cellulaire (T<sub>H1</sub>), selon l'agent causal qui favorisera l'une ou l'autre (13, 24).



Source: Boyton Rosemary J. et al., *Pulmonary defences to acute respiratory infection*, British Medical Bulletin, 2002, vol. 61, p. 1-12.

## **1.2.2. Système immunitaire : immunité naturelle et acquise**

### **1.2.2.1 Immunité naturelle**

La population est constamment exposée aux micro-organismes présents dans l'environnement, y compris les agents infectieux. L'invasion par les micro-organismes est contrée chez tous les vertébrés par des mécanismes de défense naturelle qui agissent dès les premières minutes de l'infection. Les surfaces épithéliales constituent une première barrière mécanique contre la plupart des microbes. Aussi, dans les voies respiratoires se trouvent des cils vibratoires qui éliminent les micro-organismes grâce à leur mouvement particulier. Ceux qui réussissent à contourner ces barrières physiques sont habituellement éliminés par les mécanismes de l'immunité innée (dite aussi naturelle). Cette dernière est considérée primitive, car elle est apparue très tôt dans l'évolution. Une de ses caractéristiques est sa reconnaissance et sa réponse aux structures communes à tous les micro-organismes tels que les carbohydrates bactériens (peptidoglycan, acide lipoteichoïque), les lipopolysaccharides (LPS), ou certaines formes d'ADN bactérien.

Lorsqu'un micro-organisme réussit à traverser la barrière épithéliale, il commence à se répliquer dans les tissus. Habituellement, il est reconnu très tôt par les macrophages. Dans le système pulmonaire, les macrophages alvéolaires sont très importants pour maintenir la stérilité de l'espace alvéolaire grâce à leurs fonctions phagocytaires, microbicides et sécrétoires. De plus, ils communiquent avec les autres cellules de l'immunité innée afin de créer une défense de l'hôte bien organisée. Pour se faire, ils sécrètent des cytokines et des chimiokines. Les premières sont de petites protéines (environ 25kDa) qui sont libérées à la suite d'un signal d'activation et qui induisent une réponse locale ou systémique après la liaison à leurs récepteurs spécifiques. Quant aux chimiokines, elles constituent une classe de cytokines douées de chimiotactisme, c'est-à-dire qu'elles induisent la migration de cellules porteuses des récepteurs appropriés.

Les cytokines et les chimiokines libérées par les macrophages en réponse à des constituants bactériens déclenchent le processus inflammatoire. L'inflammation est généralement définie par la chaleur, la douleur, la rougeur et le gonflement. Il y a augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins, permettant aux fluides et aux protéines d'infiltrer les tissus. Également, l'adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales est accrue, ce qui permet aux leucocytes de s'infiltrer entre elles.

Dans le cas où les pathogènes sont très virulents ou présents en trop grand nombre, les macrophages génèrent plusieurs médiateurs qui serviront à recruter des cellules polymorphonucléaires. Par exemple, les métabolites de l'acide arachidonique comme le leucotriène B<sub>4</sub>, et des peptides chimiotactiques tels l'IL-8, le MIP-2 (*macrophage inflammatory protein*) et autres, sont des dérivés macrophagiques qui attirent des phagocytes tels que les neutrophiles. Puisque l'activité phagocytaire des neutrophiles est beaucoup plus grande et efficace que celle des macrophages, ils sont très utiles pour éliminer les micro-organismes pathogènes dans les tissus et s'avèrent cruciaux contre les infections pulmonaires. L'afflux des neutrophiles est rapidement suivi par celui de monocytes circulants qui se différencient en macrophages après transmigration au site infecté. Cette différenciation est entre autre produite par l'impulsion de chimiokines spécifiques dont il sera question plus loin. Les macrophages et les neutrophiles constituent donc une première ligne de défense à titre de cellules inflammatoires, lors d'infections des voies respiratoires (7, 13, 35).

## **1.2.2.2. Immunité acquise**

### **1.2.2.2.1. Principes généraux**

L'immunité innée reconnaît les caractères communs aux pathogènes et joue un rôle primordial dans la défense initiale contre les infections. Par contre, de nombreux micro-organismes surmontent ou contournent ce système. La capacité de reconnaître

spécifiquement tous les pathogènes et de conserver une mémoire immunitaire contre eux sont des caractéristiques de l'immunité adaptative, dite aussi spécifique ou acquise.

L'induction d'une réponse immune acquise commence lors de l'ingestion d'un pathogène par une cellule dendritique immature dans un tissu infecté. Cette cellule présente à sa surface des récepteurs qui reconnaissent les traits communs de plusieurs microbes. Tout comme les macrophages et les neutrophiles, la cellule dendritique phagocyte et dégrade les pathogènes ingérés à la suite de leur liaison sur les récepteurs cellulaires. L'ingestion d'un micro-organisme étranger active la cellule dendritique qui se différencie en cellule présentatrice d'antigènes. Celle-ci se déplace ensuite jusqu'aux organes lymphoïdes périphériques où elle présente aux lymphocytes T les antigènes étrangers. Une activation et une prolifération des lymphocytes s'ensuit dans les tissus lymphoïdes qui drainent l'ensemble des lymphocytes naïfs et des cellules présentatrices d'antigènes. Grâce à la grande diversité des récepteurs lymphocytaires, il y en aura toujours quelques-uns qui se lieront à un antigène étranger. Ces lymphocytes se mobiliseront et se transformeront en quelques heures en gros lymphoblastes activés. Ceux-ci se diviseront pendant trois à cinq jours de telle façon qu'un seul lymphocyte naïf donnera naissance à une colonie clonale d'environ 1000 cellules filles identiques. Ces dernières se spécialiseront ensuite en cellules effectrices mémoires. Puisqu'il faut quatre à cinq jours avant que l'expansion clonale soit complète et que les lymphocytes soient devenus effecteurs, il s'ensuit que l'immunité acquise n'intervient qu'après un délai de quelques jours. Une fois l'antigène éliminé, la plupart des cellules lymphocytaires disparaissent par apoptose. Toutefois, quelques-unes persistent et deviennent des cellules mémoires. Celles-ci constituent la base de la mémoire immunologique qui assure une protection immune durable. Effectivement, grâce à elles, une réponse efficace apparaîtra plus rapidement lors d'une seconde rencontre avec le même pathogène.

#### **1.2.2.2. Mécanismes effecteurs**

Nous avons déjà mentionné l'existence de deux sortes de récepteurs lymphocytaires à l'antigène : les immunoglobulines de surface des cellules B et les récepteurs TCR sur les

cellules T. L'immunité régie par les anticorps se nomme l'immunité humorale. Les anticorps se présentent sous forme de Y dont les bras constituent deux sites de liaison à l'antigène. Ceux-ci manifestent une grande diversité protectrice puisqu'ils sont hautement variables d'une molécule à l'autre.

Un moyen de protection simple et direct qu'assurent les anticorps consiste à se lier directement aux pathogènes et autres produits toxiques afin de bloquer leur accès aux cellules qu'ils pourraient infecter. Ce mécanisme s'appelle la neutralisation. La neutralisation est importante pour la protection contre les toxines bactériennes et les pathogènes viraux.

Certaines bactéries se multiplient à l'extérieur des cellules. Dans ce cas, le rôle des anticorps est de permettre aux cellules phagocytaires d'ingérer et de détruire les bactéries. Les phagocytes reconnaissent la région constante des anticorps lorsque ceux-ci recouvrent les bactéries. Ce moyen de protection, nommé opsonisation, est important pour contrer les bactéries autrement insensibles à la reconnaissance directe par les phagocytes.

La dernière fonction des anticorps consiste à activer le système de protéines plasmatiques nommé complément. Les composés activés du complément peuvent créer des pores transmembranaires qui détruisent directement les bactéries. Par contre, le principal rôle du complément, tout comme celui des anticorps, consiste à se lier à la surface des pathogènes afin de rendre les phagocytes mieux à même d'ingérer et de détruire les bactéries.

Les anticorps constituent l'unique contribution des cellules B à la défense lymphocytaire, tandis que les cellules T exercent plusieurs fonctions effectrices. Les pathogènes bactériens, parasitaires, ou viraux qui se multiplient à l'intérieur des cellules ne peuvent être détectés par les anticorps. Ils sont donc pris en charge par les cellules T qui sont responsables des réponses immunes à médiation cellulaire dans l'immunité acquise. Ces réponses dépendent des interactions directes entre les lymphocytes T auxiliaires et les cellules présentant les antigènes. Les cellules T cytotoxiques (CD8) agissent les plus directement car elles peuvent contrôler l'infection en tuant les cellules infectées.

Comme il a été vu auparavant, il existe aussi les cellules CD4  $T_H1$  et  $T_H2$  qui, respectivement, activent les macrophages et les cellules B. Les lymphocytes  $T_H1$ , par leur fonction d'activateurs de macrophages, induisent la fusion des lysosomes avec les vésicules contenant des bactéries. Par le fait même, ils stimulent d'autres mécanismes antibactériens du phagocyte. La réponse  $T_H1$  est requise pour l'élimination des pathogènes intracellulaires et il a déjà été démontré qu'elle était également importante pour l'immunité contre les bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif. Quant aux cellules  $T_H2$ , elles sont indispensables à l'activation de la réponse humorale. Effectivement, les cellules B peuvent recevoir l'aide des lymphocytes T auxiliaires après que l'antigène étranger ait été ingéré puis présenté à leur surface. Les cellules B ainsi activées produiront des anticorps importants pour l'immunité acquise (13, 34).

### **1.3. Médiateurs solubles de l'inflammation**

Afin de créer une immunité efficace, les différentes cellules de défense doivent communiquer entre elles. Les médiateurs de l'inflammation sont nécessaires à cette communication.

#### **1.3.1 Le complément**

Le système du complément est constitué de protéines plasmatiques qui agissent ensemble pour attaquer les formes extracellulaires des pathogènes. Son activation peut se produire spontanément ou à la suite de la liaison d'anticorps sur les pathogènes. Le complément constitue un élément important de la défense de l'hôte contre le pneumocoque. Il existe trois voies d'activation du complément. Premièrement, la voie classique, qui est déclenchée par les anticorps ou directement par un fragment C1q à la surface du pathogène. Deuxièmement, la voie des lectines, qui est déclenchée par la MBP («mannan-binding protein»), un constituant normal du sérum qui se lie à certaines bactéries encapsulées.

Finalement, il y a la voie alternative, qui est déclenchée directement au contact des pathogènes. Ces trois voies convergent toutes pour générer les mêmes molécules effectrices qui endommagent certaines composantes bactériennes en créant des pores transmembranaires. Cependant, la voie classique prévaut contre le pneumocoque. Certains fragments constitutifs du complément, particulièrement le C5a, stimulent la réponse inflammatoire en agissant sur les vaisseaux sanguins locaux, en activant les mastocytes (qui libèrent l'histamine et le TNF- $\alpha$ ) et en exerçant un puissant effet chimiotactique sur les neutrophiles et les monocytes, ce qui accélère la clairance des pathogènes (13, 14).

### **1.3.2. Médiateurs lipidiques**

Ce type de médiateurs inclut principalement les prostaglandines, les leucotriènes et le facteur d'activation plaquettaire (PAF). Ces lipides vasoactifs et parfois chimiotactiques sont des métabolites rapidement produits par les macrophages par des réactions enzymatiques qui dégradent les phospholipides membranaires. Leur action est parallèle et complémentaire à celle des cytokines et des chimiokines qui sont synthétisées et sécrétées par les macrophages en réponse aux agents pathogènes (13).

#### **1.3.2.1 Les prostaglandines**

Les prostaglandines sont des lipides dérivés du métabolisme de l'acide arachidonique qui exercent des effets variés sur différents tissus. Les principales sources de prostaglandines (et de leurs corollaires, les thromboxanes et les prostacyclines) sont les phagocytes mononucléés, les cellules endothéliales et les plaquettes sanguines. Leur synthèse est accrue lors de réactions inflammatoires grâce à des stimuli tels l'endotoxine bactérienne, des complexes immuns, le fragment C3a du complément, la bradykinine et l'IL-1. Les prostaglandines produisent des effets pro-inflammatoires grâce à leurs récepteurs présents sur les cellules cibles. Elles sont reconnues comme agents médiateurs de la douleur, de la fièvre et de l'œdème caractérisant la réponse inflammatoire. Toutefois, c'est leur action

vasoactif qui caractérise principalement leur présence, d'autant manifeste chez les organes irrigués de multiples capillaires sanguins que sont les poumons et les reins. Ces médiateurs procurent donc un contrôle circulatoire majeur en cas d'infections sévères où des toxines sont relarguées (31).

### **1.3.2.2. Les leucotriènes**

Les leucotriènes sont également des produits de l'oxydation de l'acide arachidonique comme le sont les prostaglandines. Ils sont synthétisés et sécrétés par les neutrophiles et les éosinophiles. Le leucotriène A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>) se décompose en leucotriènes B<sub>4</sub> et C<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub> et LTC<sub>4</sub>). Le LTD<sub>4</sub> et le LTE<sub>4</sub> sont deux autres métabolites du LTC<sub>4</sub>. Les leucotriènes régulent plusieurs actions pro-inflammatoires (la vasoconstriction, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et de l'adhésion endothéliale), ce qui leur fait jouer un rôle de premier plan dans les maladies broncho-pulmonaires, incluant la pathophysiologie de l'asthme. Dans le cas d'infections pulmonaires, c'est plutôt le LTB<sub>4</sub> qui prévaut, par sa capacité d'induire la chimiotaxie des neutrophiles (31).

### **1.3.2.3. Le facteur d'activation plaquettaire (PAF)**

Le PAF est un médiateur lipidique dérivé du glycérol phosphate qui active la cascade de la coagulation sanguine et plusieurs autres composantes du système immunitaire inné. De plus, dans les cellules endothéliales, il favorise l'adhésion cellulaire neutrophile-endothélium. Les récepteurs spécifiques du PAF ont été trouvés sur les neutrophiles et plusieurs antagonistes ont été identifiés. Il a été mentionné dans une section précédente l'interaction particulière du pneumocoque avec le récepteur du PAF (34).

## **1.3.3. Médiateurs protéiques : les cytokines**

Les cytokines sont de petites protéines (environ 25kDa) libérées par plusieurs types cellulaires en réponse à un signal d'activation. Elles peuvent agir de façon autocrine, modifiant le comportement des cellules mêmes qui les sécrètent de façon paracrine par leur action sur des cellules adjacentes, ou encore endocrine, en agissant sur des cellules à distance, après libération systémique (13).

### **1.3.3.1. Interféron-gamma**

L'IFN- $\gamma$  est une puissante cytokine pro-inflammatoire produite principalement par les cellules T<sub>H1</sub> et les cellules NK (*Natural killer*). Cette molécule possède diverses activités régulatrices comme l'activation des phagocytes, la stimulation de la présentation antigénique et l'orchestration de l'interaction entre les leucocytes et l'endothélium vasculaire. Cette cytokine est également présente lors de la réaction immunitaire innée contre les pathogènes extracellulaires qui ont envahi les poumons (3, 30).

### **1.3.3.2. Facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ )**

Nommé pour sa capacité à créer la nécrose et l'involution de tumeurs, le TNF- $\alpha$  est reconnu pour être une des premières cytokines produites dans la réponse de l'hôte. Effectivement, il est un inducteur de la réponse inflammatoire locale qui aide à contenir les infections. Les macrophages alvéolaires le produisent en quantité importante, élicitant indirectement le recrutement des neutrophiles aux poumons. Effectivement, cette cytokine promouvoit l'expression de plusieurs autres médiateurs pro-inflammatoires dont les chimiokines sécrétées entre autres par les macrophages alvéolaires et les cellules épithéliales, ce qui permet le recrutement aux poumons de différentes cellules immunitaires. Des études ont déjà démontré que la production locale de cytokine pro-inflammatoire telle que le TNF- $\alpha$  est primordiale pour l'élimination de l'infection bactérienne au niveau pulmonaire (13, 29, 35).

### 1.3.3.3. Interleukine-4

L'IL-4 est une cytokine de type  $T_H2$  donc elle favorise la production d'anticorps par les cellules B. Aussi, elle possède plusieurs rôles reliés à l'inflammation retrouvée dans les réactions allergiques comme le développement des basophiles, la chimiotaxie des éosinophiles et la stimulation de l'expression des IgE par les cellules B (13).

### 1.3.3.4. Interleukine-10

L'IL-10 est également une cytokine de type  $T_H2$ . Cette cytokine anti-inflammatoire diminue la production de plusieurs cytokines pro-inflammatoires comme  $TNF-\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IFN-\gamma$ ,  $IL-12$ ,  $MIP-2$  et  $MIP-1\alpha$ . Également, elle inhibe l'activation des macrophages ainsi que la différenciation des lymphocytes T en  $T_H1$ . Chez les humains, elle est principalement produite par les cellules T  $CD4+$  et est connue pour inhiber la prolifération des cellules T. Cette action s'exerce principalement par un contrôle négatif de la synthèse de l'interleukine 2 par les cellules T (13, 35).

### 1.3.3.5. Interleukine-12

L'IL-12 est une cytokine hétérodimérique composée du produit de deux différents gènes, les sous-unités p35 et p40. Alors que la sous-unité p35 est transcrite constitutivement, la sécrétion de la p40 est induite par les substances relâchées des cellules présentatrices d'antigènes activées. Les cellules présentatrices d'antigènes comme les cellules dendritiques et les macrophages en sont les principaux producteurs. L'IL-12 est une cytokine pro-inflammatoire qui agit dans le système immunitaire innée et acquis. Elle induit la différenciation des lymphocytes T en cellules  $T_H1$  et joue un rôle important dans l'induction de l'immunité à médiation cellulaire contre les infections pulmonaires causées par les virus, les mycobactéries, les champignons, et les parasites. Aussi, l'IL-12 est un

médiateur de la réponse innée de l'hôte contre les infections bactériennes pulmonaires (2, 12, 35).

### **1.3.4. Médiateurs protéiques : les chimiokines**

Les chimiokines sont de petites protéines qui stimulent la migration et l'activation des leucocytes, spécialement les phagocytes et les lymphocytes. Elles sont cruciales lors de la réponse inflammatoire. Elles ont été divisées en différents groupes selon la position des résidus cystéines dans leur composition. Les chimiokines C-X-C incluant le MIP-2 (*macrophage-inflammatory protein*), le KC, l'IL-8 sont connues pour stimuler et attirer les neutrophiles alors que les chimiokines CC incluant le MCP-1, le MIP-1 $\alpha$ , le RANTES augmentent préférentiellement le recrutement des monocytes/macrophages.

#### **1.3.4.1. Protéine inflammatoire du macrophage 2 (MIP-2)**

Cette chimiokine semble importante dans les cas d'infections pulmonaires. Effectivement, une étude a démontré que l'incubation de neutrophiles avec du MIP-2 *in vitro* augmentait l'activité phagocytaire des neutrophiles et l'élimination de bactéries *Klebsiella pneumoniae* (10). Également, notre équipe a déjà démontré qu'une infection avec *S. pneumoniae* induisait une expression rapide de chimiokines telle que MIP-2 dans le tissu pulmonaire et le lavage broncho-alvéolaire (1). Le pic d'expression de cette chimiokine était présent juste avant celui des neutrophiles recrutés aux poumons, ce qui corrobore son rôle dans le recrutement de ce type cellulaire.

#### **1.3.4.2. TARC**

TARC (Thymus and activated related chemokine) est une chimiokine habituellement produite par les cellules présentatrices d'antigène, surtout les cellules dendritiques. Le

TARC attire les cellules T<sub>H</sub>2, car elles possèdent CCR4, le récepteur de cette chimiokine (21).

#### **1.3.4.3. Protéine-10-inductible par l'interferon-gamma (IP-10)**

L'IP-10 fait partie des chimiokines C-X-C de type T<sub>H</sub>1, et sa production est stimulée par l'IFN- $\gamma$ . *In vitro*, il a été démontré qu'elle était chimiotactique pour les cellules T<sub>H</sub>1 et les cellules NK (21). De plus, elle est associée à l'inflammation du système respiratoire et à l'infiltration lymphocytaire dans les cas d'asthme et d'infections au rhinovirus. Ce sont les macrophages et les neutrophiles qui en sont les sources principales (17).

#### **1.3.4.4. Protéine chimioattractive des monocytes-1 (MCP-1)**

Cette molécule est synthétisée en grande partie par les monocytes. Sa production coïncide avec l'infiltration des monocytes/macrophages au niveau alvéolaire lors d'une inflammation pulmonaire. Bref, le MCP-1, tout comme d'autres chimiokines produites par des cellules T<sub>H</sub>1 lors de la réponse inflammatoire, permet d'orienter la migration des phagocytes à travers l'endothélium vasculaire vers le site d'infection (3, 13).

### **1.3.5. Les radicaux oxygène**

Les PMNs tuent les bactéries entre autres grâce à leurs mécanismes oxydatifs. Plusieurs radicaux oxygènes sont produits par ce type cellulaire, comme le radical superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyl. Ces molécules peuvent être produites grâce à la participation de l'enzyme constitutive myéloperoxidase. Il semblerait que les radicaux oxygène puissent aider à restreindre la croissance bactérienne lors d'une pneumonie à pneumocoque. Or, les mécanismes oxydatifs contribuent également à la pathogenèse de nombreuses maladies pulmonaires. Une augmentation de production des radicaux oxygène est directement reliée à l'oxydation de protéines, d'ADN et de lipides causant des

dommages aux poumons et induisant diverses réponses cellulaires. Il a été proposé que les radicaux oxygène produits par les phagocytes recrutés aux sites de l'inflammation constituent une cause majeure des dommages tissulaires induits lors de maladies chroniques telles que l'asthme, la maladie pulmonaire obstructive chronique, la fibrose pulmonaire et le syndrome de détresse respiratoire aigu (4, 5, 27).

### **1.3.6. Le monoxyde d'azote**

Le monoxyde d'azote (NO) est un gaz généré comme messager inter-cellulaire mais possédant également des fonctions vasodilatatoires et cytotoxiques. Il est généré par plusieurs types cellulaires tels que les fibroblastes, les cellules épithéliales et endothéliales, les kératinocytes, les monocytes/macrophages, les APCs et les cellules NK. Le NO est synthétisé à partir du L-arginine et de l'oxygène par un processus enzymatique qui nécessite la NO synthase (NOS). Il existe trois type de NOS. Deux de ces dernières sont exprimées constitutivement (nNOS et eNOS où n est pour neuronale et e pour endothéliale) alors que l'autre l'est seulement dans les cellules activées (iNOS où i est pour inductible).

Chez les mammifères, le NO agit comme agent vasodilatateur, neurotransmetteur et inhibiteur d'agrégation plaquettaire. De plus, le NO est produit lors de réponses inflammatoires et immunitaires. Il agit en tant qu'agent toxique contre les agents infectieux, mais il peut aussi induire ou réguler les fonctions et la mort des cellules immunitaires. Par exemple, le NO peut augmenter ou diminuer l'activation des neutrophiles dépendamment de sa concentration et il inhibe l'activation des mastocytes. De plus, il a déjà été démontré que sa production menait à l'apoptose d'une population de cellules T immatures dans les thymus de souris.

Le NO peut être pro-inflammatoire et induire des réactions toxiques envers les tissus de l'hôte. Par contre, il a également la possibilité d'agir comme une molécule anti-inflammatoire via ses effets inhibiteurs ou apoptotiques sur les cellules immunitaires. Effectivement, l'oxyde nitrique en faible quantité est pro-inflammatoire et induit la

vasodilatation et le recrutement de neutrophiles tandis qu'il est anti-inflammatoire lorsqu'il est présent en grande quantité et diminue la quantité de molécules d'adhésion, supprime l'activation et induit l'apoptose de cellules inflammatoires (9).

## **1.4. Prophylaxie et traitement de la pneumonie à pneumocoque**

### **1.4.1 Les vaccins**

De nombreuses bactéries, y compris *Neisseria meningitidis* et *S. pneumoniae*, possèdent une capsule polysaccharidique. La défense la plus efficace contre ces micro-organismes est leur opsonisation par des anticorps. L'objectif de la vaccination consiste à déclencher des anticorps neutralisant contre ces capsules polysaccharidiques des bactéries.

Le Pneumovax® 23 est un exemple de vaccin utilisé comme agent préventif des infections dues au pneumocoque. Il est constitué d'éléments capsulaires des 23 sérotypes les plus prévalents de *S. pneumoniae*. Par contre, il n'est pas très efficace contre les infections pneumococciques chez les enfants de moins de deux ans, c'est pourquoi un vaccin conjugué avec des éléments protéiques a été préparé puis mis en vente récemment. Ce deuxième vaccin appelé Prevnar est le seul qui déclenche chez les bébés de six semaines à deux ans une bonne réaction immunologique aux maladies invasives à pneumocoques et ce, malgré le fait qu'il n'est composé que de sept sérotypes capsulaires seulement (8, 25).

### **1.4.2. Les antibiotiques**

Un traitement avec un antibiotique approprié guérit d'habitude rapidement les infections pulmonaires bactériennes. Dans les cas les plus sévères, le patient répond au traitement antibiotique dans un délai de 48 à 72 heures. On observe alors une disparition de la fièvre, une amélioration de la capacité respiratoire et une réduction de la douleur thoracique.

La plupart des patients atteints de pneumonie ont contracté cette dernière dans la communauté et bien souvent, une hospitalisation n'est pas nécessaire. On parle alors de pneumonie acquise en communauté. Habituellement, une thérapie empirique par antibiotiques oraux constitue un traitement approprié. Pour contrer la pneumonie à pneumocoque, les macrolides, incluant l'azitromycine ou la clarithromycine, font partie de la thérapie recommandée. Pour les cas plus graves, lorsque les patients ont contracté une pneumonie en étant hospitalisés (pneumonie hospitalière), le traitement doit être plus agressif compte tenu des pathogènes habituellement en cause et de la vulnérabilité du patient. Des antibiotiques tels que les céphalosporines, les quinolones et la vancomycine donnés par voie intraveineuse peuvent être recommandés.

La ceftriaxone est une céphalosporine de troisième génération qui possède une demi-vie élevée, ce qui permet de l'administrer une fois par jour. Elle possède une activité bactéricide dépendante du temps contre des pathogènes comme *Haemophilus influenzae*, *Neisseria* spp. et *S. pneumoniae*. Des études ont déjà démontré l'efficacité de cet antibiotique dans les cas d'infections sévères et difficiles à traiter telles que la méningite, la pneumonie et plusieurs autres. D'ailleurs, les céphalosporines de troisième génération telle que la ceftriaxone sont des antibiotiques de premier choix dans le traitement des patients hospitalisés en Europe et en Amérique. De plus, cet antibiotique est recommandé par *The American Thoracic Society* pour le traitement des patients souffrant d'une pneumonie acquise à l'hôpital. Administrée par voie intraveineuse ou intramusculaire, la ceftriaxone peut être donnée seule ou en combinaison avec un autre antibiotique. Comme pour tous les agents anti-bactériens, la voie et la fréquence d'administration ainsi que la dose sont déterminées par la sévérité de l'infection, la susceptibilité du micro-organisme et l'état général du patient (18, 19).

### **1.4.3. Les immunomodulateurs**

De plus en plus de souches bactériennes développent différents mécanismes leur permettant d'être résistantes aux antibiotiques. Il devient alors difficile de traiter des infections sévères comme la pneumonie et la septicémie; c'est pourquoi il est important de produire de

nouveaux agents anti-infectieux possédant différents modes d'actions, tout en élaborant des stratégies pour contrôler les toxines et optimiser la réponse de l'hôte.

Des produits qui interfèrent avec l'adhérence bactérienne ou qui neutralisent ou éliminent des endotoxines, ainsi que l'administration de cytokines comme immunoadjuvants constituent des voies en développement intéressantes pour le traitement de la pneumonie. Des facteurs de croissance hémapoïétique, des interférons, des interleukines, des anticorps monoclonaux et des récepteurs solubles sont déjà utilisés chez des patients et d'autres sont en voie de développement pour fins cliniques (3).

## **CHAPITRE II Introduction à la deuxième partie**

La deuxième partie de ce mémoire est constituée d'un article scientifique décrivant l'ensemble des recherches originales effectuées lors de ma maîtrise. Il est rédigé en anglais de manière à pouvoir être publié dans le journal *Infection and Immunity*. Un résumé en français le précède. Une conclusion générale de mes travaux se trouve au quatrième chapitre.

## 2.1. Hypothèse et objectifs

Des millions de personnes meurent encore de pneumonie et de septicémie à *Streptococcus pneumoniae* chaque année à travers le monde. Une défense immunitaire inadéquate, un taux croissant de résistance aux antibiotiques, mais également des complications physiologiques résultant de la libération de toxines pro-inflammatoires contribuent au syndrome de détresse respiratoire et au fort taux de mortalité associés à ces pneumonies. Plusieurs études de pathogenèse chez des modèles animaux sains ou leucopéniques ont permis de mieux comprendre la séquence d'événements caractérisant l'évolution de l'infection et de la réponse de l'hôte jusqu'au moment du décès. Toutefois, plusieurs lacunes demeurent dans notre compréhension des mécanismes responsables de l'orchestration de la défense de l'hôte contre le pneumocoque, tant au niveau de l'immunité innée que de l'immunité acquise. Les événements précoces suivant l'infection (interaction hôte-pneumocoque, activation et recrutement leucocytaire, production de cytokines/chimiokines, etc.) exercent un rôle important quant à l'issue de la maladie et du type de réponse immune induite. De plus, la capsule polysaccharidique du *S. pneumoniae* représente un important facteur de virulence offrant une protection contre la phagocytose par les macrophages alvéolaires, ce qui pourrait favoriser l'initiation d'une réponse immune spécifique (acquise). Il est généralement reconnu que les bactéries à croissance extracellulaire comme le pneumocoque stimulent une réponse indépendante des lymphocytes T favorisant une stimulation directe des lymphocytes B et la fabrication d'anticorps protecteurs à long terme, propriété mise à profit pour la fabrication de vaccins. Nos études antérieures ont toutefois permis de constater un recrutement lymphocytaire (non caractérisé) aux alvéoles pulmonaires en phase précoce de pneumonie aiguë à pneumocoque. La communauté scientifique

commence par ailleurs à s'interroger sur le rôle que pourraient exercer les lymphocytes T lors de pneumonie aiguë bactérienne, et quels seraient les médiateurs clés reliant l'immunité innée et l'immunité acquise dans un tel contexte. À notre connaissance, aucune étude n'a également reporté l'influence qu'exerce l'immunité acquise lors d'une primo-infection à pneumocoque sur l'activité de l'immunité précoce et tardive lors d'une ré-infection.

Le but de la présente étude était donc de poursuivre la caractérisation de notre modèle murin de pneumonie à pneumocoque en investiguant l'immunité innée et acquise induite par le *S. pneumoniae* après une ré-infection. Les objectifs visés étaient de caractériser l'effet d'une ré-infection sur les réponses cellulaire et humorale de l'hôte et d'étudier l'influence de l'utilisation de deux différents sérotypes de pneumocoque pour la primo-infection sur la réponse immunitaire.

**Chapitre III Interaction de l'immunité innée et acquise  
lors de la réponse immunitaire pulmonaire à la suite  
d'une ré-infection avec *Streptococcus pneumoniae***

### 3.1. Résumé

Le nasopharynx est le principal réservoir de *Streptococcus pneumoniae* et la source de contamination parmi la communauté. Par conséquent, des gens en bonne santé peuvent être des hôtes asymptomatiques de plusieurs sérotypes de façon simultanée ou séquentielle. Cependant, cette colonisation par le pneumocoque peut conduire au développement de maladies chez les personnes immunodéficientes, mais aussi chez les immunocompétents à la suite de complications de l'influenza. La réponse immunitaire développée lors d'infections bactériennes répétées a été peu étudiée spécialement dans le cas des pneumonies à pneumocoque. Dans cette étude, nous avons examiné les réponses innées et acquises lors d'une ré-infection avec le pneumocoque à la suite d'une primo-infection induite par deux sérotypes différents. Un groupe de souris CD1 était d'abord infecté avec *S. pneumoniae* sérotype 3 ou 14 puis ré-infectées 28 jours plus tard avec le sérotype 3. Les souris furent sacrifiées à 6, 24, 48, 72 heures (réponse précoce) et à 7, 15 et 21 jours (réponse tardive). Un second groupe (contrôle) était infecté qu'une fois avec le sérotype 3 puis sacrifié aux mêmes temps. Nous avons constaté que, comparativement au groupe contrôle, les souris ré-infectées démontraient une meilleure clairance bactérienne malgré une diminution du recrutement précoce des neutrophiles et de production des chimiokines MCP-1 et MIP-2. De plus, la production du TNF- $\alpha$  n'était pas modifiée tandis que celle de l'IL-10 était drastiquement diminuée. La réponse immune tardive a généré des anticorps spécifiques anti-pneumococciques et un recrutement des cellules T CD4+ aux alvéoles pulmonaires. La primo-infection avec le sérotype 3 a induit un plus haut niveau d'anticorps, de lymphocytes alvéolaires et une plus forte réponse inflammatoire que ne l'a fait le sérotype 14. Ces résultats suggèrent que peu importe le sérotype utilisé pour la primo-infection, celle-ci entraîne une diminution de la réponse immunitaire et inflammatoire précoce tandis que la réponse immune tardive est influencée par le sérotype causant la première infection.

**Interaction of acquired and innate immunity in pulmonary response  
to re-infection with *Streptococcus pneumoniae***

Running title: Re-infection in pneumococcal pneumonia

Marie-Eve Champagne, Andrée Fortin, Yves Bergeron, and Michel G. Bergeron\*

Research Center for Infectious Diseases, Laval University,  
Quebec City, Quebec, Canada G1V 4G2

\*Corresponding author:

Professor Michel G. Bergeron MD, FRCP  
Director, Division of Microbiology, Laval University  
and Infectious Diseases Research Center, CHUQ, CHUL building  
2705 Laurier Blvd, Quebec, Quebec, Canada G1V 4G2.  
Phone: (418) 654-2705 Fax: (418) 654-2715  
E-mail: [Michel.G.Bergeron@crchul.ulaval.ca](mailto:Michel.G.Bergeron@crchul.ulaval.ca)

2007-04-27

### 3.2. Abstract

Nasopharyngeal carriage is the main reservoir of *Streptococcus pneumoniae* and the source of horizontal spread within the community. Hence, healthy people can be asymptomatic carriers of multiple strains simultaneously or sequentially. However, pneumococci carriage can result in life-threatening disease among immunodeficient people, but also among immunocompetent individuals as a complication of influenza. Otherwise, host immune response to repeated bacterial infections remains poorly studied, especially for pneumococcal pneumonia. In the present study, we examined cellular and humoral responses to pneumococcal re-infection using two different serotypes for the first infection. One group of CDI mice were first infected with *S. pneumoniae* serotype 3 or 14 then re-infected 28 days later with serotype 3. A second group (control) were infected only with the serotype 3. Mice from both groups were sacrificed 6, 24, 48 and 72 hours (early response) and 7, 15, 21 days (late response) after the last infection. We found that, compared to singly-infected mice, re-infected animals displayed an improved bacterial clearance despite a decreased early neutrophil recruitment and chemokine production (MCP-1, MIP-2). Otherwise, TNF production wasn't modified while IL-10 was drastically reduced. The late immune response generated specific pneumococcal antibodies and significant alveolar CD4+ T cell recruitment. The primary infection with serotype 3 induced higher levels of antibodies, alveolar lymphocytes and a stronger inflammatory response than that induced with the serotype 14. These results suggest that host response to re-infection with pneumococci is characterized by a decreased early immune and inflammatory response regardless of the serotype used for the first infection, and that the late immune response depends on which serotype came first.

### 3.3. Introduction

*Streptococcus pneumoniae* is an important pathogen causing respiratory-tract infections such as otitis media, sinusitis, and pneumonia but also invasive infections including meningitis and sepsis. Among others, pneumococcal pneumonia constitutes an important worldwide health problem. In fact, morbidity and mortality remain high, both in the developing world and in countries with access to health care. Although effective antibiotics and vaccines exist, pneumococcus is developing a growing resistance towards antibiotics (32). Hence, a better comprehension of the pathology of pneumococcal pneumonia is necessary to develop new therapeutic alternatives.

Human nasopharynx is the main reservoir of pneumococci and the source of horizontal spread of this pathogen within the community (3). Ninety pneumococcal serotypes have been described, and healthy people can be asymptomatic carriers of one or more strains at the same time or sequentially (7, 8, 15, 36). In most cases, *Streptococcus pneumoniae* carriage does not result in life-threatening disease except for infants, the elderly, and people with underlying medical conditions (HIV patients, immunosuppression after therapy, intubated in-patients). For those people who have poor immune response efficiency, pneumococcus remains a major cause of community-acquired pneumonia and bacteremia (21). Even for immunocompetent individuals, pneumococci can overcome host barriers and multiply within host tissues thus triggering severe inflammation. Moreover, coinfections of bacteria and virus are an important cause of developing pneumococcal pneumonia for patients who have an effective immune response. Indeed, influenza virus infection induces more severe pneumonia when complications involving bacteria occur (23, 33). Thus, secondary pneumonia is generally associated with excessive inflammatory reactions leading to acute respiratory distress syndrome (ARDS) and septic shock (24, 35).

Nevertheless, the pulmonary immune system provides specific, rapid and protective responses against pathogenic microbes. Effective host defense against lung bacterial infection is primarily dependent on rapid phagocytic activity by macrophages and

neutrophils. Recruitment of these leukocytes at the infectious foci involves the establishment of gradients of chemotactic factors released from host cells (such as chemokines and the C5a complement component). Still, inflammatory cells are important because of their production of different chemokines and cytokines including MIP-2, MCP-1, TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-10 and IL-4 that were all shown to influence host defense against various pathogens (25). Innate immunity thus plays a role in the earliest phases of the infection and may succeed in repelling it. However, extracellular encapsulated pathogens such as *S. pneumoniae* have developed strategies to escape innate immune defenses (1, 30, 38). Often, an adaptive immune response is induced and required to resolve the infection. Adaptive immunity is characterized by lymphocyte proliferation and antibodies production. Once an adaptive immune response has occurred, antibodies and effector T cells are dispersed via the circulation and recruited into the infected tissues. Then, a protective immunity is induced because of the presence of effector cells and specific antibodies produced after the initial insult. Then, an adaptation process that creates immunological memory allows even more effective protection against future encounters with similar pathogens.

*S. pneumoniae* evades phagocytosis due to its surrounding polysaccharide capsule that further contributes to invasive disease. Immunity to extracellular bacteria has long been attributed to antibodies against capsular polysaccharides (PS) which are type 2 T-independent antigens. However, recent works highlighted the role of T lymphocytes in protecting against *S. pneumoniae*, suggesting that anti-capsular antibodies, although useful, are not strictly necessary for pneumococcal clearance (13, 20, 22, 39). The importance of an antiprotein response that requires cognate CD4+ T cells was further stressed (18).

Our previous studies with murine pneumococcal pneumonia showed that lymphocytes, which belong to adaptive immunity, were recruited to lung tissue as early as 48h post-infection (2). Although lymphocyte recruitment to the lungs has been well documented for intracellular pathogens like *Mycobacterium tuberculosis* (16) and *Listeria monocytogenes* (29, 40), only a few studies have focused on lymphocyte recruitment following infection with extracellular bacteria such as *S. pneumoniae* (14, 17). Moreover, there is limited data

on the interaction between innate and adaptive immune responses in the case of re-infections with that pathogen. Most studies on re-infection focused on secondary bacterial pneumonia after viral influenza (9, 33, 35) and on chronic infection with *Mycoplasma pneumoniae* (4) or *Pseudomonas aeruginosa* (27, 28).

The purpose of our study was to investigate the pathogenesis of pneumococcal re-infection in mice subjected to a primo-infection with *S. pneumoniae* of either serotype 3 or 14. We also sought to identify the lymphocyte populations recruited into alveolar spaces following infection or re-infection with *S. pneumoniae* and to foresee their role in host response to that pathogen.

### 3.4. Material and methods

#### Reagents

Ceftriaxone (Roche, Mississauga, ON) was used in our protocol of re-infection experiments to ensure survival after the primo-infection. Monoclonal anti-MCP-1, anti-MIP-2, anti-TNF-alpha, anti-IL-10, anti-IL-12p40, and anti-IFN-gamma antibodies for ELISA were purchased from Cedarlane Laboratories Ltd (Hornby, ON). Biotinylated goat anti-chemokine and cytokines antibodies, and mouse recombinant chemokines and cytokines were all from Cedarlane.

#### Animals

Female CD1 Swiss mice weighing 18-20g (Charles River, St-Constant, Quebec, Canada) were used in all experiments. All animals were maintained on a standard chow pellet diet with tap water *ad libitum* and exposed to standardized 12 h light/dark cycles. All experimental procedures were approved by the Laval University animal protection committee and were conducted in compliance with the guidelines of the Canadian council on animal care.

#### Bacteria

Clinical isolates of penicillin-susceptible *S. pneumoniae* serotype 3 and serotype 14 strains were used. They were first grown on blood agar for 7-8 h then freshly grown colonies were incubated in brain heart infusion at 37°C 5% CO<sub>2</sub> to reach log-phase of growth (optical density 600 nm at 0.4-0.6). Bacteria were harvested by centrifugation (2400 x g for 15 min), washed twice, and then resuspended in cold phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 at appropriate concentration for inoculation to mice. Serial 10-fold dilutions were plated on blood agar to confirm the final concentration of bacterial inoculum.

### **Pneumococcal pneumonia model**

Our well established murine model of pneumococcal pneumonia was used in this study (2). Briefly, mice were lightly anaesthetized by inhalation of 2-3 % isoflurane and were then infected with  $10^6$  CFU of *Streptococcus pneumoniae* which were contained in 50  $\mu$ L of PBS that were applied at the tip of the nose and involuntarily inhaled. In this model, 100% of the mice were reported to die within 4-5 days after serotype 3 infection in the absence of antibiotic (2).

### **Re-infection experiments**

These experiments were designed to investigate the pathogenesis of bacterial pneumonia in mice exposed to repeated infection with pneumococci from similar or different serotypes. More specifically, the innate and acquired immune responses were analysed shortly and lately after primary or secondary infection to better understand the impact of prior exposure to pneumococci on host response to re-infection. Four experimental groups were designed (**Figure 1**): group 1 of mice were infected with a severely virulent serotype 3 pneumococcal strain as described, thus were treated with ceftriaxone (10 mg/kg i.v.) at 48, 60, 72, 96 and 120h post-first infection to allow survival of animals until the re-infection. Similar size of inoculum of the same serotype 3 strain was used to re-infect mice 28 days after the first infection, at a time when PMNs in BALF and levels of inflammatory mediators has come down to pre-infection values and when lungs were sterile. Six animals per time-point were then sacrificed either at 6, 24, 48 and 72h after the second infection to investigate the early host response (mainly innate but also acquired immune status), or on days 7, 15 and 21 to analyze the late response (mainly cellular and humoral status).

Group 2 of mice were first infected with a low virulent serotype 14 strain of pneumococcus that induced self-resolving pneumonia that didn't require antibiotic treatment until re-infection with serotype 3 strain.

Group 3 and 4 were used as controls and received single-infection with serotype 3 pneumococcus. Animals from group 3 were sacrificed at 6, 24, 48 and 72h to investigate the early host response, while animals from group 4 were sacrificed on days 7, 15 and 21 to evaluate the late response. It is to be noted that the latter group (group 4) had to receive

ceftriaxone to ensure survival until these days, while antibiotic was not requested after the second infection in groups 1 and 2 since all of those animals survived.

At indicated time-points, six mice for every group were sacrificed by cervical dislocation. BALF was sampled to quantify leukocytes as previously described (2). Briefly, the trachea was exposed and intubated with a 22G1 sterile catheter and lungs were then washed three times with 0.7 mL of PBS. BALF were centrifuged at 750 x g for 10 min. and supernatants were stored at -20°C until evaluation of the cytokines/chemokines by sandwich ELISA. Pellets were resuspended in PBS for total cell counts with an automated cell counter (Cell-Dyn 3700, Abbott) and for differential counts with Diff-Quick-stained (VWR) cytopspin preparations. Then small pieces of the upper part of the left lung were kept for electron microscopy and the remaining tissue was homogenized and centrifuged to quantify bacteria and inflammatory mediators. Bacterial counts were also determined in lung tissue and blood (obtained by cardiac puncture) by plating serial ten-fold dilutions on blood agar. To further characterize the acquired immune response, BALF from six mice were pooled on days 3 and 7 for FACS analysis of lymphocyte populations. Antibody titers were also determined in serum according to standard methodology, as described below.

#### **Determination of chemokine and cytokine protein expression**

Sandwich ELISA was established for MIP-2, MCP-1, TNF-alpha, IL-10, IL-12p40 and IFN-gamma to detect these chemokines and cytokines in the supernatant of lung homogenates. Ninety-six well plates (Maxisorp, NUNC) were coated with monoclonal, anti-MIP-2, anti-MCP-1, anti-TNF-alpha, anti-IL-10, anti-IL-12p40, or anti-IFN-gamma antibodies in Dulbecco's PBS (DPBS, pH 7.4) for 16-18 h at 4°C. The plates were then blocked by incubation with DPBS-5% BSA for 2 h at room temperature. After three washes with DPBS-0.05% Tween-20 buffer, lung homogenate supernatants or recombinant mouse chemokines and cytokines (for standard curves) were diluted with DPBS-2% BSA and incubated for 2 h at room temperature. Plates were washed three times with wash buffer, followed by addition of the corresponding biotinylated goat anti-mouse chemokine/cytokine antibody (Cedarlane) and then incubated for 1 h at room temperature. Then, after washing, poly-HRPO-Streptavidin (RDI) diluted 1:4000 in PBS-2% BSA-0.05% Tween-20 was added and incubated for 45 min at room temperature in the dark.

Plates were washed again three times, tetramethylbenzidine substrate solution (TMB-S, from RDI) was added and incubated in the dark at room temperature for 10-30 min. The reaction was stopped by adding 0.18M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and plates were read at 450 nm in an automated plate reader.

### **IgG determination**

Serum total IgG production against *S. pneumoniae* was determined by ELISA. Briefly, 96-well plates (Maxisorp, NUNC) were coated with heat-killed *S. pneumoniae* ( $1 \times 10^7$  CFU/mL in PBS, pH 7.4) for 16-18h at 4°C. The plates were then blocked by incubation with DPBS-5% BSA for 2 h at room temperature. After three washes with DPBS-0.05% Tween-20 buffer, serum samples and recombinant mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) were diluted with DPBS-2% BSA and incubated for 2 hours at room temperature. Plates were washed three times, followed by addition of the corresponding peroxidase-conjugated rat anti-mouse antibody (Serotec) and then incubated for 1 h at room temperature. After three washes, TMB-S solution was added and incubated 10 min. The reaction was stopped with 0.18M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the absorbance at 450 nm was read in an automated plate reader.

### **Flow cytometry for identification of leukocytes in BAL fluid**

The cellular phenotype of bronchoalveolar lavage (BAL) leukocytes was monitored by flow cytometry. At indicated times, mice were sacrificed as previously described and BAL was performed with 7 x 0.7 mL of ice-cold PBS-20 mM EDTA. BAL fluids of six mice were pooled for each experimental group. Red blood cells were lysed in water, then BAL leukocytes were washed and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.5% BSA (FACS buffer). Total leukocyte counts were determined with an automated cell counter (Cell-Dyn 3700, Abbott) and concentration was adjusted to  $2 \times 10^6$ /mL in FACS buffer. Fc receptors were blocked by the addition of unlabeled anti-CD16/32 (Fc Block, clone 2.4G2, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) 6 µg/mL for 10 min at 4°C. For staining,  $2 \times 10^5$  cells were then stained (in the dark) in a V-bottom 96-well plate (NUNC, VWR International, Mississauga, ON) with the appropriate fluorochrome-labeled antibodies in a total volume of 100 µL. After 30 min at 4°C, the cells were washed three

times with FACS buffer, recovered in 500  $\mu$ L of FACS buffer and analyzed with an EPICS XL apparatus (Coulter Corp., Miami, FL) using the Expo32 software. The following monoclonal antibodies were used: PE-labeled anti-mouse CD3 (1.25  $\mu$ g/mL, clone 17A2, Cedarlane, Hornby, ON); FITC-labeled anti-mouse CD4 (2.5  $\mu$ g/mL, clone GK1.5, Cedarlane, Hornby, ON), FITC-labeled anti-mouse CD8 $\alpha$  (2.5  $\mu$ g/mL, clone 53-6.7, Cedarlane, Hornby, ON); PE-Cy5-labeled anti-mouse CD45 (10  $\mu$ g/mL, clone 30-F11, BD Biosciences Pharmingen), FITC-labeled anti-mouse B220 (2.5  $\mu$ g/mL, clone RA3-6B2, Cedarlane, Hornby, ON). Rat IgG2a-FITC, rat IgG2b-FITC and rat IgG2b-PE 1.25  $\mu$ g/mL (from Cedarlane, Hornby, ON) were used as isotype controls. All antibodies were previously titrated to determine the optimal staining conditions. For subset frequencies, lymphocytes were identified by gating of CD45<sup>+</sup> events against side scatter (SSC, log scale) and a tight gate placed around the low SSC lymphocytes in which a total of 10 000 events were counted. Subsets of T lymphocytes were identified by CD3 and CD4 or CD8, while B lymphocytes were identified using B220 antigen. CD45<sup>+</sup>/SSC gate includes the vast majority of lymphocytes in BAL fluid while excluding most of the non-lymphoid cells (epithelial cells and debris) that contaminate the conventional FS/SS gate. The percentage of lymphocyte subsets were calculated as the number of gated events divided by the total number of events, and then converted in cell concentration using the initial leukocyte count and volume from pooled BAL.

### **Electron microscopy**

Lungs were perfused with 5 mL PBS injected via the right ventricle of the heart and were dissected. Small pieces from the upper part of the left lung were cut and immediately fixed in 2% glutaraldéhyde (in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4) overnight at 4°C. Specimens were rinsed in 0.1 M phosphate buffer and postfixed by incubation for 1h at room temperature in 1% osmium tetroxide (in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4). The specimens were dehydrated in an ascending series of alcohol followed by propylene oxide and embedded in EPON (JEMBED 812) resin according to standard methodology. Semithin sections were placed on glass slides, stained with toluidine/methylene blue, and examined in a light microscope to select the most representative region. Ultrathin sections were cut and contrasted with uranyl acetate followed by lead citrate and examined in a JEOL (JEM-1010) transmission electron microscope at 80kV.

**Statistical analysis**

All data are expressed as means  $\pm$  SEM. Statistical analysis were performed using a two-tailed, unpaired t-test for PMN counts and one-way ANOVA (Tukey's post-test) for cytokine/chemokine levels. Bacterial counts were analyzed using the non-parametric Kruskal-Wallis (Dunn's post-test).  $P < 0.05$  was considered to be significant.

### 3.5. Results

We studied the impact of a re-infection with serotype 3 *S. pneumoniae* on early and late immune response. Two groups of CDI mice were compared. The first group (double infection group) was first infected with serotype 3 or serotype 14 and re-infected with serotype 3 28 days after the first infection. Mice were then sacrificed at time 6, 24, 48 and 72h (early response) or 7, 15 or 21 days (late response) after the second infection. The second group (single infection group) was infected once with serotype 3 and sacrificed at 6, 24, 48 and 72h or 7, 15 and 21 days after the infection.

#### **Bacterial load in lung tissue homogenates**

**Figure 2** shows bacterial concentration in lung tissue of mice infected once with serotype 3 (Ser.3) or first infected with serotype 3 or 14 followed with serotype 3 28 days later (3-3 and 14-3). Following one infection with serotype 3, bacterial concentration increased with time reaching  $4 \times 10^6$  CFU/mL at 72 hours thus reflecting a considerable pulmonary bacterial growth. Following re-infection with serotype 3, bacterial growth decreased significantly compared to singly-infected group (Ser.3). Mice first infected with serotype 14 then with serotype 3 showed quite similar pattern of lung bacterial concentration over time than the double-serotype 3 group but both group were not significantly different except at 6h. Bacteria in blood started to appear 48 hours after one infection with serotype 3 reaching  $2.68 \times 10^6$  CFU/mL at 72 hours, but were never detected after a second infection with the same bacterial strain (data not shown). Septicemic mice represented 33% at 48 hours reaching 50% at 72 hours. Bacteria in blood of mice first infected with serotype 14 then with serotype 3 were not detected (data not shown).

#### **Inflammatory cells**

Recruitment of inflammatory cells into alveolar spaces was monitored over time. **Figure 3A** illustrates the time-course of leukocytes recruitment following an infection with serotype 3 *S. pneumoniae*. In non-infected mice, PMNs were never seen in BALF. However, after infection with serotype 3 *S. pneumoniae* (as with serotype 14), PMNs were

rapidly recruited to alveolar spaces as demonstrated 6h post-infection. Thereafter, PMNs concentration increased significantly to reach a maximum level at 24h and a low level from 48h to 72h. Monocytes /macrophages and lymphocytes levels increased gradually from 6h to 72h. The effect of re-infection on BALF leukocytes was only seen for PMNs. Indeed, both double-infected groups displayed significantly in lower PMN concentration than single-infected group at 24h (**Figure 3B and 3C**). Compared to single-infected group, PMN concentration decreased by half (from  $1.3$  to  $0.6 \times 10^5$ /mL of BALF) in the 3-3 double-infected group at 24h but remained almost stable to  $0.6 \times 10^5$ /mL of BALF over time for the 14-3 group. On the other hand, monocytes/macrophages and lymphocytes from double-infected groups displayed the same profile than single-infected group. Monocytes/macrophages and lymphocytes levels increased gradually from 6h to 72h in the S-inf and D-inf groups (**Figure 3B and 3C**).

### **Lymphocytes recruitment into alveolar spaces**

Our previous observations demonstrated that 72 hours following pneumococcal infection, lymphocytes were recruited to alveolar spaces (**Figure 3A**). We were then interested to characterize lymphocyte subtypes and their relative proportions in our context of pulmonary infection with an extracellular encapsulated bacteria. **Figure 4** shows lymphocytes populations recovered in BALF of single-infected (Ser.3) and serotype 3 double-infected (3-3) groups. Three days after one infection with serotype 3, subtypes of lymphocyte were equally represented in BALF giving a CD4/CD8 ratio of 1.0 (**Figure 4A**). After a second infection with the same serotype, the level of total CD3+ lymphocytes doubled going from  $3.59$  to  $8.88 \times 10^3$ /mL of BALF. CD4<sup>+</sup> T-helper lymphocytes were then the most important subtype giving a CD4/CD8 ratio of 1.64. On day 7 (**Figure 4B**), an important reduction of total CD3+ T cells concentration was observed for the single-infected group although the CD4/CD8 ratio increased from 1.0 to 1.67. The 3-3 group had we a similar distribution of lymphocyte subtypes that at day 3 but also at lower level. On day 14 post-infection (data not shown), the level of total leukocyte was returned to baseline (as uninfected mice) and contained almost exclusively alveolar macrophages. Hence, lymphocyte recruitment was only seen early after infection with *S. pneumoniae* and did not seem to persist over time. Finally, FACS analysis of lymphocyte subtypes for the 14-3

group gave a similar pattern of distribution but lower concentration than the 3-3 group (data not shown).

### **Inflammatory mediators in lung homogenates**

Inflammatory mediator levels are reported for early response (**Figure 5**) and late response (**Figure 6**). Early response (**Figure 5**) revealed that major impact of re-infection was seen on MCP-1, MIP-2 and IL-10 levels. Indeed, these inflammatory mediators were significantly lower after re-infection compared to the single-infected group at any time regardless of which serotype was used for primary infection. Concerning TNF-alpha and IFN-gamma, re-infection didn't have significant influence. However, changes were mostly detected while comparing both double-infected groups. IL-12p40 levels were however not modified following re-infection or according to serotype used for primary infection.

Late response (**Figure 6**) revealed similar results than the early response for TNF-alpha and IL-12p40 levels. Indeed, TNF-alpha was significantly dependent on the first-infection serotype (**Figure 6A**) while IL-12p40 has not shown detectable changes except at day 21. For its part, IFN-gamma began to be significantly lower at day 15 for the 3-3 group compared to the 14-3 group. Interestingly, IL-10 levels demonstrated a different behaviour in late response than in early response. Here, only the 3-3 group was significantly lower than the single-infected group from day 3 to 21 post-infection.

### **Anti-pneumococcal antibody in serum**

*S. pneumoniae*-specific IgG levels were measured in serum to determine the host humoral response to pneumococcal re-infection. Following one pneumococcal infection, a strong IgG response was observed at day 15 and 21 post-infection. However, a quicker and more robust IgG response was developed after the second infection with serotype 3 peaking at day 15 (**Figure 7A**). When mice were infected with serotype 14 and then with serotype 3, specific antibody production was much weaker being approximately half of the 3-3 group (**Figure 7B**). However, it should be noted that the concentration of serotype 14-specific antibody was significantly higher than that of the serotype 3, despite the fact that serotype 14 was used for primary infection.

### Microscopic examination of lung tissue

**Figure 8** shows lung histology of normal mice (A) and infected mice (B to G). Normal lungs were characterized by thin alveolar walls with pneumocytes and macrophages (A). Moreover, alveolar spaces were free of cells thus allowing optimal gas exchange. Infection with serotype 3 *S. pneumoniae* filled alveolar spaces with numerous inflammatory cells mostly PMNs (see arrows) as early as few hours post-infection and even until 72h (B). Twenty-eight days post-infection (C), at the time of second infection, lung architecture didn't seem to have completely recovered from first infection. Indeed, alveolar spaces were not completely free of cells although PMNs were not present. Three days following re-infection with serotype 3 (D), alveolar walls were strongly thickened mostly due to edema and inflammatory cells.

Infection with serotype 14 *S. pneumoniae* showed that after 72h, alveolar spaces were similar to that of a normal lung (E). PMNs were not seen at this time as it was the case 72h after an infection with serotype 3. Twenty-eight days post-infection with serotype 14 (F), no major changes were noted compared to 72h. Three days following re-infection (14-3 group) (G), alveolar walls were slightly thickened but as much as for the serotype 3 double-infected group (D).

### 3.6. Discussion

Pneumococcal pneumonia is still a life-threatening disease among community, especially for children and elderly adults, despite the development of potent antibiotics (5) and efficient vaccines (6, 10). Moreover, bacterial pneumoniae is a frequent complication of influenza often leading to death (33). Hence, co-infections and secondary pneumonia represent a serious health problem within community but also among in-patients. Most studies are linked to bacterial re-infection after influenza (22, 32, 34), cystic fibrosis patients with chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infections (25) or repeated respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infections (4). To our knowledge, our study is the first which examined the effect of double infection with *S. pneumoniae*. Hence, the aim of the present study was to investigate the effect of pulmonary re-infection with *Streptococcus pneumoniae* on early and late immune response after a primary infection with two different pneumococcal serotypes: either a highly virulent serotype 3 (P4241), or a less virulent serotype 14 (clinical isolate). We found that after re-infection, innate immune response was significantly reduced although the level of inflammation remained high, regardless which serotype induced the first infection. Otherwise, late immune response seems to depend on initial serotype to lead to a better control of the disease.

Immunization with conjugate vaccines have already shown to induce an increased bacterial clearance and antibodies production after intranasal challenge with live organisms (12, 18). Similarly, following re-infection with serotype 3 *S. pneumoniae*, we observed a significant increase of bacterial clearance in lungs although more pronounced when serotype 3 was used for primary infection compared to serotype 14. In a mouse model of *Mycoplasma pulmonis* respiratory disease, it has been shown that site of deposition of antigen has a great influence on humoral immune response and on related protective immunity (11). Intranasal challenge generates high levels of mycoplasma-specific IgA in nasal washes whereas pulmonary exposure resulted in equivalent antigen-specific IgA and IgG in the systemic circulation. Moreover, in resting lungs, IgG predominates in the lower respiratory tract (LRT) while the upper respiratory tract (URT) contains a higher proportion of IgA (35). Preliminary studies allowed us to demonstrate that 72% of *S. pneumoniae* serotype 3 and 12% of serotype 14 administered intranasally were recovered in lung tissue 15 minutes

later. Hence, we can suppose that serotype 14 mostly induced mucosal immunity in the URT thus generating specific IgA locally, while serotype 3 by reaching the LRT more efficiently could induce a more systemic response and the production of specific IgG. Thus primary infection with serotype 3 followed by re-infection with serotype 3 which has generated a strong IgG production in serum, could offer an excellent pulmonary protection. Indeed, IgG produced at the systemic level can diffuse passively into the epithelial lining fluid in the lung (35). These antibodies have excellent opsonizing and complement activating properties that help phagocytes in clearing bacteria. The observed reduction of lung bacterial concentration for this double-infected group could not be ascribed to the antibiotic treatments since no treatment was administered following the second infection. Otherwise, first infection with serotype 14 could have induced a strong immune response in the URT including IgA production and to a lesser extent IgG. Then, a stronger IgA than IgG response might have reduced the level of IgG-mediated opsonophagocytosis in lung, thus allowing growth of serotype 3 in alveolar spaces coming afterwards. Indeed, lung bacterial concentration in the serotype 14-serotype 3 double-infected group remains similar to the singly-infected group according to time post-infection except at 72h.

Re-infection has also affected alveolar recruitment of leukocytes, especially neutrophils. Compared to serotype 3 singly-infected group, both double-infected groups have significantly reduced neutrophil concentrations in BALF 24 hours post-infection. Although the serotype 14-serotype 3 group had similar levels of neutrophils than the serotype 3-serotype 3 group, they displayed quite different kinetics over time linked to a significant decrease of MIP-2 in lung tissue. We also observed a marked reduction in MCP-1, a chemokine known to be implicated in monocyte recruitment, which is related to a slight downward trend of alveolar macrophages recovered in BALF for both double-infected groups. Finally, re-infection also induced a significant reduction in pulmonary IL-10 whereas TNF-alpha levels were not significantly different compared to serotype 3 singly-infected group. These results suggest that anti-inflammatory mechanisms generally related to IL-10 production didn't seem to be induced, thus leading to a badly contained pulmonary inflammation. A recent study which investigated the protection mechanism induced by the 23-valent polysaccharide pneumonia vaccine prior to intratracheal challenge with live *S.*

*pneumoniae* serotype 3 (strain P4241) or serotype 19F also revealed a reduction of inflammatory cytokines response induced with the P4241 strain following vaccination (24). A distinct cytokine profile was also observed depending upon the two strains of *S. pneumoniae* used for challenge.

Lymphocytes recruitment to alveolar spaces was also demonstrated in our study. Substantial evidence suggest that pneumolysin, an important virulence factor in pneumococcal pneumonia, would play a predominant role in T cells recruitment to lung as revealed in studies using a pneumolysin-deficient pneumococci (13, 14). In the serotype 3 singly-infected group, lymphocyte immigration reached a significant level starting from 48 hours post-infection as determined by manual counts (Fig. 3). FACS analysis revealed that the maximum level of total CD3<sup>+</sup> lymphocytes might be around 72 hours post-infection since at day 7 their concentration in BALF was reduced (Fig. 3B). Interestingly, although total CD3<sup>+</sup> lymphocytes decreased with time, the CD4/CD8 ratio was increased to 1.64. This suggests a considerable role of these lymphocytes in immune defense against *S. pneumoniae* in addition to humoral immunity in our murine model. Humoral immune response is well known to be implicated in immunity to extracellular bacteria facilitating their phagocytosis by phagocytic cells. However, recent studies highlighted the important role of T cells. Indeed, Malley et al. (19) showed that immunity to pneumococcal colonization could be induced in the absence of antibody, independent of the serotype, and this protection required the presence of CD4<sup>+</sup> T cells at the time of the challenge. In the same way, another work using a murine pneumonia model has concluded that both innate and CD4<sup>+</sup> T-cell-mediated immunity are important to eliminate *S. pneumoniae* from nasopharynx, rather than humoral immune response (37). However, in our case, further studies must be done to characterize the detailed implication of lymphocytes and antibodies in our pneumonia model.

Our results have demonstrated that re-infection led to a reduction of innate immune mechanisms described here as early immune response, compared to singly-infection. Early response after re-infection also revealed that the serotype used for primary infection didn't seem to have a strong impact. However, by comparing both double-infected groups, our

results suggest that when serotype 14 was used first and then serotype 3, lymphocyte recruitment and cytokine profile were quite different. In the serotype 3-serotype 3 group, total CD3<sup>+</sup> T cells doubled (day 3 post-infection) compared with serotype 3 group alone, increase which was mainly represented by CD4<sup>+</sup> T cells. In the serotype 14-serotype 3 group the same behavior was displayed but with less intensity. We can suggest that this might be related to the limited capacity of serotype 14 *S. pneumoniae* to reach lung and to stimulate pulmonary immune response. However, once more, this result lets suppose an important role of T cells in our model.

As for early immune response, a primary infection with serotype 14 led to a lower TNF production in lung than following a primary infection with serotype 3 at longer times (Fig. 6A). On the contrary, it is interesting to notice that IL-10 concentrations were always significantly higher when serotype 14 compared to serotype 3 was used first. Together, these results strongly suggest that a primary infection with a less virulent strain generate a lower level of inflammation over time, and that this inflammation seems better contained. Electron microscopic evaluation is in accordance with these results as we have observed a better preservation of lung architecture without apparent excessive edema in the serotype 14 - serotype 3 double-infected group (Fig. 8G compared to 8D). As for TNF production, IFN-gamma was also reduced when serotype 14 came first but only 15 days after the serotype 3 infection. This phenomenon was also seen in early response, beginning at 24 hours. Although IL-12p40 (known as an IFN inducer) remained generally unchanged, the higher level of IFN-gamma seen in the 14-3 group suggests that there is a tendency toward Th1-type immunity. T helper 1 (Th1) cells promote a protective cell-mediated immune response through the production of IL-12 and IFN rather than a humoral response, which could explain in part the lower IgG levels measured in serum.

Specific pneumococcal antibodies produced in serum were higher following single infection with serotype 3 *S. pneumoniae* compared to serotype 14 (data not shown). This is probably related to the lower capacity of serotype 14 to reach the lung (as mentioned above) and thus being probably more potent to produce IgA in the URT rather than IgG in serum. After re-infection, the 3-3 group generates a rapid and strong IgG response higher

than the singly-infected group suggesting that the resident memory B cells could have been stimulated. This is in accordance with Rabquer et al. (30) who demonstrated that pneumococcal colonization stimulates the production of memory B cells which contribute to an enhanced immune response to subsequent vaccination. Moreover, the observed transient boost could be in part explained by the pneumococcal protein antigens like surface protein A and the phosphorylcholine determinant of the cell wall C-polysaccharide that require T-cell help (T-dependent antigens) for antibody production (17). At the opposite, capsular polysaccharides of *S. pneumoniae* which are T-cell independent type 2 (TI-2) antigens, stimulate antibody production directly by activating mature B cells without the need for T-cell help. Finally, after re-infection, the 14-3 group also generates a quite good pneumococcal antibody response. Interestingly, the level of anti-serotype 14 antibodies was significantly higher than anti-serotype 3 antibodies although the serotype 14 was used for the primary infection. Further experiments are needed to explain this point.

In conclusion, we have shown that a primary infection with a less virulent strain of *S. pneumoniae* (like serotype 14) seems to offer a better protection against re-infection. We propose that this may be due to a priming of immune system that generate a good level of antibody (although lower than with serotype 3) and a much lower degree of inflammation. Although much remains to be determined about the events described above, this study highlights some important aspects that will help to understand the immune response following multiple pneumococcal infections as we can see in the community.

### **3.7. Acknowledgments**

This study was supported by grant # CIHR-MOP-57744 of the Canadian Institutes of Health Research.

We acknowledge the contribution of the Gene Quantification core laboratory of the Centre de Génomique de Québec.

We thank D. M. Dufour for technical assistance in flow cytometry studies and Marie-Christine Dumas for skillful assistance.

### 3.8. References

1. **Beiter, K., F. Wartha, B. Albiger, S. Normark, A. Zychlinsky, and B. Henriques-Normark.** 2006. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* **16**:401-407.
2. **Bergeron, Y., N. Ouellet, A. M. Deslauriers, M. Simard, M. Olivier, and M. G. Bergeron.** 1998. Cytokine kinetics and other host factors in response to pneumococcal pulmonary infection in mice. *Infect Immun* **66**:912-922.
3. **Bogaert, D., R. De Groot, and P. W. Hermans.** 2004. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* **4**:144-154.
4. **Chu, H. W., R. Breed, J. G. Rino, R. J. Harbeck, M. R. Sills, and R. J. Martin.** 2006. Repeated respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infections in mice: effect of host genetic background. *Microbes Infect* **8**:1764-1772.
5. **Feikin, D. R., A. Schuchat, M. Kolczak, N. L. Barrett, L. H. Harrison, L. Lefkowitz, A. McGeer, M. M. Farley, D. J. Vugia, C. Lexau, K. R. Stefonek, J. E. Patterson, and J. H. Jorgensen.** 2000. Mortality from invasive pneumococcal pneumonia in the era of antibiotic resistance, 1995-1997. *Am J Public Health* **90**:223-229.
6. **Ghaffar, F.** 2005. The safety of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Expert Opin Drug Saf* **4**:631-636.
7. **Gillespie, S. H., and I. Balakrishnan.** 2000. Pathogenesis of pneumococcal infection. *J Med Microbiol* **49**:1057-1067.
8. **Hausdorff, W. P., D. R. Feikin, and K. P. Klugman.** 2005. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. *Lancet Infect Dis* **5**:83-93.

9. **Hayashi, K., S. E. Kadowaki, M. Takei, and H. Fukuda.** 2006. Efficacy of quinolones against secondary pneumococcal pneumonia after influenza virus infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:748-751.
10. **Ho, C. F., and T. Y. Lin.** 2005. Pneumococcal vaccines. *Chang Gung Med J* **28**:765-772.
11. **Hodge, L. M., and J. W. Simecka.** 2002. Role of upper and lower respiratory tract immunity in resistance to *Mycoplasma* respiratory disease. *J Infect Dis* **186**:290-294.
12. **Jiao, X., T. Hirano, Y. Hou, and X. X. Gu.** 2002. Specific immune responses and enhancement of murine pulmonary clearance of *Moraxella catarrhalis* by intranasal immunization with a detoxified lipooligosaccharide conjugate vaccine. *Infect Immun* **70**:5982-5989.
13. **Kadioglu, A., W. Coward, M. J. Colston, C. R. Hewitt, and P. W. Andrew.** 2004. CD4-T-lymphocyte interactions with pneumolysin and pneumococci suggest a crucial protective role in the host response to pneumococcal infection. *Infect Immun* **72**:2689-2697.
14. **Kadioglu, A., N. A. Gingles, K. Grattan, A. Kerr, T. J. Mitchell, and P. W. Andrew.** 2000. Host cellular immune response to pneumococcal lung infection in mice. *Infect Immun* **68**:492-501.
15. **Kadioglu, A., S. Taylor, F. Iannelli, G. Pozzi, T. J. Mitchell, and P. W. Andrew.** 2002. Upper and lower respiratory tract infection by *Streptococcus pneumoniae* is affected by pneumolysin deficiency and differences in capsule type. *Infect Immun* **70**:2886-2890.
16. **Kahnert, A., U. E. Hopken, M. Stein, S. Bandermann, M. Lipp, and S. H. Kaufmann.** 2007. Mycobacterium tuberculosis triggers formation of lymphoid structure in murine lungs. *J Infect Dis* **195**:46-54.

17. **Kemp, K., H. Bruunsgaard, P. Skinhoj, and B. Klarlund Pedersen.** 2002. Pneumococcal infections in humans are associated with increased apoptosis and trafficking of type 1 cytokine-producing T cells. *Infect Immun* **70**:5019-5025.
18. **Khan, A. Q., A. Lees, and C. M. Snapper.** 2004. Differential regulation of IgG anti-capsular polysaccharide and antiprotein responses to intact *Streptococcus pneumoniae* in the presence of cognate CD4+ T cell help. *J Immunol* **172**:532-539.
19. **Lynch, J. M., D. E. Briles, and D. W. Metzger.** 2003. Increased protection against pneumococcal disease by mucosal administration of conjugate vaccine plus interleukin-12. *Infect Immun* **71**:4780-4788.
20. **Malley, R., K. Trzcinski, A. Srivastava, C. M. Thompson, P. W. Anderson, and M. Lipsitch.** 2005. CD4+ T cells mediate antibody-independent acquired immunity to pneumococcal colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:4848-4853.
21. **Mandell, L. A.** 1995. Community-acquired pneumonia. Etiology, epidemiology, and treatment. *Chest* **108**:35S-42S.
22. **McCool, T. L., and J. N. Weiser.** 2004. Limited role of antibody in clearance of *Streptococcus pneumoniae* in a murine model of colonization. *Infect Immun* **72**:5807-5813.
23. **McCullers, J. A.** 2004. Effect of antiviral treatment on the outcome of secondary bacterial pneumonia after influenza. *J Infect Dis* **190**:519-526.
24. **McNamee, L. A., and A. G. Harmsen.** 2006. Both influenza-induced neutrophil dysfunction and neutrophil-independent mechanisms contribute to increased susceptibility to a secondary *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun* **74**:6707-6721.

25. **Mizrachi-Nebenzahl, Y., S. Lifshitz, R. Teitelbaum, S. Novick, A. Levi, D. Benharroch, E. Ling, and R. Dagan.** 2003. Differential activation of the immune system by virulent *Streptococcus pneumoniae* strains determines recovery or death of the host. *Clin Exp Immunol* **134**:23-31.
26. **Mohler, J., P. Moine, E. Azoulay-Dupuis, D. Henin, and B. Fantin.** 2007. Polyvalent 23 epitope polysaccharide pneumonia vaccine induced effective protection through strain-adapted effector mechanisms as demonstrated by the different cytokine responses in mice challenged with two different strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Eur Cytokine Netw* **18**:18-25.
27. **Moser, C., H. P. Hougen, Z. Song, J. Rygaard, A. Kharazmi, and N. Hoiby.** 1999. Early immune response in susceptible and resistant mice strains with chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection determines the type of T-helper cell response. *Apmis* **107**:1093-1100.
28. **Moser, C., P. O. Jensen, O. Kobayashi, H. P. Hougen, Z. Song, J. Rygaard, A. Kharazmi, and H. b. N.** 2002. Improved outcome of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection is associated with induction of a Th1-dominated cytokine response. *Clin Exp Immunol* **127**:206-213.
29. **Munder, A., A. Zelmer, A. Schmiedl, K. E. Dittmar, M. Rohde, M. Dorsch, K. Otto, H. J. Hedrich, B. Tummler, S. Weiss, and T. Tschernig.** 2005. Murine pulmonary infection with *Listeria monocytogenes*: differential susceptibility of BALB/c, C57BL/6 and DBA/2 mice. *Microbes Infect* **7**:600-611.
30. **Nelson, A. L., A. M. Roche, J. M. Gould, K. Chim, A. J. Ratner, and J. N. Weiser.** 2007. Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infect Immun* **75**:83-90.
31. **Rabquer, B., A. K. Shriner, S. L. Smithson, and M. A. Westerink.** 2007. B cell mediated priming following pneumococcal colonization. *Vaccine* **25**:2036-2042.

32. **Samore, M. H., M. Lipsitch, S. C. Alder, B. Haddadin, G. Stoddard, J. Williamson, K. Sebastian, K. Carroll, O. Ergonul, Y. Carmeli, and M. A. Sande.** 2006. Mechanisms by which antibiotics promote dissemination of resistant pneumococci in human populations. *Am J Epidemiol* **163**:160-170.
33. **Seki, M., K. Yanagihara, Y. Higashiyama, Y. Fukuda, Y. Kaneko, H. Ohno, Y. Miyazaki, Y. Hirakata, K. Tomono, J. Kadota, T. Tashiro, and S. Kohno.** 2004. Immunokinetics in severe pneumonia due to influenza virus and bacteria coinfection in mice. *Eur Respir J* **24**:143-149.
34. **Simonsen, L.** 1999. The global impact of influenza on morbidity and mortality. *Vaccine* **17 Suppl 1**:S3-10.
35. **Smith, M. W., J. E. Schmidt, J. E. Rehg, C. J. Orihuela, and J. A. McCullers.** 2007. Induction of pro- and anti-inflammatory molecules in a mouse model of pneumococcal pneumonia after influenza. *Comp Med* **57**:82-89.
36. **St Sauver, J., C. F. Marrs, B. Foxman, P. Somsel, R. Madera, and J. R. Gilsdorf.** 2000. Risk factors for otitis media and carriage of multiple strains of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*. *Emerg Infect Dis* **6**:622-630.
37. **Twigg, H. L., 3rd.** 2005. Humoral immune defense (antibodies): recent advances. *Proc Am Thorac Soc* **2**:417-421.
38. **Urban, C. F., S. Lourido, and A. Zychlinsky.** 2006. How do microbes evade neutrophil killing? *Cell Microbiol* **8**:1687-1696.
39. **van Rossum, A. M., E. S. Lysenko, and J. N. Weiser.** 2005. Host and bacterial factors contributing to the clearance of colonization by *Streptococcus pneumoniae* in a murine model. *Infect Immun* **73**:7718-7726.

40. **White, D. W., V. P. Badovinac, X. Fan, and J. T. Harty.** 2000. Adaptive immunity against *Listeria monocytogenes* in the absence of type I tumor necrosis factor receptor p55. *Infect Immun* **68**:4470-4476.

### 3.9. Figure legends

**Figure 1.** Protocols of infection with *S. pneumoniae*. Four groups of CD1 mice were infected with  $10^6$  CFU of *S. pneumoniae*. Mice in groups 1 and 2 received *S. pneumoniae* serotype 3 or 14 at day 0 and serotype 3 at day 28. Mice in groups 3 and 4 (control groups) were infected only with the serotype 3, on the same day as the second infection in groups 1 and 2. Animals were sacrificed either at 6, 24, 48 or 72h (to study the early immune response) or at 7, 15 or 21 days (to study the late immune response) after the last infection. Since serotype 3 is a highly virulent strain and serotype 14 a poorly virulent one, ceftriaxone was required after initial infection in group 1 to ensure survival until the second infection, and in group 4 to allow the study of the late response. Ceftriaxone was not required after the second infection in groups 1 and 2 as these mice recover from illness and survived.

**Figure 2.** *S. pneumoniae* concentration in lung tissue homogenates of mice infected once with serotype 3 (Ser.3) or twice with successive serotypes (3--3 and 14--3) They represent respectively the groups 3, 1, and 2 in the experimental protocol. Data shown are mean of 6-12 values  $\pm$  SEM. † P<0.05 and †† P<0.01 compared to 3--3 group. \*\* P<0.01 compared to 14--3 group. ††† P<0.01 compared to 3--3 group.

**Figure 3.** Recruitment of inflammatory cells in BAL fluid after single (A) or double infection with  $10^6$  CFU of serotype 3 *S. pneumoniae* (B), and after double infection with serotype 14 followed by serotype 3 (C). Leukocyte populations were counted. Data shown are means of 6-12 values  $\pm$  SEM. \* P<0.05 for PMNs (Ser.3 group) compared to PMNs (3--3 and 14--3 group) at 24h. † P<0.05, †† P<0.01 and ††† P<0.001 compared to 6h post-infection.

**Figure 4.** Characterization of lymphocyte populations in BALF on day 3 (A) and day 7 (B) after single (Ser.3) or double infection (3--3) with  $10^6$  CFU serotype 3 *S. pneumoniae*.

Lymphocyte populations were discriminated by FACS on BALF pooled from six mice for each group. Data represent the value obtained from pooled BALFs.

**Figure 5.** Early immune response cytokines and chemokines in lungs of mice infected once with  $10^6$  CFU serotype 3 *S. pneumoniae* (Ser.3 group) or infected first with serotype 3 or serotype 14 then re-infected with serotype 3 (3--3 and 14--3 groups, respectively). TNF-alpha (A), IL-12p40 (B), IFN-gamma (C), MCP-1 (D), MIP-2 (E) and IL-10 (F). Data are means of 6-15 values  $\pm$  SEM. †P<0.05, ††P<0.01 and †††P<0.001 compared to 3--3 group. \* P<0.05, \*\* P<0.01 and \*\*\*P<0.001 compared to 14--3 group. ‡P<0.05 and ‡‡P<0.01 compared 3--3 to 14--3 group.

**Figure 6.** Late immune response cytokines in lungs of mice infected once with  $10^6$  CFU serotype 3 *S. pneumoniae* (Ser.3 group) or infected first with serotype 3 or serotype 14 then infected with serotype 3 (3--3 and 14--3 groups, respectively). TNF-alpha (A), IL-12p40 (B), IFN-gamma (C), and IL-10 (D). Data are means of 6-15 values  $\pm$  SEM. †P<0.05 and ††P<0.01 compared to 3--3 group. \*\* P<0.01 compared to 14--3 group. ‡P<0.05 and ‡‡P<0.01 compared 3--3 to 14--3 group.

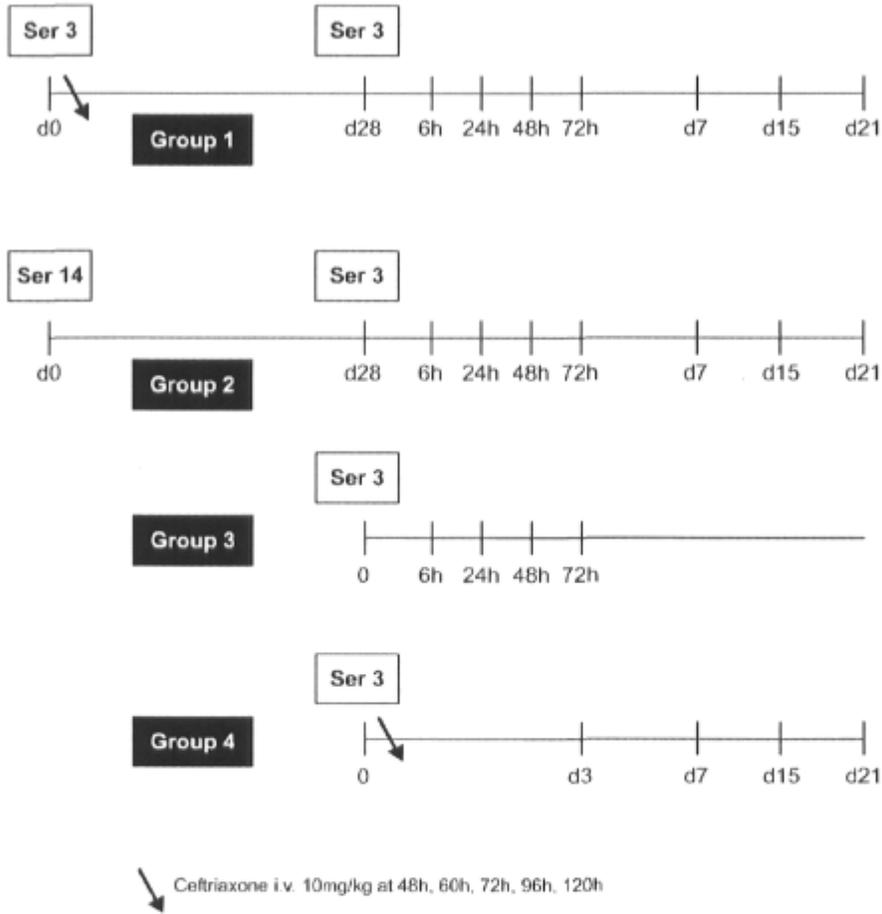
**Figure 7.** Pneumococcal IgG antibody concentrations in serum. Anti-serotype 3 specific antibodies were measured in mice infected once or twice with serotype 3 *S. pneumoniae* (A). Anti-serotype 3 and 14 specific antibodies were measured in mice first infected with serotype 14 then followed by serotype 3 *S. pneumoniae* re-infection (B). Data shown are means of 6-12 values  $\pm$  SEM for the indicated time after the second infection. \* P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 compared to serotype 3 group (A) or serotype 3 antibodies (B).

**Figure 8.** Electron microscopy of lung tissue from normal mice (A) and mice infected with  $10^6$  CFU *S. pneumoniae* (B to G). Mice were infected once with serotype 3 then sacrificed 72h (B) or 28 days(C). Mice infected twice with serotype 3 were sacrificed 72h after the second infection (D). Single-infected mice with serotype 14 were also sacrificed 72h (E) or 28 days post-infection (F). Mice first infected with serotype 14 followed by serotype 3 were

sacrificed 72h after the second infection (G). Magnification: 2000X (A,C,D,E,F,G) and 1500X (B). Arrows indicate PMNs recruited in alveolar spaces (B).

### 3.10. Figures

Figure 1



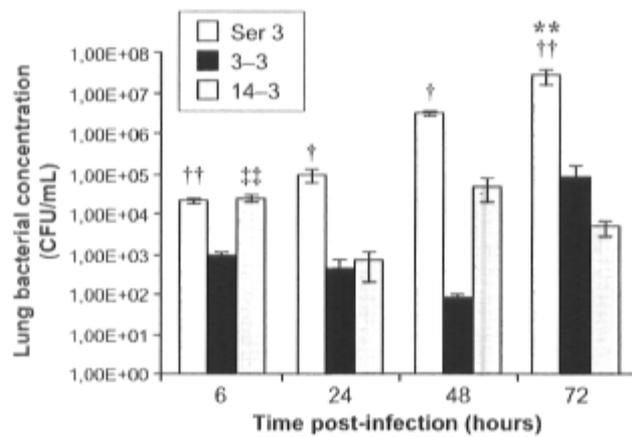
**Figure 2**

Figure 3

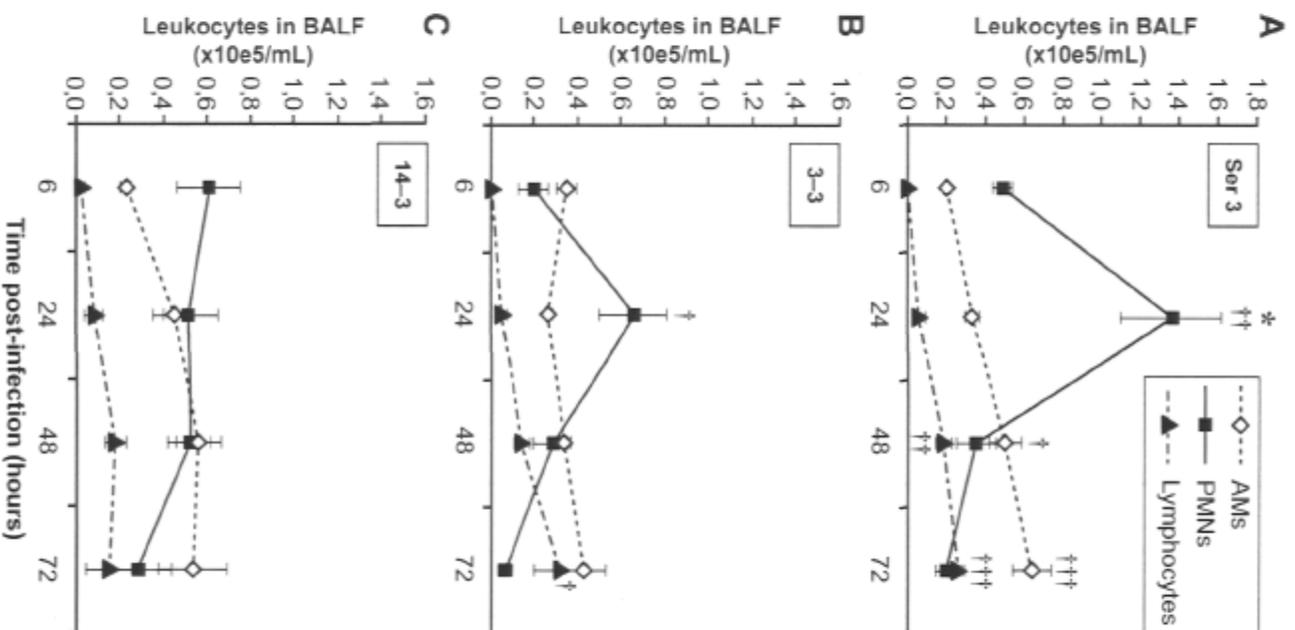


Figure 4

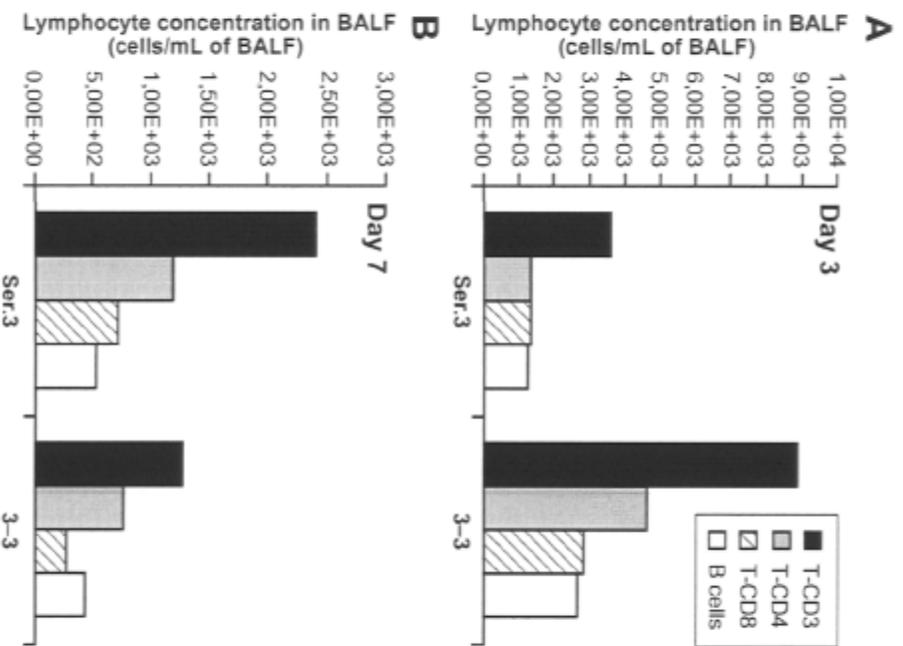


Figure 5

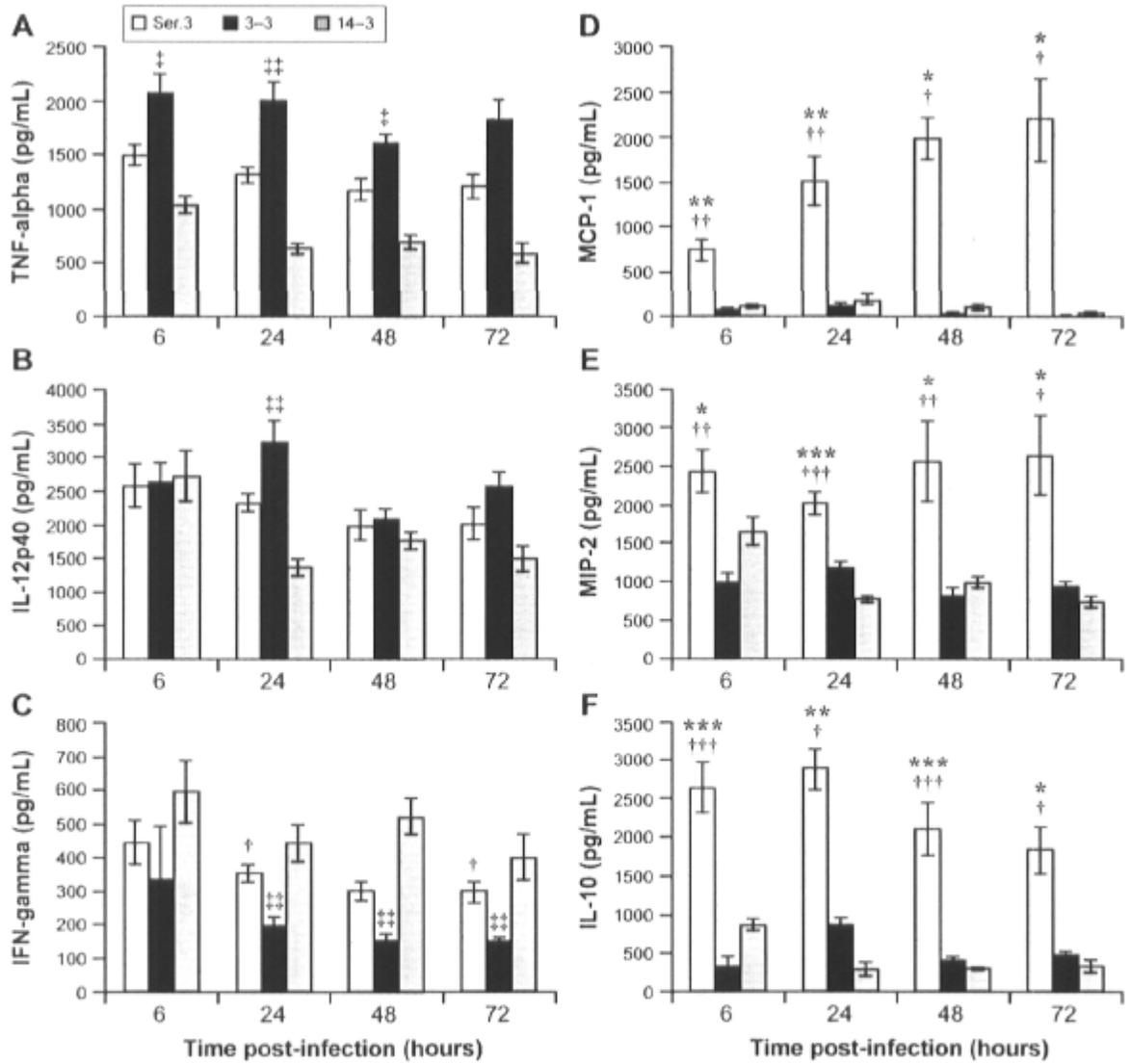


Figure 6

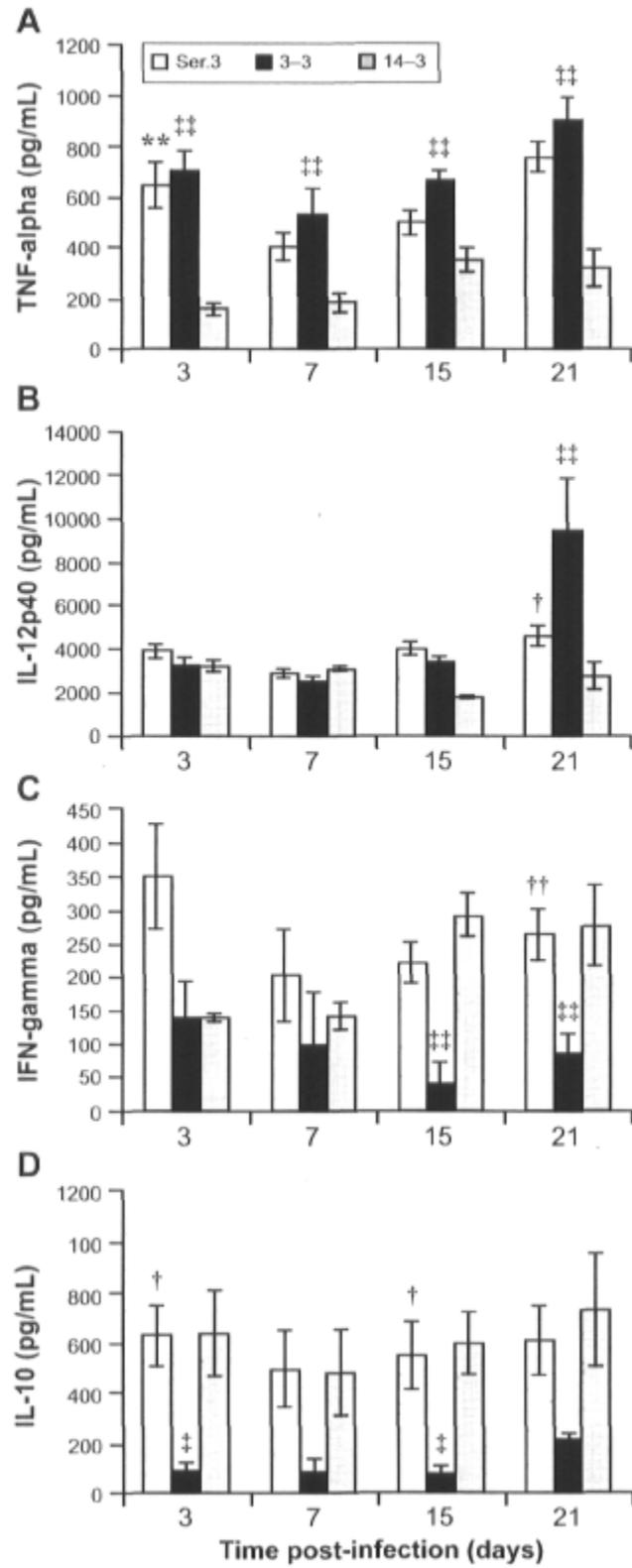


Figure 7

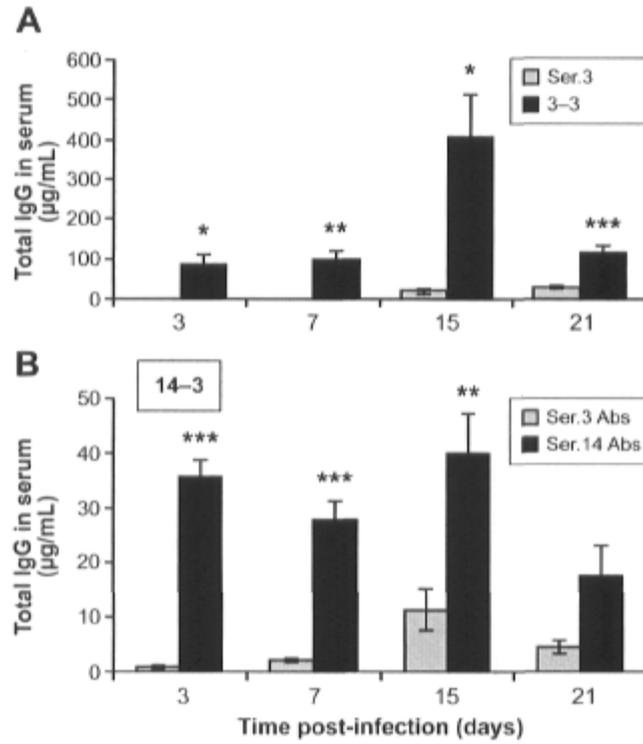
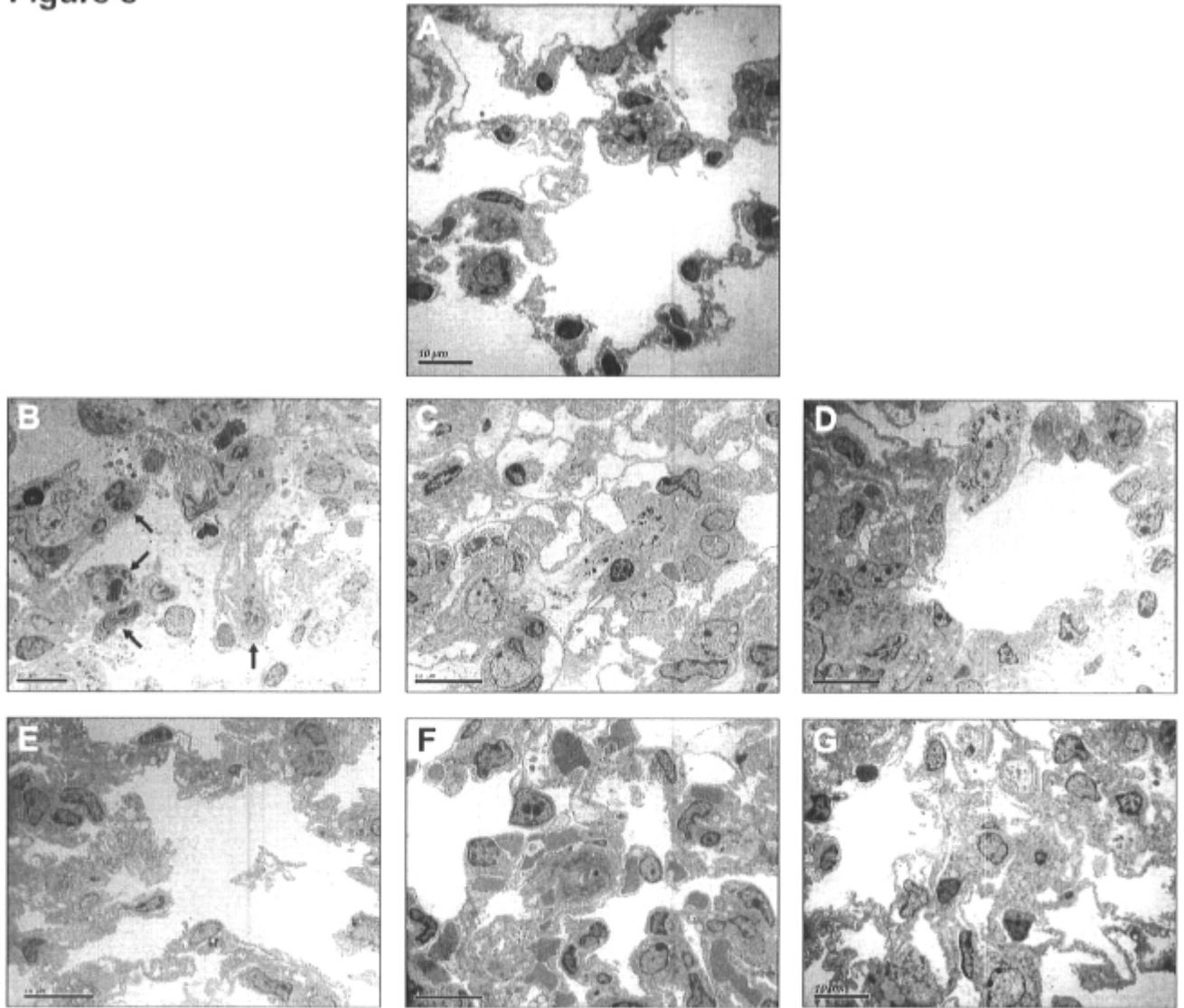


Figure 8



## **CHAPITRE IV Conclusion**

Les infections aiguës des voies respiratoires inférieures demeurent, à travers le monde, la cause la plus importante de décès attribuable à une infection. *Streptococcus pneumoniae* est responsable d'environ 30% de tous les cas de pneumonie extra-hospitalière (4). De plus, 90 sérotypes différents de ce pathogène existent et certains d'entre eux deviennent de plus en plus résistants aux antibiotiques. Le nasopharynx est le principal réservoir du pneumocoque et la source de contamination entre les individus. Puisqu'un nombre important de sérotypes ont été décrits, plus d'un peuvent être responsables de la pneumonie chez un individu. Certains sérotypes causent une infection plus sévère et peuvent même entraîner une septicémie (ex. sérotype 3) tandis que d'autres, bien qu'ils provoquent aussi une pneumonie, sont plus facilement éliminés par les défenses de l'hôte (ex. sérotype 14)(23). Pour toutes ces raisons, il devient important et même essentiel d'étudier davantage la physiopathologie de la pneumonie afin de mieux contrôler la progression de la maladie.

Même si une quantité étonnante d'études scientifiques ont été réalisées sur le pneumocoque et sur les infections qu'il cause, il existe encore des lacunes dans la compréhension des mécanismes responsables de l'orchestration de la défense de l'hôte tant au niveau de les immunités innée que de l'immunité acquise. Effectivement, le lien entre l'immunité innée et acquise est encore aujourd'hui peu connu lors d'infections à pneumocoque. Le but de cette étude était d'investiguer l'effet de l'immunité acquise développée à la suite d'une primo-infection sur la réponse immune précoce et tardive après une ré-infection par *S. pneumoniae* chez des souris CD1. Pour ce faire, nous avons comparé le profil pathologique et immunologique de souris qui ont été infectées à deux reprises avec celui de souris qui n'avaient subi qu'une infection. Nous avons étudié l'influence de l'immunité acquise sur les paramètres des réponses cellulaire et humorale développées après une deuxième infection. Nous avons également observé l'impact de l'utilisation de deux sérotypes différents pour la primo-infection : un sérotype très virulent (sérotype 3) et un autre qui cause une infection moins sévère (sérotype 14) chez les souris CD1.

Comme le montrent bien les résultats décrits précédemment, une ré-infection avec *S. pneumoniae* a induit une meilleure élimination des bactéries autant dans les alvéoles pulmonaires que dans le sang, suggérant une plus grande efficacité de l'immunité innée

après une deuxième infection. De plus, la diminution de la croissance bactérienne aux poumons fut plus prononcée lorsque le sérotype 3 était utilisé pour la primo-infection comparativement au sérotype 14. Cette différence entre les deux groupes pourrait être due à la plus faible capacité du sérotype 14 à coloniser les poumons et à induire une réponse IgG protectrice. Effectivement, des résultats préliminaires nous avaient permis d'observer que 72% du *S. pneumoniae* sérotype 3 et seulement 12% du *S. pneumoniae* sérotype 14 administrés par voie intranasale étaient retrouvés dans le tissu pulmonaire quinze minutes après l'infection.

Chez les souris ré-infectées, une meilleure élimination des bactéries a été observée en dépit d'une diminution du recrutement des PMNs aux alvéoles pulmonaires et d'une production significativement plus faible de chimiokines telles que MCP-1 et MIP-2 par rapport aux souris infectées une seule fois. Cette observation laisse supposer qu'une infiltration de cellules phagocytaires telles que les neutrophiles et les monocytes soit moins nécessaire lors d'une ré-infection contrairement à la réponse immunitaire développée pendant une première infection. La venue des neutrophiles et des monocytes est importante lors d'une primo-infection pour leur activité phagocytaire. Il est possible qu'une activité phagocytaire accrue des macrophages alvéolaires résidents ait cette fois-ci été facilité par la présence d'IgG opsonisant. Dans une étude antérieure, notre équipe avait mis en évidence un recrutement de lymphocytes au niveau pulmonaire à partir de 48h post-infection bien que cette période soit plutôt connue comme nécessitant les cellules phagocytaires (macrophages, neutrophiles) plutôt que les lymphocytes, lesquels sont généralement perçus comme agissant plus tardivement (5). Dans le cas qui nous concerne, nous avons été intéressés d'investiguer davantage la venue précoce de ces lymphocytes au site infecté.

Nous avons donc caractérisé la population lymphocytaire pulmonaire par cytométrie de flux en utilisant des anticorps fluorescents anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 $\alpha$ , anti-B220 et anti-CD45. Bien que nous n'ayons pas constaté d'augmentation significative du recrutement des lymphocytes au niveau pulmonaire chez les souris ré-infectées par rapport au groupe infecté une seule fois, nos résultats montrent une tendance à ce que les cellules T CD4+ soient celles qui migrent de façon préférentielle par rapport aux cellules T CD8+ et

aux cellules B. Ce résultat nous indique que bien que les neutrophiles soient moins recrutés aux poumons après une deuxième infection, la venue des lymphocytes, plus spécifiquement celle des cellules T CD4+, est augmentée laissant supposer que cette population leucocytaire pourrait jouer un rôle important lors de la réponse immune développée pour combattre une deuxième infection. Les lymphocytes T CD4+ peuvent être divisés en deux sous-populations : les cellules Th1 qui activent l'immunité cellulaire et les cellules Th2 qui favorisent plutôt l'immunité humorale. Il est généralement admis que les bactéries extracellulaires comme le pneumocoque sont principalement éliminées grâce aux cellules productrices d'anticorps agissant lors de l'immunité humorale. Afin de confirmer le profil Th1/Th2 de l'environnement alvéolaire, il serait avantageux de quantifier l'ARNm de cytokines impliquées dans cet événement telles que l'IL-2 (Th1), l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13(Th2) ainsi que de vérifier la production locale des protéines(3).

Dans notre étude, plusieurs médiateurs de l'inflammation ont été analysés. Il a été constaté que la production de l'IL-10 était drastiquement diminuée après une ré-infection comparé au groupe contrôle (souris infectées qu'une fois avec le sérotype 3). Puisque l'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire importante, ce résultat laisse supposer que les mécanismes anti-inflammatoires généralement liés à la production de cette cytokine ne semblent pas requis après une ré-infection possiblement parce qu'une inflammation excessive est évitée dans ce dernier cas. Le profil de production du TNF et de l'IL-10 était différent dépendant du sérotype utilisé lors de la première infection. Une première infection avec le sérotype 14 a mené à une plus faible production de TNF mais à une plus forte production d'IL-10 que ne l'a démontré le groupe pré-infecté avec le sérotype 3. Ces résultats suggèrent qu'une première infection effectuée avec un sérotype moins virulent génère une plus faible inflammation qui semble être mieux contrôlée. L'évaluation du dommage tissulaire par microscopie électronique confirme également ces résultats. Effectivement, une meilleure préservation de l'architecture pulmonaire sans excès d'œdème apparent fut observée dans le groupe de souris infectées successivement avec les sérotypes 14 et 3. L'IL-12 est de plus en plus reconnu comme faisant le lien entre l'immunité innée et acquise et pour sa faculté de stimuler la production d'IFN. Ses niveaux ont été très peu altérés dans nos expériences.

Cependant, la plus grande concentration d'IFN-gamma chez les souris pré-infectées avec le sérotype 14 suggère une tendance vers l'immunité de type Th1.

Pour la dernière partie du projet, les anticorps IgG spécifiques au pneumocoque (sero. 3) ont été dosés dans le sérum de souris infectées une ou deux fois. Il est généralement admis que les bactéries encapsulées telles que le pneumocoque comportent des antigènes stimulant une réponse T-indépendante. Les résultats ont démontré une augmentation significative de la production d'IgG anti-pneumococcique (séro.3) après une deuxième infection chez les souris ayant préalablement été infectées avec le sérotype 3. Ce résultat suggère que la première immunisation avec le sérotype 3 a permis le recrutement de cellules B mémoires actives lors du deuxième contact avec ce même antigène. Effectivement, on peut émettre l'hypothèse que l'augmentation importante d'IgG spécifiques après la ré-infection serait due aux cellules mémoires dotées d'une capacité de production d'anticorps de plus haute affinité que ceux obtenus pendant la primo-infection. Par contre, dans le cas des souris qui avaient d'abord été infectées avec le sérotype 14 et ré-infectées ensuite avec le sérotype 3, cette augmentation d'anticorps anti-pneumococcique (anti-séro. 3 et anti-séro. 14) après la deuxième infection était moins importante. En fait, nous pouvons supposer que cette différence entre les deux groupes ré-infectés est due à la plus faible capacité du sérotype 14 à coloniser les poumons. Le sérotype 14 pourrait donc être plus apte à produire des anticorps IgA dans les voies respiratoires supérieures que des IgG dans le sérum et les voies respiratoires inférieures. Pour s'en assurer, il pourrait être intéressant de doser les IgA dans la salive, les lavages naso-pharyngés (voies respiratoires supérieures), les poumons et le sérum dans un contexte de ré-infection.

Nos données expérimentales, combinées aux informations contenues dans la littérature, nous permettent de suggérer que bien que le pneumocoque soit une bactérie extracellulaire, la phagocytose par les neutrophiles et les macrophages alvéolaires ne soit pas le seul mécanisme important pour l'élimination de ce microbe. En fait, même si le *S. pneumoniae* possède des antigènes stimulant une réponse T-indépendante, les lymphocytes T CD4+ développés durant l'immunité acquise de la primo-infection semble exercer un rôle important dans la défense de l'hôte lors de la ré-infection. Il serait intéressant de poursuivre

la caractérisation de cette population leucocytaire lors de ré-infections et de vérifier par le fait même, leur état d'activation autant au niveau pulmonaire que dans la rate où ils prolifèrent. De plus, la détermination du rôle des cellules T CD4+ et CD8+ dans notre modèle pourrait apporter des informations importantes pour la compréhension des mécanismes intervenant dans les réponses immunitaires précoces et tardives.

Les résultats obtenus dans ce projet de maîtrise suggèrent plusieurs avenues de recherche intéressantes. Une de ces avenues serait d'étudier l'activité phagocytaire des monocytes/macrophages lors d'une ré-infection. Puisque aucun changement dans le profil de cette population cellulaire n'a été observé entre les deux groupes de souris étudiés, il serait effectivement intéressant de vérifier si leur activité phagocytaire présente un changement. Il serait également utile de caractériser davantage le rôle des cytokines-pivot faisant le lien entre l'immunité innée et acquise. Parmi celles-ci se trouve l'IL-12 dont son administration combinée à certains vaccins a d'ailleurs montré plusieurs effets bénéfiques lors des réponses immunes engendrées à la suite d'infections à pneumocoque (20). Finalement, il est de plus en plus connu que les coinfections telles que celle impliquant le virus de l'influenza et *S. pneumoniae* sont une cause importante de complications lors de pneumonies chez des personnes immunocompétentes contribuant à la hausse du taux de mortalité (32). Dans l'optique de mieux caractériser la réponse immune lors de pneumonies à pneumocoque, il pourrait être favorable d'utiliser des souches virales pour continuer les expériences de ré-infections et établir également un nouveau modèle de co-infection virus-bactéries.

## **CHAPITRE V Références**

1. 1999. Pulmonary host defenses: role of cytokines in lung inflammation. *Medscape general medicine* **1**.
2. **Abdi, K.** 2002. IL-12: the role of p40 versus p75. *Scand. J. Immunol.* **56**:1-11.
3. **Bergeron, Y., and M. G. Bergeron.** 2006. Cytokine and chemokine network in the infected lung, p. 57-74. *In* S. E. A. Torres, L. Mandell, M. Woodhead (ed.), *Respiratory Infections*. Edward Arnold Health Sciences Ltd.
4. **Bergeron, Y., and M. G. Bergeron.** 1999. Why does pneumococcus kill? the journal of the Canadian Infectious Disease Society **10**:49C-60C.
5. **Bergeron, Y., and N. Ouellet.** 1998. Cytokine kinetics and other host factors in response to pneumococcal pulmonary infection in mice. *infection and immunity*:912-922.
6. **Bogaert, D., and R. d. Groot.** 2004. Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* **4**:144-154.
7. **Boyton, R. J., and O. P. J.** 2002. Pulmonary defences to acute respiratory infection. *British medical bulletin* **61**:1-12.
8. **brevetés, C. d. e. d. p. d. m.** 2002, posting date. Rapport sur les nouveaux médicaments brevetés: Prevnar. [Online.]
9. **Coleman, J. W.** 2001. Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology* **1**:1397-1406.
10. **Fillion, I., and N. Ouellet.** 2001. Role of chemokines and formyl peptides in pneumococcal pneumonia-induced monocyte/macrophage recruitment. *The journal of Immunology* **166**:7353-7361.
11. **Gillespie, S. H., and I. Balakrishnan.** 2000. Pathogenesis of pneumococcal infection. *J. Med. Microbio.* **49**:1057-1067.
12. **Hölscher, C.** 2004. The power of combinatorial immunology: IL-12 and IL-12-related dimeric cytokines infectious diseases. *Med Microbiol Immunol* **193**:1-17.
13. **Janeway, and Travers.** 2003. *Immunobiologie*, 2e édition ed., Paris.
14. **Kadioglu, A., and P. W. Andrew.** 2004. The innate immune response to pneumococcal lung infection: the untold story. *Trends in immunology* **25**.
15. **Kadioglu, A., and N. A. Gingles.** 2000. Host cellular immune response to pneumococcal lung infection in mice. *Infection and immunity* **68**:492-501.

16. **Kalin, M.** 1998. Pneumococcal serotypes and their clinical relevance. *Thorax* **53**:159-162.
17. **Korpi-Steiner, N. L., and M. E. Bates.** 2006. Human rhinovirus induces robust IP-10 release by monocytic cells, which is independent of viral replication but linked to type I interferon receptor ligation and STAT1 activation. *Journal of leucocyte biology* **80**:1-11.
18. **Lamb, H., and D. Ormrod.** 2002. Ceftriaxone: an update of its use in the management of community-acquired and nosocomial infections. *Drugs* **62**:1041-1089.
19. **Lewis, S. M., and M. M. Heitkemper.** 2006. *Medical surgical nursing in Canada*, 1 ed. Ann Millar, Toronto.
20. **Lynch, J. M., D. E. Briles, and D. W. Metzger.** 2003. Increased protection against pneumococcal disease by mucosal administration of conjugate vaccine plus interleukin-12. *Infect Immun* **71**:4780-4788.
21. **Maggio, E., and A. Van der berg.** 2002. Chemokines, cytokines and their receptors in Hodgkin's lymphoma cell lines and tissues. *Annals of Oncology* **13**:52-56.
22. **Mitchell, T. J.** 2000. Virulence factors and the pathogenesis of disease caused by streptococcus pneumoniae. *Res. Microbiol.* **151**:413-419.
23. **Mizrachi-Nebenzahl, Y., S. Lifshitz, R. Teitelbaum, S. Novick, A. Levi, D. Benharroch, E. Ling, and R. Dagan.** 2003. Differential activation of the immune system by virulent *Streptococcus pneumoniae* strains determines recovery or death of the host. *Clin Exp Immunol* **134**:23-31.
24. **Moore, B. B., and T. A. Moore.** 2001. Role of T- and B-lymphocytes in pulmonary host defenses. *Eur Respir Journal* **18**:846-856.
25. **Örtqvist, A., and J. Hedlund.** 1998. Randomised trial of 23-valent pneumococcal capsular polysaccharide vaccine in prevention of pneumonia in middle-aged and elderly people. *Lancet* **351**:399-403.
26. **Peyrolo, N., and B. Baron** 2005, posting date. *Les maladies infectieuses*. [Online.]

27. **Rahman, I.** 2003. Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **36**.
28. **Reynolds, H. Y.** 2002. Modulating airway defenses against microbes. *Curr Opin Pulm Med* **8**:154-165.
29. **Rijneveld, A. W., and S. Florquin.** 2001. TNF-alpha compensates for the impaired host defense of IL-1 type I receptor-deficient mice during pneumococcal pneumonia. *The journal of Immunology* **167**:5240-5246.
30. **Rijneveld, A. W., and F. N. Lauw.** 2002. The role of interferon-gamma in murine pneumococcal pneumonia. *The journal of Infectious diseases* **185**:91-97.
31. **Rosenberg, H. F., and J. I. Gallin.** 1999. Inflammation. *Fundamental Immunology*:1051-1066.
32. **Smith, M. W., J. E. Schmidt, J. E. Rehg, C. J. Orihuela, and J. A. McCullers.** 2007. Induction of pro- and anti-inflammatory molecules in a mouse model of pneumococcal pneumonia after influenza. *Comp Med* **57**:82-89.
33. **Todar, K.** 2005, posting date. *Streptococcus pneumoniae* and pneumococcal disease. [Online.]
34. **Zeng, X., and T. A. Moore.** 2005. Interferon-inducible protein 10, but not monokine induced by gamma interferon, promotes protective type 1 immunity in murine *klebsiella pneumoniae* pneumonia. *Infection and immunity* **73**:8226-8236.
35. **Zhang, P., and W. R. Summer.** 2000. Innate immunity and pulmonary host defense. *immunological reviews* **173**:39-51.

**[Tapez ici le titre de l'annexe]**