

# Les vaccins face à la diversité antigénique des bactéries

M. Gottschalk<sup>(1, 2, 3)</sup> & S. Laurent-Lewandowski<sup>(3)</sup>

(1) Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc (GREMIP), Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200, rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec J2S 2M2, Canada

(2) Réseau canadien de recherche sur les bactéries pathogènes du porc, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200, rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec J2S 2M2, Canada

(3) Centre de recherche en infectiologie porcine (CRIP), Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200, rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec J2S 2M2, Canada

## Résumé

Les agents pathogènes bactériens ont élaboré tout un éventail de stratégies anti-immunes pour surmonter à la fois l'immunité innée et l'immunité acquise de leurs hôtes. Ces stratégies jouent un rôle crucial dans la capacité des agents pathogènes à provoquer la maladie et rendent compte des difficultés rencontrées lors du développement de vaccins et de la lutte contre ces micro-organismes. L'un des principaux problèmes réside dans le fait que les bactéries possèdent un niveau élevé de diversité antigénique. Pour faire face à cette variabilité, que l'on commence à bien connaître grâce au séquençage des génomes bactériens, les stratégies vaccinales consistent à utiliser soit plusieurs variants d'une (ou de plusieurs) protéine(s) apte(s) à induire des anticorps protecteurs, soit des protéines (ou des fragments protéiques) ou des épitopes relativement bien conservés, notamment du fait de leur implication dans le métabolisme de l'agent pathogène. L'approche la plus élaborée fait appel à la vaccinologie inverse « pan-génomique », qui analyse le profil protéique comparé d'un grand nombre d'isolats de diverses souches d'une même espèce, afin de mettre en évidence les protéines exprimées en surface présentes dans tous les isolats. Parmi ces protéines, celles qui sont exprimées lors de la transmission à l'hôte sont ensuite évaluées afin de déterminer leur capacité d'induire une protection immunitaire. À ce jour, cette approche a été utilisée avec succès contre des bactéries en médecine humaine et la voie est ouverte pour son application en médecine vétérinaire, grâce aux progrès accomplis dans le séquençage génomique des agents pathogènes d'importance vétérinaire.

## Mots-clés

Bactéries pathogènes – Vaccinologie vétérinaire – Variabilité antigénique.

## Introduction

Les surfaces des bactéries sont des structures complexes qui, du point de vue de l'hôte, présentent de multiples cibles antigéniques. L'une des difficultés majeures pour les bactéries consiste à cacher à la surveillance immunitaire cette surface complexe, où interviennent des protéines et des hydrates de carbone, tout en exposant des molécules clés comme les adhésines ou les invasines. Les agents pathogènes qui y parviennent ont élaboré tout un éventail de stratégies anti-immunes pour surmonter à la fois l'immunité innée et l'immunité acquise, qui mettent en

œuvre la reconnaissance par des récepteurs immunologiques de surface, la sécrétion de molécules anti-microbiennes effectrices, l'internalisation puis la dégradation par les phagocytes et l'activation tant du système immunitaire humoral que cellulaire (20). Ces stratégies jouent donc un rôle capital dans la capacité des agents pathogènes à provoquer la maladie, et rendent compte des difficultés propres au développement des vaccins et au contrôle de ces bactéries.

L'un des principaux problèmes liés aux infections bactériennes est que les bactéries présentent un niveau élevé de diversité antigénique. De fait, la plupart de ces

micro-organismes possèdent différents sérotypes qui, dans bien des cas, ne confèrent pas de protection croisée. Pour augmenter encore le degré de complexité, des variants sont souvent retrouvés parmi les souches du même sérotype.

Bien qu'une variation des molécules antigéniques soit habituelle d'une souche à l'autre, le terme spécifique de « variation antigénique » se réfère aux changements qui ont lieu au niveau de quelques antigènes appartenant à une même souche, que ce soit pour maintenir une infection en cours ou pour réinfecter des hôtes ayant éliminé une première infection (74). Ce phénomène est toutefois plus communément observé pour les infections virales et parasitaires que pour les infections bactériennes.

L'objectif de la présente revue est d'évaluer succinctement le problème de la diversité antigénique en tant que facteur d'échec de la vaccination. Seront examinées successivement la variation antigénique à l'intérieur d'une espèce bactérienne (les sérotypes), la variation de souche à l'intérieur d'un même sérotype et la variation antigénique proprement dite.

## Existence de divers sérotypes au sein d'une même espèce bactérienne

Les antigènes bactériens les plus importants sont ceux qui sont exposés à la surface des bactéries. L'un de ces antigènes majeurs est représenté par la production d'une capsule. Ce mécanisme est utilisé par la plupart des agents bactériens extracellulaires, à coloration de Gram négative et positive, qui circulent de façon systémique dans le corps. Des agents pathogènes affectant l'homme et/ou les animaux, tels que *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli* systémique, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* et d'autres, comptent sur leur capsule pour prévenir le dépôt des anticorps et du complément sur leur surface, échappant ainsi à l'opsonisation et à la phagocytose (19, 66). Pour ces espèces bactériennes, la composition de la capsule polysaccharidique détermine ou participe à la spécificité du sérotype et, la plupart du temps, des anticorps spécifiques de ces polysaccharides capsulaires sont nécessaires pour obtenir une protection.

Les bactéries qui expriment une capsule à leur surface possèdent aussi des adhésines filamenteuses (*fimbriae* et *pili*) qui traversent la surface capsulaire, permettant aux adhésines de se lier aux récepteurs de l'hôte sans dévoiler la surface bactérienne. Chez certaines espèces de bactéries

(*E. coli* par exemple), ces structures participent également à la diversité antigénique au niveau d'une surface bactérienne beaucoup plus complexe (17, 41).

Les lipopolysaccharides (LPS) sont une composante majeure des bactéries à Gram négatif et jouent un rôle clé tant du point de vue de l'agent pathogène que de l'hôte. Certains éléments de ces molécules, par exemple le lipide A, sont présents dans la plupart des organismes à Gram négatif et de ce fait jouent un rôle central dans l'activation des récepteurs de l'hôte. Néanmoins, la partie externe du LPS est constituée d'hydrates de carbone très variables, conférant à chaque souche un sérotype particulier (antigène O). Ainsi, diverses souches de la même espèce peuvent réinfecter le même hôte du seul fait de différences dans les antigènes de surface. L'importance de la diversité de ces antigènes est illustrée ci-après avec l'exemple de deux bactéries, l'une à Gram positif, *Streptococcus suis*, et l'autre à Gram négatif, *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

### Infections à *Streptococcus suis*

*Streptococcus suis* est l'un des agents pathogènes les plus importants du porc, à l'origine de pertes économiques considérables partout dans le monde. À ce jour, 35 sérotypes ont été décrits en se fondant sur la composition des antigènes capsulaires, avec une prédominance du sérotype 2, qui est le plus virulent (31). *Streptococcus suis* est responsable d'une grande variété de maladies porcines dont la septicémie, la méningite, le syndrome du choc toxique, l'arthrite, l'endocardite et la pneumonie (31). *Streptococcus suis*, particulièrement le sérotype 2, a été décrit comme un agent important de zoonoses touchant les personnes qui sont en contact direct avec des porcs infectés ou des produits dérivés du porc (33). De fait, les cas humains d'infection recensés récemment en Chine, avec un taux élevé de mortalité, étaient directement liés à une épizootie d'infection à *S. suis* chez des porcs (81).

On retrouve *S. suis* partout où l'industrie porcine est importante ; depuis plus de quinze ans, des infections associées à ce micro-organisme sont observées aussi bien dans les exploitations de type traditionnel que dans les exploitations intensives modernes. La présence d'un grand nombre de sérotypes complique le contrôle de l'infection à *S. suis*. Le sérotype 2 est considéré comme le plus important car il prédomine dans nombre de pays (31). Toutefois, la situation peut varier suivant la localisation géographique. Par exemple, le taux de prévalence de ce sérotype retrouvé sur des animaux malades au Canada reste relativement faible (en-dessous de 25 %) (30). Cette situation est très différente de celle observée dans certains pays européens, où le sérotype 2 prédomine en France, en Italie et en Espagne (8, 78). Au Japon, on retrouve

également une prévalence relativement élevée de ce sérotype (28 %) (38).

D'autres auteurs suggèrent que le contrôle des infections à *S. suis* ne devrait pas se limiter au sérotype 2, car la majorité des souches isolées de porcs atteints appartiennent à un plus grand nombre de sérotypes, allant le plus souvent du sérotype 1 au sérotype 8 (22, 30, 32, 38, 60). De plus, certaines souches appartenant à des sérotypes moins communs ont été associées à des cas d'infection sévère. Le sérotype 9 est décrit comme le plus fréquemment isolé en Belgique, aux Pays-Bas et en Allemagne (78), où il est associé au déclenchement de septicémies, de méningites et de pneumonies chez les porcs sevrés (56, 24). Au Royaume-Uni, le sérotype 14 est fréquemment isolé de porcs dont certaines manifestations cliniques et pathologiques ressemblent à celles associées au sérotype 2 (29). De plus, ce sérotype a également été isolé chez l'homme (77). Il convient de noter que plusieurs sérotypes peuvent être présents chez le même animal. Au cours d'une étude sur des porcs (51), il s'est avéré que 31 % d'entre eux présentaient un seul sérotype au niveau des cavités nasales, 38 % en avaient deux ou trois et 6 % en avaient plus de quatre. L'isolement de plusieurs sérotypes chez les animaux atteints a également été décrit.

Bien que nos connaissances sur les facteurs de virulence soient restreintes, le candidat antigénique majeur chez *S. suis* est la capsule, car elle joue un rôle de facteur anti-phagocytaire important (25). En fait, des anticorps dirigés spécifiquement contre la capsule se sont révélés protecteurs parce qu'ils augmentent la mort bactérienne (2, 11). Les anticorps dirigés contre la capsule semblent par conséquent nécessaires pour une bonne protection contre l'infection. Les vaccins disponibles sur le marché sont en fait des bactérines, c'est-à-dire des suspensions de bactéries totales inactivées. Dans certains pays, on utilise aussi des vaccins autologues (ou auto-vaccins), préparés sur le même principe. L'un des problèmes rencontrés avec cette bactérie est la diversité antigénique des divers sérotypes, car la vaccination contre un sérotype ne sera pas protectrice vis-à-vis d'un autre sérotype. Il est donc rare que les vaccins soient réellement efficaces sur le terrain. Pour couvrir cette diversité, certains vaccins autologues sont composés de six sérotypes différents (observations non publiées). Certaines protéines (de surface, extracellulaires, voire de toxines) ont également été utilisées comme immunogènes (31). Bien qu'une certaine protection ait été constatée lors d'infections expérimentales, seule une faible proportion de souches de *S. suis* (et pour très peu de sérotypes), dans des régions géographiques bien déterminées, produisent ces protéines, ce qui rend ces candidats vaccinaux peu prometteurs (31). La difficulté de trouver un antigène protecteur commun à plusieurs sérotypes et plusieurs souches de *S. suis* n'a donc pas encore été résolue.

## Infections à *Actinobacillus pleuropneumoniae*

*Actinobacillus pleuropneumoniae* est l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine, une affection pulmonaire très contagieuse chez les porcs, qui occasionne des pertes économiques considérables pour les éleveurs partout dans le monde. Les manifestations cliniques sont une grave insuffisance respiratoire aboutissant, dans certains cas, à une mort brutale en 24 à 48 heures ou à une infection chronique persistante (27). On reconnaît deux biotypes : le biotype I requiert du nicotinamide adénine di-nucléotide pour sa croissance, tandis que le biotype II, beaucoup moins courant, n'en nécessite pas (27). *Actinobacillus pleuropneumoniae* du biotype I a été divisé en 13 sérotypes et le biotype II en 2 sérotypes, soit au total 15 sérotypes. Des épizooties ont été décrites dans pratiquement toutes les régions d'Europe et en divers endroits des États-Unis d'Amérique et du Canada, en Amérique du Sud, au Japon, en Corée, à Taiwan et en Australie (27). Bien que certains sérotypes soient plus répandus dans certains pays (par exemple le sérotype 2 en Suisse, au Danemark, en France et en Suède et les sérotypes 1 et 5 aux États-Unis, au Canada et au Mexique), il arrive souvent que plusieurs sérotypes soient retrouvés dans une même région. Certains sérotypes, par exemple le sérotype 3, considérés comme peu virulents et sans importance épidémiologique dans certaines régions, pourraient être facteur d'épizootie dans d'autres (10, 15). De nombreuses publications ont donné des informations sur la répartition des sérotypes au niveau d'un pays déterminé (16). Même à l'intérieur d'un pays, la distribution peut être particulière à certaines régions, comme par exemple, la Catalogne en Espagne, où principalement les sérotypes 1, 2, 4, 7, 9 et 11 ont été identifiés, et le Québec au Canada, où les sérotypes 1, 5 et 7 prédominent (16). Il arrive également que divers sérotypes soient trouvés dans une même ferme. En fait, la plupart des troupeaux commerciaux sont infectés avec plus d'un sérotype d'*A. pleuropneumoniae* (26). La répartition des différents sérotypes sur le plan international est particulièrement intéressante comme indicateur de la transmission survenue lors des échanges internationaux d'animaux.

La spécificité de sérotype d'*A. pleuropneumoniae* est déterminée par la capsule, faite d'unités répétées d'oligosaccharides. La capsule est aussi l'élément principal de protection de la bactérie vis-à-vis des défenses de l'hôte. Elle est responsable de l'aspect iridescent caractéristique des colonies sur milieu clair. La composition chimique et la structure de la capsule ont été mises en évidence (57). Elles sont généralement constituées d'unités répétées d'oligosaccharides (sérotypes 5a, 5b et 10), de polymères d'acide téichoïque réunis par des ponts phospho-diester (sérotypes 2, 3, 6, 7, 8, 9, 11), ou de polymères d'oligosaccharides réunis par des ponts phosphates (sérotypes 1, 4, 12) (57). Les capsules sont chargées négativement du fait des résidus phosphates et acides

carboxyliques, certains étant partiellement O-glycosylés. Il ressort des études de détermination de structures effectuées sur les souches de référence des 12 premiers sérotypes que les capsules diffèrent assez pour que les anticorps dirigés contre cet élément constituent des antisérums pour le typage spécifique (58). Comme pour *S. suis*, la capsule d'*A. pleuropneumoniae* a des propriétés anti-phagocytaires qui protègent la bactérie contre les défenses cellulaires de l'hôte (35, 64). Des mutants dépourvus de capsule du sérotype 5, mais non du sérotype 1, sont facilement détruits par des antisérums porcins normaux, tandis que les souches capsulées résistent à une mort inhérente à l'action du complément (61, 76). La capsule assure la résistance en limitant la quantité d'anticorps et de C9 déposés à la surface bactérienne dans le sérum normal (76).

Les LPS sont des composants structuraux de toutes les bactéries à Gram négatif et constituent un déterminant de virulence. Du point de vue structural, la majorité des LPS comprennent trois régions distinctes : le lipide A, le cœur oligo-saccharidique ou le céto-désoxyoctonate, un sucre spécial à huit carbones, et le polysaccharide O qui est constitué d'unités répétées d'oligosaccharides. Perry et coll. (1, 43, 57) ont réalisé des études structurales sur les chaînes O latérales des souches de référence de chaque sérotype d'*A. pleuropneumoniae*, pour les treize premiers sérotypes. Ces études ont montré que la composition et la structure des chaînes latérales O sont spécifiques pour presque chaque sérotype. Néanmoins, certains sérotypes ont des épitopes communs : c'est le cas des sérotypes 1, 9 et 11, des sérotypes 3, 6 et 8 et des sérotypes 4 et 7 (16). Bien que la capsule soit présente à la surface de ce micro-organisme, d'autres études ont révélé que le LPS peut traverser l'épais matériel capsulaire et atteindre la région la plus externe de la cellule (7). Cette observation est de première importance si l'on considère que le développement d'un vaccin devrait être basé sur des molécules facilement accessibles aux cellules impliquées dans la réponse immunitaire de l'hôte et aux anticorps, durant le processus infectieux. De plus, les LPS jouent un rôle primordial dans les premières étapes de la colonisation bactérienne (36).

De façon générale, les vaccins qui contiennent des cellules bactériennes inactivées (ou bactérines) d'*A. pleuropneumoniae* sont d'usage courant pour contrôler la maladie. Ces vaccins produisent des anticorps dirigés principalement contre la capsule et le LPS. Ils sont capables de réduire la morbidité lors d'une infection par un sérotype homologue mais ils ne peuvent prévenir la maladie ou le développement de l'état de porteur, et ne confèrent pas de protection lors d'une exposition à l'infection avec des souches hétérologues (4, 28). Lorsqu'on vaccine des animaux avec des sérotypes dont les polysaccharides d'antigène O ont en commun certains épitopes, un certain degré de protection croisée a lieu (55). D'autres études ont

par ailleurs montré que des porcs pouvaient aisément être réinfectés avec *A. pleuropneumoniae* appartenant à des sérotypes antigéniquement non reliés (54, 62). Dans la recherche d'antigènes protecteurs, un vaccin sous-unitaire renfermant des toxines et des protéines communes à tous les sérotypes a été développé et commercialisé (71). Ce vaccin peut être utilisé dans n'importe quelle ferme, quel que soit le sérotype présent. Cependant, des résultats récents indiquent une faible protection contre le dernier des sérotypes décrits, le sérotype 15 (71).

## Diverses souches appartenant au même sérotype : épidémiologie prédictive

Tel qu'évoqué précédemment, des souches appartenant au même sérotype sont parfois différentes. Les méthodes biochimiques et sérologiques ne sont d'aucune utilité pour établir une distinction entre des clones individuels ou des souches, et les antibiogrammes (profils de sensibilité aux antibiotiques) sont, dans ce cadre, d'un intérêt limité. Le génotypage est la méthode courante pour distinguer les souches appartenant au même sérotype. Plusieurs laboratoires font appel à l'électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE) comme méthode de base, seule ou en association avec d'autres méthodes qui font appel ou non à l'amplification en chaîne par la polymérase (PCR) (18, 44). Des stratégies alternatives d'empreintes génomiques ou de typage incluent des approches par hybridation ou ribotypage (69) ou par analyse avec des enzymes de restriction (13). Les stratégies s'appuyant sur la PCR comprennent l'analyse par amplification aléatoire de l'ADN polymorphe (RAPD) (49) et par amplification de séquences répétitives (rep-PCR) (5). La répartition des séquences ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*) a été évaluée en utilisant des séquences consensus d'oligo-nucléotides dans les essais PCR (75). Les amorces ERIC permettent de générer directement des empreintes génomiques qui sont, sans ambiguïté, spécifiques d'espèces et de souches. La méthode rep-PCR est basée sur l'observation que des couples d'amorces complémentaires des extrémités des séquences répétitives dispersées, permettent l'amplification de fragments d'ADN dont la taille est représentative de la distance entre ces éléments. La séparation par électrophorèse permet d'établir des patrons génomiques spécifiques de souches bactériennes individuelles. Plusieurs de ces éléments répétitifs dispersés se retrouvent chez divers genres de bactéries, ce qui permet d'utiliser le même couple d'amorces pour plusieurs micro-organismes. Les

empreintes génomiques obtenues avec des sondes basées sur les séquences répétitives dispersées permettent de faire la distinction entre des organismes non apparentés, car les distances entre ces séquences sont caractéristiques de souches bactériennes individuelles. Depuis le développement de la rep-PCR, des séquences palindromiques répétitives extragéniques (*repetitive extragenic palindrome* : REP), des séquences ERIC et des séquences BOX (découvertes par B. Martin et coll. en 1992) (46) ont été utilisées pour obtenir les profils génomiques de bactéries à Gram négatif et de bactéries à Gram positif (40, 48, 73, 75). La rapidité des approches par empreintes génomiques bénéficie de la vitesse d'amplification des acides nucléiques et des méthodes de détection, propices à des analyses en temps réel. L'optimisation des réactions de PCR en faisant appel à des réactifs de référence, y compris pour les amorces, a mené au développement de trousseaux commerciaux, avec une reproductibilité et une précision accrues. Ces stratégies moléculaires sophistiquées peuvent être mises à profit pour réaliser des études d'épidémiologie moléculaire et pour contribuer à identifier les bactéries pathogènes.

Ici encore l'exemple de *S. suis* peut être souligné. Il a été montré que jusqu'à six patrons génotypiques de la même souche du sérotype 5 peuvent être mis en évidence chez les truies porteuses de *S. suis* au niveau d'une seule ferme (12). Une hétérogénéité encore plus grande a été retrouvée chez un nombre plus restreint d'isolats provenant des cavités nasales, comparativement à ceux d'origine vaginale. Cependant, un seul clone a été associé aux cas cliniques, car tous les isolats provenant des animaux atteints ou morts (avant ou durant l'étude) se sont révélés appartenir au même génotype. Un an plus tard, aucune caractéristique distincte de ce patron particulier associé à l'infection n'était détectée dans la ferme, en l'absence de signes cliniques (12). D'autres études portant sur des souches de sérotype 2 ont montré que dans des troupeaux infectés et maintenus en confinement, un seul clone était responsable de la maladie (47, 50, 60, 70).

En dépit du fait que diverses souches provenant du même sérotype sont généralement présentes dans le même troupeau, il est difficile de prédire la protection croisée qui a lieu entre ces souches. Tel qu'évoqué précédemment, lorsque les anticorps dirigés contre la capsule sont importants et que le sérotype est déterminé par la structure de cette capsule, on peut présumer qu'une protection croisée intervient entre les diverses souches du même sérotype. Cependant, pour certaines espèces bactériennes, la protection dépend de divers antigènes de surface qui ne sont pas reliés au sérotype. Dans ces cas, il est difficile de prédire la protection conférée vis-à-vis de souches appartenant au même sérotype mais différentes de celles utilisées dans le vaccin.

## Variabilité antigénique chez les bactéries

Bien qu'une variabilité des molécules antigéniques soit courante d'une souche à l'autre, la variabilité antigénique fait référence aux changements affectant spécifiquement certains antigènes au sein d'une même souche ; ce processus permet que l'infection se maintienne ou que l'hôte soit réinfecté, même après l'éradication réussie de la première infection (20). Trois critères doivent être remplis pour que la variabilité soit considérée comme variabilité antigénique (19) :

- les changements antigéniques interviennent dans l'évitement du système immunitaire ou dans un créneau de sélection ;
- il s'agit d'un changement comportant plusieurs phases ;
- le mécanisme relève de la conversion génique.

Les mécanismes moléculaires utilisés par les bactéries pour générer la variabilité antigénique sont multiples (19).

Il est important de noter que la majorité des études ont été menées en utilisant des agents pathogènes pour l'homme. Les mécanismes impliqués relèvent d'un des trois processus suivants :

- la présence de plusieurs copies différentes de la même molécule, chacune d'elle pouvant être activée de façon autonome ;
- la présence d'un locus d'expression associé à plusieurs copies silencieuses d'un même gène, avec un perpétuel changement du choix de la copie du gène exprimé ;
- la présence d'une région très variable d'une molécule qui évolue constamment.

L'espèce *Neisseria* (agent causal de la méningite et de la gonorrhée chez l'humain) est peut-être l'un des meilleurs exemples de la variabilité antigénique chez les bactéries, illustrant les trois concepts évoqués ci-dessus et soulignant les raisons de l'insuccès des vaccins contre ce type d'organismes. Le gonocoque possède 10 ou 11 protéines Opa (pour opacité) de la membrane externe, de profils antigéniques différents. L'expression de chaque protéine Opa dépend du contrôle indépendant de chacun des gènes correspondants. Durant l'infection, plusieurs protéines Opa sont exprimées suivant diverses combinaisons. Le pilus de *Neisseria* a comme composante structurale majeure la protéine piline, qui est l'objet d'une extrême variabilité. La base moléculaire de cette variabilité est l'existence d'un système multi-génique dont les membres sont soumis à une recombinaison intragénique (c'est-à-dire à une recombinaison affectant une partie de gène). Plusieurs gènes silencieux de piline (*pilS*), présents dans le

génomique, font don de minicassettes variées au gène situé dans le locus exprimé (*pilE*), et un pilus constamment différent est généré (21). Comme ces organismes sont par nature compétents, ils acquièrent d'autres séquences du gène de piline et les incorporent au niveau des loci *pilS* silencieux. *Neisseria meningitidis* modifie aussi la structure de ses lipo-oligosaccharides (LOS, semblables aux LPS) suivant un mécanisme de variation de phase. La bactérie peut exprimer jusqu'à 13 immunotypes différents par modification de la structure des divers sucres terminaux. Ceci est le résultat du changement d'expression de divers gènes de biosynthèse des hydrates de carbone. Par exemple, l'activité de la glycosyltransférase est régulée suivant un mécanisme de mauvais appariement par glissement de brin d'ADN (*slipped strand mispairing*), ce qui aboutit à une incorporation de sucres variés dans les LOS (59).

Comme cela a été déjà évoqué pour la variabilité des pili, il faut garder à l'esprit qu'un facteur de variabilité antigénique des bactéries est dû à la transmission horizontale d'informations génétiques entre agents pathogènes (80). Trois types de transfert peuvent avoir lieu :

- la transformation, qui implique l'acquisition, par la bactérie, d'un ADN qui se trouve dans son environnement. Depuis la reconnaissance de l'aptitude à la transformation des pneumocoques par Griffith en 1928, celle-ci a été mise en évidence chez d'autres espèces naturellement « transformables », telles que *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae* et *Bacillus subtilis*. Le processus de transformation implique que ces bactéries acquièrent un état physiologique de « compétence » grâce à l'expression régulée de certains gènes et que l'ADN étranger présente une homologie de séquence avec un fragment du chromosome bactérien ; cette homologie de séquence permet qu'il y ait recombinaison, puis intégration de l'ADN étranger dans le chromosome bactérien ;

- la conjugaison, qui permet le transfert de gènes entre deux cellules de différenciation sexuelle appropriée. Le transfert d'ADN s'effectue grâce aux pili des bactéries à Gram négatif et des adhésines de surface pour les bactéries à Gram positif ;

- la transduction, qui est un transfert génétique au cours duquel un ou plusieurs gènes sont transmis d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice par l'intermédiaire d'un bactériophage transducteur. Ces gènes sont portés par le bactériophage à la suite de sa multiplication dans la bactérie donatrice, génétiquement différente de la bactérie réceptrice.

La transmission des plasmides de résistance aux antimicrobiens, par exemple, peut s'effectuer par l'un quelconque de ces mécanismes de transfert horizontal

entre pathogènes (80). De ces trois processus, *N. gonorrhoeae*, qui présente une extrême plasticité génomique, n'utilise que la transformation pour un échange horizontal continu de séquences chromosomiques. Le déséquilibre de liaison des gènes qui en résulte est particulièrement marqué pour cette bactérie ; il l'est moins par exemple pour *N. meningitidis*, qui présente un déséquilibre de liaison de gènes intermédiaire entre celui de *N. gonorrhoeae* et celui d'autres bactéries comme *E. coli* ou *Salmonella* (21). L'impact de cette plasticité génomique est par exemple crucial au niveau de la variabilité antigénique des pili. En ce qui a trait à *S. suis*, un transfert horizontal du gène codant pour la suilysine (hémolysine produite par certaines souches) a été mis en évidence lors d'une étude portant sur l'analyse du locus de la suilysine – par PCR et/ou hybridation de Southern – au niveau de 68 souches de *S. suis* (67).

## La composition vaccinale a-t-elle un impact sur la prévalence des sérotypes ? Peut-elle influencer l'émergence de nouveaux sérotypes auparavant de faible prévalence ?

Ceci est une question intéressante, à laquelle il n'a pas encore été répondu, du moins en médecine vétérinaire. En médecine humaine, les effets de la vaccination visant un sérotype spécifique sur l'émergence de nouveaux sérotypes sont sujets à discussion. Néanmoins, il y a quelques années, Lipsitch (42) a utilisé un modèle mathématique pour étudier la dynamique de la transmission de deux sérotypes, et plus, de bactéries colonisant une population, en accordant une attention particulière aux effets de la vaccination contre un ou plusieurs sérotypes. Ce modèle prédit que des vaccins spécifiques composés d'un sérotype auront pour effet d'augmenter la prévalence des sérotypes exclus de la composition vaccinale. Cela comprend également l'émergence de nouveaux sérotypes qui au préalable étaient incapables d'entrer en compétition avec le sérotype ciblé. Dans un système à deux sérotypes, l'augmentation de la prévalence de l'un ou l'autre des sérotypes sera toujours moindre que le déclin de la prévalence du sérotype vaccinal ; donc, dans un tel système, le nombre total d'individus indemnes vis-à-vis de l'un quelconque des sérotypes augmentera toujours avec la vaccination. Cependant, dans un système à plus de deux sérotypes (situation plus courante en médecine vétérinaire

de populations), la vaccination spécifique dirigée contre un sérotype risque d'augmenter la proportion des hôtes porteurs d'un des sérotypes non ciblés, plus qu'elle ne réduira la proportion de porteurs du sérotype ciblé.

## Quelle stratégie vaccinale ?

Au cours de l'évolution, nombre de bactéries pathogènes sont arrivées à la même stratégie de variation antigénique pour surmonter les défenses de l'hôte. Cette variation antigénique a des conséquences importantes pour le développement de vaccins contre ces pathogènes. Si l'antigène variable est la cible de l'immuno-prophylaxie, le vaccin devrait théoriquement posséder un degré de multivalence pratiquement impossible à obtenir. Pour relever ce défi, deux approches sont envisageables.

La première consiste à restreindre la multivalence en sélectionnant, parmi les variants, ceux qui sont les plus représentatifs. De fait, on constate parfois la prédominance de certaines combinaisons antigéniques, ce qui limite l'ampleur de la diversité antigénique « originelle ». Ce type d'analyse a été mené par R. Urwin et coll. (72) sur la bactérie *N. meningitidis*. Trois protéines de la membrane externe (PorA, PorB et FetA) sont des candidats vaccinaux pour lesquels se pose le problème du choix des variants à inclure dans la préparation vaccinale, compte tenu de la grande variabilité génétique et de la diversité antigénique des populations de méningocoques. Cette équipe a séquencé les gènes des trois protéines d'intérêt sur une collection rassemblant les 78 souches les plus invasives et liées aux maladies les plus endémiques et épidémiques des cinquante dernières années. Il ressort de cette étude qu'il existe une certaine structure d'association de variants antigéniques. C'est ainsi qu'il suffirait qu'un vaccin associe six variants de PorA et cinq variants de FetA pour conférer une protection contre les 78 isolats examinés.

La deuxième approche envisageable consiste à mettre l'accent sur les domaines fonctionnels de la ou des protéines variables. Dans la pathogénèse, les régions variables de la protéine ont d'autres fonctions (l'adhérence par exemple) que la seule évasion immunitaire. Ces régions, assujetties à des contraintes de structure plus strictes, c'est-à-dire codées par des séquences d'ADN mieux conservées, seraient ainsi propices à produire des anticorps à réactions croisées.

En exemple particulièrement parlant des difficultés de mise au point d'un vaccin devant faire face à la variabilité antigénique de la bactérie en cause est celui de *Streptococcus pneumoniae*. Cette bactérie responsable de méningite, de septicémie et de pneumonie chez l'homme est à l'origine d'un million de décès annuels chez les enfants de moins de cinq ans (37). La surface externe de ce

pneumocoque est une paroi couverte d'une capsule polysaccharidique, avec plus de 100 sérotypes capsulaires décrits. Les polysaccharides de la capsule sont très immunogènes mais les anticorps produits protègent uniquement contre le sérotype homologue. Certains polysaccharides étant communs, il n'est toutefois pas exclu que des réactions croisées aient lieu. Outre les polysaccharides capsulaires, certaines protéines de surface qui traversent la capsule se sont révélées efficaces pour déclencher une réponse immunitaire protectrice chez des animaux de laboratoire.

Depuis 1911 jusqu'à nos jours, diverses approches vaccinales ont été tentées, qui ont fait l'objet d'une excellente revue par D. Bogaert et coll. (9). Après une première tentative de vaccin à base d'une bactérie représentative d'un sérotype, le premier vaccin constitué de polysaccharides capsulaires s'est révélé assez efficace pour enrayer une épidémie de pneumonie au Massachusetts (États-Unis d'Amérique) en 1931. Ce vaccin s'est vu retiré du marché, supplanté par l'efficacité des antibiotiques. Lorsque la résistance à la pénicilline est apparue, à partir de 1947, les recherches en vue d'un vaccin ont repris et abouti à la production (en 1977) d'un vaccin polysaccharidique 14-valent puis d'un vaccin 23-valent en 1983. Le vaccin Pneumovax 23® (Merck, West Point, États-Unis d'Amérique), renferme 23 antigènes polysaccharidiques capsulaires purifiés, assurant une protection théorique contre 85 % à 90 % des pneumocoques responsables d'infections chez les adultes et les enfants de plus de deux ans. Par contre, ce vaccin n'induit qu'une réponse partielle dépendante des cellules T, ce qui implique une quasi-absence de cellules B mémoires et limite la durée de la protection. Pour augmenter l'immunogénicité, l'étape suivante a donc été un vaccin conjugué, dans lequel les polysaccharides capsulaires sont liés à une protéine porteuse, telle que l'anatoxine tétanique. Le vaccin conjugué Prevenar® (Wyeth, Paris) contient sept variants de polysaccharides capsulaires conjugués à une protéine mutante de toxine diphtérique. Bien qu'aux États-Unis ce vaccin fasse partie du calendrier de vaccinations depuis octobre 2000, certaines études ont mis en évidence l'augmentation de l'incidence d'otites moyennes, qui seraient imputables au phénomène déjà évoqué dans la section précédente, à savoir l'émergence de nouveaux sérotypes non représentés dans la préparation vaccinale (39). Au cours des dix dernières années, les recherches s'orientent vers des protéines de surface, telles que la protéine A de surface (PspA), la pneumolysine, la protéine liant la choline (PspC), la neuraminidase, l'autolysine et l'adhésine A (PsaA). Aucune de ces protéines n'est capable d'induire une protection à large spectre, du fait de l'existence de la variabilité allélique (34). Quelles sont, dès lors, les perspectives vaccinales ? Plusieurs variants d'une même protéine, ou encore la combinaison de plusieurs protéines, ou la conjugaison d'une de ces protéines avec des

polysaccharides capsulaires sont des alternatives pour limiter l'aptitude des pneumocoques à contrecarrer les défenses de l'hôte. L'utilisation, par exemple, de deux protéines ayant des fonctions complémentaires dans la virulence pourrait conférer des rôles additifs de protection (comme PsaA contre la colonisation et PspA contre l'invasion).

Un deuxième exemple de stratégie vaccinale astucieuse pour contourner le problème de la variabilité antigénique est celui qui s'applique dans le cas d'agents pathogènes transmis par des vecteurs. En ce qui concerne la maladie de Lyme chez l'homme, causée par *Borrelia burgdorferi*, il existe une diversité considérable des séquences du gène codant la protéine C de surface externe (OspC) qui définissent les différentes souches (6). Un vaccin basé sur la protéine OspC devrait être multivalent. Ce n'est pas la stratégie qui a été retenue. Le vaccin utilise une seule protéine (OspA), qui est exprimée dans l'intestin du vecteur (la tique), mais avec laquelle l'hôte réceptif ne peut avoir de contact. Pour cette raison sans doute, et du fait que le vecteur ne possède pas de système immunitaire adaptatif, on retrouve peu de divergence entre les séquences de OspA (65). Le vaccin fonctionne apparemment par la production d'anticorps qui inhibent ou détruisent les spirochètes dans les tiques avant que ne soient exprimés des gènes plus polymorphes (tels que OspC) chez l'hôte (14).

Le troisième exemple de stratégie vaccinale est l'approche mise en œuvre pour un vaccin contre *N. meningitidis* du groupe B. Ce séro-groupe est responsable d'environ la moitié des cas de maladies (humaines) dues au méningocoque à travers le monde. Il s'agit du seul séro-groupe pour lequel l'infection ne peut être prévenue par l'utilisation de vaccins capsulaires, car cette capsule est un polymère  $\alpha(2-8)$  d'acide N-acétyl-neuraminique, qui est retrouvé sur les tissus humains. Diverses tentatives ont fait intervenir des protéines de membrane externe (Omp), mais c'est l'approche la plus récente (23, 82), qui fait appel à la « vaccinologie inverse », qui sera retenue ici. Le séquençage du génome de *N. meningitidis* a ouvert la voie à l'identification d'antigènes potentiels. À partir du génome

et à l'aide de certains algorithmes développés en bioinformatique, il est possible d'identifier et de caractériser les gènes, d'analyser leur localisation et le niveau d'expression des protéines correspondantes (protéomique et transcriptomique). C'est ainsi que 600 antigènes ont été recensés, codant pour des protéines exposées à la surface. La moitié de ces antigènes ont fait l'objet d'expression dans *E. coli*, les protéines recombinantes ont été purifiées et leur immunogénicité a été évaluée. Des 91 immunogènes retenus, 29 se sont révélés être des antigènes protecteurs. Certains de ces candidats vaccinaux sont en cours d'essais cliniques. Cette approche a été suivie pour d'autres agents pathogènes tels que *S. pneumoniae* (79), *Porphyromonas gingivalis* (63), *Chlamydia pneumoniae* (52) et *Bacillus anthracis* (3). Toutefois, pour intégrer le problème de la diversité antigénique des bactéries dans la conception d'un vaccin, on ne peut pas se limiter à une seule séquence. Un concept clé est de faire appel à un « profil » séquentiel multi-génomique, pour intégrer le facteur de variabilité génétique. Ce concept est à la base de la vaccinologie inverse « pan-génomique » (par comparaison avec la vaccinologie inverse « classique » telle que décrite précédemment). Le principe de cette méthode est d'analyser la diversité génétique d'une espèce ; pour ce faire, elle recourt à l'hybridation génomique comparative par rapport à une séquence déterminée et à la comparaison des séquences de plusieurs souches. Cette méthode a été mise en œuvre pour *S. agalactiae*, *Streptococcus* du groupe B (45, 53, 68) et a permis de restreindre à 396 (sur 589) le nombre des protéines de surface à évaluer, 193 d'entre elles n'étant pas exprimées dans l'une quelconque des souches analysées. Cette approche de vaccinologie inverse « pan-génomique » pourra être appliquée à d'autres agents pathogènes dont le génome aura été séquencé, en incluant ceux qui jouent un rôle important en médecine vétérinaire. Actuellement, plus de 300 génomes bactériens sont séquencés en totalité et plus de 500 sont en cours de détermination. L'un des avantages de la vaccinologie inverse est que la plupart des étapes peuvent être menées en amont des études d'immunogénicité chez l'animal.

■



## Vaccine development: strategies for coping with the antigenic diversity of bacteria

M. Gottschalk & S. Laurent-Lewandowski

### Summary

Bacterial pathogens have evolved a whole range of anti-immune strategies to overcome both the innate and acquired immunity of their hosts. These strategies play a crucial role in the capacity of pathogens to trigger disease and also explain why it is so difficult to develop vaccines and to control these microorganisms. One of the main problems is that bacteria are highly antigenically diverse. The vaccination strategies for coping with this variability, which we are starting to understand more fully as a result of sequencing bacterial genomes, consist of using either several variants of one or more proteins capable of inducing protective antibodies, or else proteins (or protein fragments) or epitopes that have been relatively well preserved notably because they are involved in the pathogen's metabolism. The most sophisticated approach calls upon 'pan genomic' inverse vaccinology which compares the protein profiles of a large number of isolates from various strains of a single species in order to reveal the surface-expressed proteins present in all the isolates. Of these proteins, the ones which are expressed when the host is infected are then evaluated in order to determine their capacity to induce a protective immune response. So far this approach has been successful in controlling bacteria in humans and the way is now open for its application in veterinary medicine, thanks to progress with the genomic sequencing of pathogens of veterinary importance.

### Keywords

Antigenic variability – Pathogenic bacteria – Veterinary vaccinology.



## Las vacunas ante la diversidad antigénica de las bacterias

M. Gottschalk & S. Laurent-Lewandowski

### Resumen

Los agentes patógenos bacterianos han elaborado todo un arsenal de estrategias para luchar contra la inmunidad, tanto innata como adquirida, de los organismos que infectan. Tales estrategias, que son un componente básico de la aptitud de dichos patógenos para provocar una enfermedad, explican las dificultades existentes a la hora de fabricar vacunas y de luchar contra esos microorganismos. Uno de los principales problemas estriba en la gran diversidad antigénica que presentan las bacterias. Las estrategias de vacunación para combatir esta variabilidad, que empezamos a conocer bien gracias a la secuenciación de genomas bacterianos, consisten en utilizar: bien distintas variantes de una (o varias) proteína(s) susceptible(s) de inducir una respuesta de anticuerpos protectores; o bien proteínas (o fragmentos proteicos), o epitopos relativamente bien conservados, sobre todo porque intervienen en el metabolismo del patógeno. Los métodos más elaborados son los que recurren a la vacunología inversa "pangenómica", procedimiento que consiste en analizar

y comparar el perfil proteínico de un gran número de muestras de varias cepas de una misma especie a fin de determinar las proteínas de superficie que están presentes en todas ellas. A continuación, de entre todas esas proteínas, se analizan y evalúan las que se expresan cuando la bacteria infecta al huésped, con objeto de determinar su capacidad de inducir una respuesta inmunitaria protectora. Hasta la fecha, este método ha sido utilizado con éxito contra bacterias que infectan al hombre, y, gracias a los progresos realizados en la secuenciación genómica de patógenos de importancia veterinaria, la vía está expedita para aplicarlo en medicina veterinaria.

#### Palabras clave

Bacteria patógena – Vacunología veterinaria – Variabilidad antigénica.

## Bibliographie

- Altman E., Griffith D.W. & Perry M.B. (1990). – Structural studies of O-chains of the lipopolysaccharides produced by strains of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* serotype 5. *Biochem. Cell Biol.*, **68**, 1268-1271.
- Andresen L.O. & Tegtmeier C. (2001). – Passive immunisation of pigs against experimental infection with *Streptococcus suis* serotype 2. *Vet. Microbiol.*, **81**, 331-344.
- Ariel N., Zvi A., Grosfeld H., Gat O., Inbar Y., Velan B., Cohen S. & Shafferman A. (2002). – Search for potential vaccine candidate open reading frames in the *Bacillus anthracis* virulence plasmid pXO1: *in silico* and *in vitro* screening. *Infect. Immun.*, **70**, 6817-6827.
- Backström L. (1999). – Present uses of and experiences with swine vaccines. *Adv. vet. Med.*, **41**, 419-428.
- Baldy-Chudzik K. (2001). – Rep-PCR – a variant to RAPD or an independent technique of bacteria genotyping? A comparison of the typing properties of rep-PCR with other recognised methods of genotyping of microorganisms. *Acta microbiol. pol.*, **50**, 189-204.
- Barbour A.G. & Restrepo B.I. (2000). – Antigenic variation in vector-borne pathogens. *Emerg. infect. Dis.*, **6**, 449-457.
- Belanger M., Begin C. & Jacques M. (1995). – Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infect. Immun.*, **63**, 656-662.
- Berthelot-Herault F., Morvan H., Keribin A.M., Gottschalk M. & Kobisch M. (2000). – Production of muramidase-released protein (MRP), extracellular factor (EF) and sulysin by field isolates of *Streptococcus suis* capsular types 2, 1/2, 9, 7 and 3 isolated from swine in France. *Vet. Res.*, **31**, 473-479.
- Bogaert D., Hermans P.W.M., Adrian P.V., Rümke H.C. & De Groot R. (2004). – Pneumococcal vaccines: an update on current strategies. *Vaccine*, **22**, 2209-2220.
- Brandreth S.R. & Smith I.M. (1985). – Prevalence of pig herds affected by pleuropneumonia associated with *Haemophilus pleuropneumoniae* in eastern England. *Vet. Rec.*, **117**, 143-147.
- Chabot-Roy G., Willson P., Segura M., Lacouture S. & Gottschalk M. (2006). – Phagocytosis and killing of *Streptococcus suis* by porcine neutrophils. *Microb. Pathogen.*, **41**, 21-32.
- Cloutier G., d'Allaire S., Martinez G., Surprenant C., Lacouture S. & Gottschalk M. (2003). – Epidemiology of *Streptococcus suis* serotype 5 infection in a pig herd with or without clinical disease. *Vet. Microbiol.*, **97**, 135-151.
- Cohen S.H., Tang Y.J. & Silva J. Jr (2001). – Molecular typing methods for the epidemiological identification of *Clostridium difficile* strains. *Expert. Rev. molec. Diagn.*, **1**, 61-70.
- De Silva A.M., Zeidner N.S., Zhang Y., Dolan M.C., Piesman J. & Fikrig E. (1999). – Influence of outer surface protein A antibody on *Borrelia burgdorferi* within feeding ticks. *Infect. Immun.*, **67**, 30-35.
- Desrosiers R., Mittal K.R. & Malo R. (1984). – Porcine pleuropneumonia associated with *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 3 in Quebec. *Vet. Rec.*, **115**, 628-629.
- Dubreuil J.D., Jacques M., Mittal K.R. & Gottschalk M. (2000). – *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. *Anim. Hlth Res. Rev.*, **1**, 73-93.

17. Emody L., Kerenyi M. & Nagy G. (2003). – Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *Int. J. antimicrob. Agents*, **22**, 29-33.
18. Fenollar F. & Raoult D. (2004). – Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms. *Acta pathol. microbiol. scand.*, **112**, 785-807.
19. Finlay B.B. & Falkow S. (1997). – Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. molec. Biol. Rev.*, **61**, 136-169.
20. Finlay B.B. & McFadden G. (2006). – Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell*, **124**, 767-782.
21. Fussenegger M., Rudel T., Barten R., Ryll R. & Meyer T.F. (1997). – Transformation competence and type-4 pilus biogenesis in *Neisseria gonorrhoeae* – a review. *Gene*, **192**, 125-134.
22. Galina L., Collins J.E. & Pijoan C. (1992). – Porcine *Streptococcus suis* in Minnesota. *J. vet. diagn. Invest.*, **4**, 195-196.
23. Girard M.P., Preziosi M.P., Aguado M.T. & Kiény M.P. (2006). – A review of vaccine research and development: meningococcal disease. *Vaccine*, **24**, 4692-4700.
24. Gogolewski R.P., Cook R.W. & O'Connell C.J. (1990). – *Streptococcus suis* serotypes associated with disease in weaned pigs. *Aust. vet. J.*, **67**, 202-204.
25. Gottschalk M. & Segura M. (2000). – The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet. Microbiol.*, **76**, 259-272.
26. Gottschalk M., Broes A., Mittal K.R., Kobisch M., Kuhnert P., Lebrun A. & Frey J. (2003). – Non-pathogenic *Actinobacillus* isolates antigenically and biochemically similar to *Actinobacillus pleuropneumoniae*: a novel species? *Vet. Microbiol.*, **92**, 87-101.
27. Gottschalk M. & Taylor D.J. (2006). – *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In *Diseases of swine*, 9<sup>e</sup> éd. (B.E. Straw, J.J. Zimmerman, S. d'Allaire & D.J. Taylor, édit.). Blackwell Publishing, Ames, Iowa, chapitre 33, 563-576.
28. Haesebrouck F., Chiers K., van Overbeke I. & Ducatelle R. (1997). – *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Vet. Microbiol.*, **58**, 239-249.
29. Heath P.J. & Hunt B.W. (2001). – *Streptococcus suis* serotypes 3 to 28 associated with disease in pigs. *Vet. Rec.*, **148**, 207-208.
30. Higgins R. & Gottschalk M. (2001). – Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in 2000. *Can. vet. J.*, **42**, 223.
31. Higgins R. & Gottschalk M. (2006). – Streptococcal diseases. In *Diseases of swine*, 9<sup>e</sup> éd. (B.E. Straw, J.J. Zimmerman, S. d'Allaire & D.J. Taylor, édit.). Blackwell Publishing, Ames, Iowa, chapitre 47, 769-783.
32. Hogg A., Amass S.F., Hoffman L.J., Wu C.C. & Clark L.K. (1996). – A survey of *Streptococcus suis* isolations by serotype and tissue of origin. *Proc. Am. Assoc. Swine Pract.*, **1996**, 79-81.
33. Huang Y.T., Teng L.J., Ho S. & Hsueh P.R. (2005). – *Streptococcus suis* infection. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, **38**, 306-313.
34. Iannelli F., Oggioni M.R. & Pozzi G. (2002). – Allelic variation in the highly polymorphic locus *pspC* of *Streptococcus pneumoniae*. *Gene*, **284**, 63-71.
35. Inzana T.J., Ma J., Workman T., Gogolewski R.P. & Anderson P. (1988). – Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect. Immun.*, **56**, 1880-1889.
36. Jacques M. (1996). – Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence. *Trends Microbiol.*, **4**, 408-409.
37. Jaffar S., Leach A., Hall A.J., Obaro S., McAdam K.P., Smith P.G. & Greenwood B.M. (1999). – Preparation for a pneumococcal vaccine trial in The Gambia: individual or community randomisation. *Vaccine*, **18**, 633-640.
38. Kataoka Y., Sugimoto C., Nakazawa M., Morozumi T. & Kashiwazaki M. (1993). – The epidemiological studies of *Streptococcus suis* infections in Japan from 1987 to 1991. *J. vet. med. Sci.*, **55**, 623-626.
39. Kilpi T., Ahman H., Jokinen J., Lankinen K.S., Palmu A., Savolainen H., Gronholm M., Leinonen M., Hovi T., Eskola J., Kayhty H., Bohidar N., Sadoff J.C., Makela P.H. & Finnish Otitis Media Study Group (2003). – Protective efficacy of a second pneumococcal conjugate vaccine against pneumococcal acute otitis media in infants and children: randomised, controlled trial of a 7-valent pneumococcal polysaccharide-meningococcal outer membrane protein complex conjugate vaccine in 1666 children. *Clin. infect. Dis.*, **37** (9), 1155-1164. Publication électronique : 7 octobre.
40. Koeuth T., Versalovic J. & Lupski J.R. (1995). – Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Res.*, **5**, 408-418.
41. Le Bouguenec C. (2005). – Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. *Int. J. med. Microbiol.*, **295** (6-7), 471-478.
42. Lipsitch M. (1997). – Vaccination against colonising bacteria with multiple serotypes. *Proc. natl Acad. Sci. USA*, **94**, 6571-6576.
43. MacLean L.L., Perry M.B. & Vinogradov E. (2004). – Characterisation of the antigenic lipopolysaccharide O chain and the capsular polysaccharide produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 13. *Infect. Immun.*, **72**, 5925-5930.

44. Maiden M.C., Bygraves J.A., Feil E., Morelli G., Russell J.E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D.A., Feavers I.M., Achtman M. & Spratt B.G. (1998). – Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. natl Acad. Sci. USA*, **95**, 3140-3145.
45. Maione D., Margarit, Rinaudo C.D., Massignani V., Mora M., Scarselli M., Tettelin H., Brettoni C., Iacobini E.T. & Rosini R. (2005). – Identification of a universal group B *Streptococcus* vaccine by multiple genome screen. *Science*, **309**, 148-150.
46. Martin B., Humbert O., Camara M., Guenzi E., Walker J., Mitchell T., Andrew P., Prudhomme M., Alloing G. & Hakenbeck R. (1992). – A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 3479-3483.
47. Martinez G., Harel J., Lacouture S. & Gottschalk M. (2002). – Genetic diversity of *Streptococcus suis* serotypes 2 and 1/2 isolates recovered from carrier pigs in closed herds. *Can. J. vet. Res.*, **66**, 240-248.
48. Metzger R., Brown D.P., Grealish P., Staver M.J., Versalovic J., Lupski J.R. & Katz L. (1994). – Characterisation of the macromolecular synthesis (MMS) operon from *Listeria monocytogenes*. *Gene*, **151**, 161-166.
49. Milch H. (1998). – Advance in bacterial typing methods (a review). *Acta microbiol. immunol. hung.*, **45**, 401-408.
50. Mogollon J.D., Pijoan C., Murtaugh M.P., Collins J.E. & Cleary P.P. (1991). – Identification of epidemic strains of *Streptococcus suis* by genomic fingerprinting. *J. clin. Microbiol.*, **29**, 782-787.
51. Monter Flores J.L., Higgins R., d'Allaire S., Charette R., Boudreau M. & Gottschalk M. (1993). – Distribution of the different capsular types of *Streptococcus suis* in nineteen swine nurseries. *Can. vet. J.*, **34**, 170-171.
52. Montigiani S., Falugi F., Scarselli M., Finco O., Petracca R., Galli G., Mariani M., Manetti R., Agnusdei M. & Cevenini R. (2002). – Genomic approach for analysis of surface proteins in *Chlamydia pneumoniae*. *Infect. Immun.*, **70**, 368-379.
53. Mora M., Donati C., Medini D., Covacci A. & Rappuoli R. (2006). – Microbial genomes and vaccine design: refinements to the classical reverse vaccinology approach. *Curr. Op. Microbiol.*, **9**, 532-536.
54. Nielsen R. (1976). – Pleuropneumonia of swine caused by *Haemophilus parahaemolyticus*. Studies on the protection obtained by vaccination. *Nord. vet. Med.*, **28**, 337-348.
55. Nielsen R. (1985). – *Haemophilus pleuropneumoniae* (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) serotypes 8, 3 and 6. Serological response and cross immunity in pigs. *Nord. vet. Med.*, **37**, 217-227.
56. Orr J., Copeland S. & Chirino-Trejo M. (1989). – *Streptococcus suis* type 9 outbreak in swine. *Can. vet. J.*, **30**, 680.
57. Perry M.B., Brisson J.-R., Beynon L.M. & Richards J.C. (1990). – Structural characteristics of the antigen capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in the serological classification of *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae* strains. *Serodiag. Immunother. infect. Dis.*, **4**, 299-308.
58. Perry M.B., MacLean L.L. & Vinogradov E. (2005). – Structural characterisation of the antigenic capsular polysaccharide and lipopolysaccharide O-chain produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 15. *Biochem. Cell Biol.*, **83**, 61-69.
59. Rahman M.M., Stephens D.S., Kahler C.M., Glushka J. & Carlson R.W. (1998). – The lipooligosaccharide (LOS) of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain NMB contains L2, L3, and novel oligosaccharides, and lacks the lipid-A 4'-phosphate substituent. *Carbohydr. Res.*, **307**, 311-324.
60. Reams R.Y., Harrington D.D., Glickman L.T., Thacker H.L. & Bowersock T.L. (1996). – Multiple serotypes and strains of *Streptococcus suis* in naturally infected swine herds. *J. vet. diagn. Invest.*, **8**, 119-121.
61. Rioux S., Galarneau C., Harel J., Frey J., Nicolet J., Kobisch M., Dubreuil D. & Jacques M. (1999). – Isolation and characterisation of mini-Tn10 lipopolysaccharide mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Can. J. Microbiol.*, **45**, 1017-1026.
62. Rosendal S., Carpenter D.S., Mitchell W.R. & Wilson M.R. (1981). – Vaccination against pleuropneumonia of pigs caused by *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Can. vet. J.*, **22**, 34-35.
63. Ross B.C., Czajkowski L., Hocking D., Margetts M., Webb E., Rothel L., Patterson M., Agius C., Camuglia S. & Reynolds E. (2001). – Identification of vaccine candidate antigens from a genomic analysis of *Porphyromonas gingivalis*. *Vaccine*, **19**, 4135-4142.
64. Rycroft A.N. & Cullen J.M. (1990). – Complement resistance in *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae* infection of swine. *Am. J. vet. Res.*, **51**, 1449-1453.
65. Schwan T.G. & Piesman J. (2000). – Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. *J. clin. Microbiol.*, **38**, 382-388.
66. Segura M. & Gottschalk M. (2004). – Extracellular virulence factors of streptococci associated with animal diseases. *Front. Biosci.*, **9**, 1157-1188.
67. Takamatsu D., Osaki M. & Sekizaki T. (2002). – Evidence for lateral transfer of the suilysin gene region of *Streptococcus suis*. *J. Bacteriol.*, **184**, 2050-2057.

68. Tettelin H., Maignani V., Cieslewicz M.J., Eisen J.A., Peterson S., Wessels M.R., Paulsen I.T., Nelson K.E., Margarit I. & Read T.D. (2002). – Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. *Proc. natl Acad. Sci. USA*, **99**, 12391-12396.
69. Tkacikova E., Mikula I. & Dmitriev A. (2004). – Molecular epidemiology of group B streptococcal infections. *Folia microbiol.*, **49**, 387-397.
70. Torremorell M., Calsamiglia M. & Pijoan C. (1998). – Colonisation of suckling pigs by *Streptococcus suis* with particular reference to pathogenic serotype 2 strains. *Can. J. vet. Res.*, **62**, 21-26.
71. Tumamao J.Q., Bowles R.E., van den Bosch H., Klaasen H.L., Fenwick B.W., Storie G.J. & Blackall P.J. (2004). – Comparison of the efficacy of a subunit and a live streptomycin-dependent porcine pleuropneumonia vaccine. *Aust. vet. J.*, **82**, 370-374.
72. Urwin R., Russell J.E., Thompson E.A.L., Holmes E.C., Feavers I.M. & Maiden M.C.J. (2004). – Distribution of surface protein variants among hyperinvasive meningococci: implications for vaccine design. *Infect. Immun.*, **72**, 5955-5962.
73. Van Belkum A., Sluijter M., de Groot R., Verbrugh H. & Hermans P.W. (1996). – Novel BOX repeat PCR assay for high-resolution typing of *Streptococcus pneumoniae* strains. *J. clin. Microbiol.*, **34**, 1176-1179.
74. Van der Woude M.W. & Baumler A.J. (2004). – Phase and antigenic variation in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.*, **17**, 581-611.
75. Versalovic J., Koeuth T. & Lupski J.R. (1991). – Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 6823-6831.
76. Ward C.K. & Inzana T.J. (1994). – Resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to bacterial antibody and complement is mediated by capsular polysaccharide and blocking antibody specific for lipopolysaccharide. *J. Immunol.*, **153**, 2110-2121.
77. Watkins E.J., Brooksby P., Schweiger M.S. & Enright S.M. (2001). – Septicaemia in a pig-farm worker. *Lancet*, **357**, 38.
78. Wisselink H.J., Smith H.E., Stockhofe-Zurwieden N., Peperkamp K. & Vecht U. (2000). – Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries. *Vet. Microbiol.*, **74**, 237-248.
79. Wizemann T.M., Heinrichs J.H., Adamou J.E., Erwin A.L., Kunsch C., Choi G.H., Barash S.C., Rosen C.A., Masure H.R. & Tuomanen E. (2001). – Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect. Immun.*, **69**, 1593-1598.
80. Wolska K.I. (2003). – Horizontal transfer between bacteria in the environment. *Acta microbiol. pol.*, **52** (3), 233-243.
81. Yu H., Jing H., Chen Z., Zheng H., Zhu X., Wang H., Wang S., Liu L., Zu R., Luo L., Xiang N., Liu H., Liu X., Shu Y., Lee S.S., Chuang S.K., Wang Y., Xu J., Yang W. & *Streptococcus suis* Study Groups (2006). – Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China. *Emerg. infect. Dis.*, **12**, 914-920.
82. Zagursky R.J. & Russell D. (2001). – Bioinformatics: use in bacterial vaccine discovery. *Biotechniques*, **31**, 636-659.
-

