

LAETITIA BONIFAIT

Caractérisation de nouveaux facteurs de virulence chez *Streptococcus suis*

Thèse présentée

à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en microbiologie
pour l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph. D.)

DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE, DE MICROBIOLOGIE ET DE BIO-
INFORMATIQUE
FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE
UNIVERSITÉ LAVAL

2011

RÉSUMÉ

Les cas d'infections à *Streptococcus suis* sont très répandus dans tous les pays producteurs de porcs. Cet organisme est également reconnu comme un agent de zoonose pour les personnes en contact étroit avec les porcs ou leurs produits dérivés. De nombreux rapports indiquent que depuis le début des années soixante-dix, le nombre de cas d'infections ainsi que la gravité des infections à *S. suis* ont considérablement augmenté. Un temps d'incubation plus court, une progression plus rapide de la maladie, un taux plus élevé de mortalité soulignent la nécessité urgente de mieux comprendre les facteurs associés à la pathogenèse de l'infection par *S. suis*. Des 35 sérotypes décrits, le sérotype 2 demeure le plus fréquemment associé à un phénomène de septicémie et à des cas de maladies telles que les méningites, endocardites et pneumonies. C'est également le sérotype le plus souvent retrouvé chez l'humain et le porc. La pathogenèse de l'infection causée par *S. suis* est encore relativement mal connue. La présence d'une capsule riche en acide sialique est classiquement considérée comme un facteur de virulence essentiel, mais récemment d'autres facteurs ont également été cités. Cette étude avait pour but d'identifier et de caractériser de nouveaux déterminants de virulence chez *S. suis*. Dans un premier temps, la capacité de *S. suis* à former un biofilm a été étudiée. Il a été démontré que la présence de fibrinogène pouvait induire la formation d'un biofilm chez *S. suis*. Un mutant déficient pour l'expression de la capsule de même que des souches non-sérotypables de *S. suis* dépourvues de capsule ont montré une capacité de former un biofilm sans apport de fibrinogène. Il a été suggéré que la capsule chez *S. suis* pourrait cacher des adhésines de surface et ainsi interférer avec la formation du biofilm et les capacités d'adhésion. Dans un second temps, l'utilisation d'un mutant de *S. suis* déficient pour une pseudo-subtilisine a permis de démontrer le rôle critique de cette protéase pour le développement d'une infection dans un modèle de souris. La pseudo-subtilisine de *S. suis* a été clonée, purifiée et caractérisée. Certaines protéines de l'hôte comme le fibrinogène se sont révélées susceptibles à la protéase. Une stimulation de macrophages par la pseudo-subtilisine recombinante a induit à une forte sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Lors d'infections expérimentales à *S. suis* chez le porc, les animaux ont développé des anticorps

dirigés contre la pseudo-subtilisine, suggérant ainsi que cette protéase représente un immunogène d'intérêt pour la vaccination. Enfin, un nouveau modèle pour l'analyse de la virulence de *S. suis* a été mis au point utilisant l'amibe *Dictyostelium discoideum*. Ce modèle a mis en évidence des différences majeures entre des souches sauvages virulentes de *S. suis* et des mutants ayant une virulence atténuée dans des modèles animaux classiques. En conclusion, ce projet a permis d'améliorer nos connaissances des mécanismes étiopathogéniques des infections à *S. suis* et a ouvert de nouvelles perspectives de prévention et traitement de ces infections.

ABSTRACT

Streptococcus suis is a worldwide cause of various porcine infections in all pig producing countries. *S. suis* is a zoonotic agent that affects humans in close contact with sick or carrier pigs or with their derived products. Since the early seventies, many reports indicated a dramatic increase in the severity and number of *S. suis* infections. A shorter incubation time, a faster progression of the disease and a higher rate of mortality, highlight the urgent need to better understand the etiopathogenesis of *S. suis* infections. Thirty-five serotypes of *S. suis* have been described, but serotype 2 is most commonly associated with a phenomenon of sepsis and incidence of diseases such as meningitis, endocarditis and pneumonia. It is also the serotype most often found in humans and pigs. The pathogenesis of *S. suis* infections is still relatively unknown. Many putative virulence factors produced by *S. suis* have been described, including a sialic acid rich capsule that is classically considered as an essential virulence factor. The purpose of this project was to identify and characterize novel virulence factors produced by *S. suis*. First, the capacity of *S. suis* to form a biofilm was investigated. It was found that the presence of fibrinogen induced biofilm formation by *S. suis*. A mutant deficient in capsule expression as well as non-typeable strains lacking the capsule demonstrated an ability to form a biofilm without exogenous fibrinogen. It was suggested that the capsule may hide important adhesins or hydrophobic molecules that mediate biofilm formation. Second, using a *S. suis* mutant deficient in subtilisin-like protease, it was found that this enzyme plays an important role in the pathogenicity of the bacterium in a mouse model. The subtilisin-like protease of *S. suis* was cloned, purified and characterized. Some host proteins such as fibrinogen were found to be degraded by the subtilisin-like protease. The recombinant protease induced a significant cytokine secretion in macrophages. It also stimulated the production of antibodies in response to *S. suis* infections in pigs and therefore additional studies should investigate whether it represents a promising candidate for a protein-based vaccine. Last, a study was designed to evaluate whether the amoeba *Dictyostelium discoideum* can be a relevant system to investigate the virulence of *S. suis*. This model revealed major differences between virulent wild type strains of *S. suis* and mutants that showed an

attenuated virulence in classical animal models. In conclusion, this project allowed to increase our knowledge on the etiopathogenic mechanism of *S. suis* infections and opened new avenues on the prevention and treatment of these diseases.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
ABSTRACT	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
REMERCIEMENTS.....	xi
AVANT-PROPOS	xiv
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xviii
LISTE DES FIGURES	xx
LISTE DES TABLEAUX	xxiii
CHAPITRE 1: INTRODUCTION	1
1.1 Les infections porcines	1
1.2 <i>Streptococcus suis</i>	1
1.2.1 Historique et systématique de <i>S. suis</i>	1
1.2.1.1 Streptocoques.....	1
1.2.1.2 Classification et sérotypie.....	2
1.2.1.3 Arbre phylogénétique	3
1.2.2 Caractères bactériologiques de <i>S. suis</i>	4
1.2.3 Épidémiologie des infections à <i>S. suis</i>	5
1.2.4 <i>S. suis</i> comme agent de zoonose.....	6
1.2.5 Traitements des infections à <i>S. suis</i>	8
1.2.6 Facteurs de virulence de <i>S. suis</i>	9
1.2.6.1 Capsule polysaccharidique	10
1.2.6.2 Protéines MRP et EF	11
1.2.6.3 Suilysine	12
1.2.6.4 Adhésines.....	13
1.2.6.5 α -énolase	15
1.2.6.6 Protéases	15

1.2.6.7 Facteur opacifiant le sérum.....	16
1.2.6.8 Désoxyribonucléase SsnA	16
1.2.6.9 Sortases	17
1.2.6.10 AdcR et Fur.....	17
1.2.6.11 Trag.....	18
1.2.6.12 CiaRH	18
1.2.6.13 Hyaluronate lyase	19
1.2.6.14 Inosine 5-monophosphate déshydrogénase	19
1.2.6.15 VirA	19
1.2.6.16 Îlot de pathogénicité.....	20
1.2.6.17 Phospholipase C.....	20
1.2.6.18 D-alanylation des acides lipotéichoïques.....	21
1.2.6.19 Régulateur de transcription Rgg	21
1.2.6.20 Pili.....	22
1.2.7 Pathogenèse des infections à <i>S. suis</i>	22
1.2.8 Modèles d'étude de la virulence de <i>S. suis</i>	26
1.3 Le biofilm	29
1.3.1 Définition et historique du biofilm	29
1.3.2 Formation du biofilm	30
1.3.3 Biofilm et <i>quorum sensing</i> chez les bactéries à Gram positifs	33
1.3.4 Résistance du biofilm	34
1.3.4.1 Résistance aux antibiotiques.....	34
1.3.4.2 Résistance au système immunitaire de l'hôte	35
1.3.5 Rôle du biofilm dans les endocardites et méningites bactériennes.....	36
1.3.6 Biofilm et <i>S. suis</i>	38
1.4 Les protéases.....	39
1.4.1 Généralités	39
1.4.2 Protéases microbiennes.....	41
1.4.3 Protéases de <i>S. suis</i>	41
1.4.3.1 Arginine-aminopeptidase.....	42

1.4.3.2 Caséinase	42
1.4.3.3 IgA1 protéase	43
1.4.3.4 Dipeptidyl peptidase IV	43
1.4.3.5 Pseudo-subtilisine	44
1.5 Problématique, hypothèse et objectifs	47
1.5.1 Problématique	47
1.5.2 Hypothèse	47
1.5.3 Objectifs.....	47
1.6 Impact de l'étude	49
CHAPITRE 2: ÉTUDE DE LA FORMATION DU BIOFILM CHEZ <i>S. suis</i>	50
2.1 Article 1: Fibrinogen induces biofilm formation by <i>Streptococcus suis</i> and enhances its antibiotic resistance.....	50
2.1.1 Résumé	51
2.1.2 Abstract.....	52
2.1.3 Introduction, results, discussion, conclusion	53
2.1.4 Acknowledgments	57
2.1.5 References.....	57
2.2 Article 2: Pleiotropic effects of polysaccharide capsule loss on selected biological properties of <i>Streptococcus suis</i>	65
2.2.1 Résumé	66
2.2.2 Abstract.....	67
2.2.3 Introduction, results, discussion, conclusion	68
2.2.4 Acknowledgments	75
2.2.5 References.....	75
2.3 Article 3: Cell surface characteristics of non-typeable isolates of <i>Streptococcus suis</i>	83
2.3.1 Résumé	84
2.3.2 Abstract.....	85
2.3.3 Introduction.....	86
2.3.4 Material and methods.....	87

2.3.5 Results.....	90
2.3.6 Discussion.....	91
2.3.7 Acknowledgments	93
2.3.8 References.....	93
CHAPITRE 3: CARACTÉRISATIONS BIOCHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DE LA PSEUDO-SUBTILISINE DE <i>S. suis</i>	102
3.1 Article 4: The cell envelope subtilisin-like proteinase is a virulence determinant for <i>Streptococcus suis</i>	102
3.1.1 Résumé	103
3.1.2 Abstract.....	104
3.1.3 Background.....	105
3.1.4 Methods	106
3.1.5 Results.....	110
3.1.6 Discussion.....	112
3.1.7 Conclusion	115
3.1.8 Author's contributions	115
3.1.9 Acknowledgments	115
3.1.10 References.....	115
3.2 Article 5: Purification and characterization of the subtilisin-like protease of <i>Streptococcus suis</i> that contributes to its virulence	129
3.2.1 Résumé	130
3.2.2 Abstract.....	131
3.2.3 Introduction.....	132
3.2.4 Materials and methods.....	133
3.2.5 Results.....	138
3.2.6 Discussion.....	140
3.2.7 Acknowledgments	143
3.2.8 References.....	143
3.3 Article 6: The SspA subtilisin-like protease of <i>Streptococcus suis</i> triggers a pro- inflammatory response in macrophages through a non-proteolytic mechanism	155

3.3.1 Résumé	156
3.3.2 Abstract.....	157
3.3.3 Background.....	158
3.3.4 Methods	159
3.3.5 Results.....	162
3.3.6 Discussion.....	164
3.3.7 Conclusions.....	167
3.3.8 Authors' contribution.....	167
3.3.9 Acknowledgments	167
3.3.10 References.....	167
CHAPITRE 4: MISE AU POINT D'UN NOUVEAU MODÈLE D'ÉTUDE DE LA VIRULENCE DE <i>S. suis</i>	178
4.1 Article 7: An amoeba host model to evaluate <i>Streptococcus suis</i> virulence	178
4.1.1 Résumé	179
4.1.2 Abstract.....	180
4.1.3 Introduction, results, discussion, conclusion	181
4.1.4 Acknowledgements.....	184
4.1.5 References.....	184
CHAPITRE 5: DISCUSSION	190
CHAPITRE 6: CONCLUSION	207
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	208
ANNEXES.....	238
1. Article 8: Les probiotiques en santé buccale: mythe ou réalité ?	238
1.1. Sommaire	239
1.2. Caractéristiques des probiotiques	240
1.3. Modes d'action des probiotiques	241
1.4. Application des probiotiques à la santé buccodentaire.....	241
1.4.1. Probiotiques d'intérêt.....	241
1.4.2. Probiotiques et carie dentaire.....	243

1.4.3. Probiotiques et maladies parodontales.....	244
1.4.4. Probiotiques et halitose.....	247
1.5. Conclusion.....	248
1.6. Références.....	248
2. Article 9: Les polyphénols de la canneberge: Effets bénéfiques potentiels contre la carie dentaire et la maladie parodontale	254
2.1. Sommaire.....	255
2.2. Composition chimique des extraits des fruits de la canneberge	256
2.3. Étiologie de la carie dentaire et de la maladie parodontale	257
2.4. Canneberge et carie dentaire.....	258
2.5. Canneberge et maladie parodontale.....	259
2.6. Conclusion	261
2.7. Références.....	262

REMERCIEMENTS

Cette thèse, je suis loin de l'avoir réalisée toute seule alors je tiens à remercier sincèrement toutes les personnes qui y ont apporté leur contribution:

En premier, je tiens fortement à remercier mon directeur de recherche le Dr Daniel Grenier, qui m'a beaucoup apporté au cours de ce doctorat. Je n'aurais pu souhaiter de meilleur directeur de thèse. Il m'a permis d'apprendre énormément tout au long de ces quatre années et demie, j'ai ainsi pu découvrir et évoluer dans le monde de la recherche, c'est grâce à lui que mon nom se retrouve sur PubMed... Si j'ai acquis une certaine maturité scientifique aujourd'hui c'est au Dr Grenier que je le dois. En plus de son sympathique accueil, malgré les heures d'attentes à l'aéroport, il m'a fait confiance et a été d'un grand soutien tout au long de ces dernières années et en particulier pendant les voyages Québec – Ste-Hyacinthe !

Je tiens à remercier ensuite, les membres de mon comité aviseur, sans qui je n'aurais pu présenter cette thèse. La Dre Fatiha Chandad qui a toujours été présente pour me reconforter en particulier lors de mon examen pré-doctoral. Je remercie toutes ses attentions si gentilles envers moi, ses précieux conseils et sa disponibilité qui font que Dre Fatiha Chandad est bien plus pour moi qu'un simple membre de comité aviseur. Le Dr Michel Frenette, qui a toujours su trouver les mots et être encourageant que ce soit au cours des rencontres de comité aviseur, ou lors de mes nombreuses interventions dans son bureau. Jamais je n'ai été accueillie avec autre chose qu'un sourire. Le Dr Michel Frenette compte beaucoup pour moi. Le Dr Marcelo Gottschalk qui a toujours eu un mot plaisant à mon égard lors de nos déplacements à Ste-Hyacinthe. Malgré le peu de temps libre dont il disposait pendant les différents congrès, il a toujours pris le temps de venir discuter afin de prendre des nouvelles sur les avancées de mes recherches.

Je remercie la Dre Mariela Segura pour avoir accepté d'être évaluatrice externe sur cette thèse. Je tiens aussi à la remercier pour son accueil lors des différentes rencontres du CRIP.

Je remercie considérablement Louis Grignon, pour toutes ces années où je n'ai fait que lui poser des questions, pour toute l'aide qu'il m'a apportée et pour nos grands moments de réflexion sur *S. suis* ! Mais pourquoi ça ne pousse pas... Merci aussi pour mon enveloppe scellée, j'ai hâte de pouvoir l'ouvrir !

Je remercie aussi Katy Vaillancourt pour son aide au laboratoire avec la pseudo-subtilisine; sans elle les articles scientifiques ne pourraient se trouver dans cette thèse. Merci également pour la découverte d'une vraie cabane à sucre...

Je tiens également à remercier vivement mes collègues de laboratoire et amis Annie (je ne la remercierais jamais assez de cette longue journée où nous avons étalé 11L de pétri sang complet, merci pour ton aide), Dang, Hayette (merci pour ton accueil lors de mon arrivée en chambre universitaire et tous les services rendus), Israël, Jabrane (merci pour toute cette simplicité, cette gentillesse et ces St-Patrick), Juliana, Karine (ma première amie libanaise, merci aussi pour toutes ces petites pitas au thym), Marie-Pierre (un énorme merci pour les moments au labo, tes conseils et mon installation dans mon 1½; merci aussi à Alexandre), Mark, Séverine (merci pour tous ces moments au GREB, tout ce chocolat... enfin merci Philippe...) et Shin ichi.

Je remercie le Dr Steve Charette qui grâce à une soutenance de séminaire m'a offert la chance de m'initier à une nouvelle thématique au sein de son laboratoire. Je le remercie pour son accueil et sa disponibilité. Je remercie aussi mes collègues amibes qui ont rendu cette expérience encore plus agréable et enrichissante principalement Geneviève, Valérie et Stéphanie.

Je tiens également à particulièrement remercier Luc Trudel sans qui je n'aurais pas progressé dans le monde des auxiliaires de laboratoires et qui a passé du temps sur mon travail. Merci pour son soutien, ses conseils, sa gentillesse et surtout pour tout ce qu'il m'a permis de découvrir. Une très belle rencontre et amitié.

Je tiens également à remercier le Dr Sylvain Moineau qui m'a permis d'être auxiliaire de laboratoire dans son cours. Je le remercie aussi pour ses conseils et son aide concernant l'après thèse.

Plus personnellement je tiens à remercier mes parents pour tout ! Vraiment tout ! Inutile de préciser que sans eux je ne serais pas là et à quel point ils sont importants dans tout ça.

Mon oncle et ma tante, Jacky et Henriette; mes cousins Élodie, Julien et Mickael qui m'ont apporté beaucoup de soutien durant toutes ces années et en particulier mes années à la Faculté de Poitiers... Parce qu'il y a aussi eu un avant thèse !

Je remercie Antoine pour avoir vécu cette étape auprès de moi mais surtout pour tous les bons moments que nous avons passés au Québec.

Je remercie Claire, mais aussi Stéphane, Louis et XX ou XY pour tous les appels téléphoniques qu'ils m'ont passés il n'y a presque pas eu une fin de semaine sans eux ! Je remercie également Claire pour toutes les lectures et corrections si rapides et efficaces de ma thèse... Merci à eux d'être venus, 2 fois...

Je remercie Anne-Laure et Jérôme (merci pour tous ces moments pictaviens, et les nouvelles de France), Antonin, Gauthier, Guillaume (merci pour les nombreuses discussions autour d'un Subway), Ludivine et Sébastien, Mathilde (merci pour tous ces moments québécois), Mathieu (merci pour ces moments foot non pardon hockey...), Marie-Eve (merci pour ton amitié, ta si précieuse aide et toutes ces ballades... surtout Haaaaamilton !), Murielle (merci pour ton soutien, et cette riche année découverte en colocation), Pierre (merci pour les midis Vachon) et Véronique (merci aussi pour tous les moments aldo...).

Pour finir et non le moindre, je remercie le Dr Jean Marc Berjeaud, sans qui je n'aurais pas poursuivi en thèse. Et qui sait toute l'importance qu'il a.

AVANT-PROPOS

Le travail suivant est structuré en trois parties. La première partie constitue une introduction ayant pour but de faire une mise à jour des connaissances sur *Streptococcus suis*. La deuxième partie, divisée en 7 sections, présente sous forme d'articles scientifiques les résultats obtenus au cours de ce projet. Enfin, la discussion générale retrouvée dans la dernière partie vise à faire le lien entre les connaissances déjà acquises sur *S. suis* et celles découvertes au cours de ce projet.

Premier article:

Fibrinogen induces biofilm formation by *Streptococcus suis* and enhances its antibiotic resistance. Cet article a été publié en 2008 dans la revue Applied and Environmental Microbiology, sous la référence 74(15):4969-72. La contribution de chacun des auteurs est la suivante: le premier auteur (Laetitia Bonifait) a réalisé l'ensemble des expérimentations, à l'exception des expériences portant sur la formation du biofilm en présence de diverses protéines qui ont été réalisées par Louis Grignon. Le premier auteur a également préparé la première version du manuscrit. Le Dr Daniel Grenier a conçu l'étude et supervisé la rédaction de l'article en y apportant ses commentaires et corrections.

Deuxième article:

Pleiotropic effects of polysaccharide capsule loss on selected biological properties of *Streptococcus suis*. Cet article a été publié en 2010 dans la revue Canadian Journal of Veterinary Research, sous la référence 74(1):65-70. La contribution de chacun des auteurs est la suivante: Le Dr Shin-ichi Tanabe a réalisé toutes les expériences reliées à la stimulation des macrophages. Laetitia Bonifait a réalisé les expériences concernant la résistance aux antibiotiques des souches. Le Dr Nahuel Fittipaldi a rendu possible la réalisation de cette étude en construisant les mutants non-capsulés de *S. suis*. Louis Grignon a réalisé les expériences de formation du biofilm en présence de fibrinogène. Le Dr Marcelo Gottschalk a participé à la rédaction de l'article. Le Dr Daniel Grenier a conçu

l'étude et participé à la rédaction de l'article en y apportant ses commentaires et corrections.

Troisième article:

Cell surface characteristics of non-typeable isolates of *Streptococcus suis*. Cet article a été publié en 2010 dans la revue FEMS Microbiology Letters, sous la référence 311(2):160-6. La contribution de chacun des auteurs est la suivante: Laetitia Bonifait a réalisé la totalité des expériences de cette étude et préparé la première version du manuscrit. Le Dr Marcelo Gottschalk a fourni les souches de *S. suis* essentielles à la réalisation de cette étude. Le Dr Daniel Grenier a conçu l'étude et supervisé la rédaction de l'article en y apportant ses commentaires et corrections.

Quatrième article:

The cell envelope subtilisin-like proteinase is a virulence determinant for *Streptococcus suis*. Cet article a été publié en 2010 dans la revue BioMed Central Microbiology, sous la référence 10;10:42. La contribution de chacun des auteurs est la suivante: Laetitia Bonifait a réalisé les études de croissance et de susceptibilité des souches au sang complet; elle a également préparé en partie la première version du manuscrit. Katy Vaillancourt et Christian Bart ont effectué les expériences de biologie moléculaire. La Dre Maria de la Cruz Dominguez-Punaro a réalisé les expériences dans le modèle de souris. Le Dr Marcelo Gottschalk a mis à notre disposition une banque de mutants de *S. suis* et a contribué à la rédaction du manuscrit. Le Dr Daniel Grenier a conçu l'étude et supervisé la rédaction de l'article en y apportant ses commentaires et corrections.

Cinquième article:

Purification and characterization of the subtilisin-like protease of *Streptococcus suis* that contributes to its virulence. Cet article a été publié en 2010 dans la revue Veterinary Microbiology, sous la référence 148(2-4):333-40. La contribution de chacun des auteurs est la suivante: le premier auteur (Laetitia Bonifait) a réalisé les expériences reliées à la caractérisation de la protéase et a préparé en partie la première version du manuscrit. Katy

Vaillancourt a réalisé la purification de la protéase et rédigé la section « matériel et méthodes » concernant cette partie de l'étude. Le Dr Michel Frenette a participé à la conception de cette étude et a contribué à la rédaction de l'article. Le Dr Marcelo Gottschalk a mis à notre disposition une banque de mutants de *S. suis* et a contribué à la rédaction de l'article. Le Dr Daniel Grenier a conçu l'étude et supervisé la rédaction de l'article en y apportant ses commentaires et corrections.

Sixième article:

The SspA subtilisin-like protease of *Streptococcus suis* triggers a pro-inflammatory response in macrophages through a non-proteolytic mechanism. Cet article a été publié en 2011 dans la revue BioMed Central Microbiology, sous la référence 1;11:47. La contribution de chacun des auteurs est la suivante: Laetitia Bonifait a réalisé la totalité des expériences et a préparé la première version du manuscrit. Le Dr Daniel Grenier a conçu l'étude et supervisé la rédaction de l'article en y apportant ses commentaires et corrections.

Septième article:

An amoeba host model to evaluate *Streptococcus suis* virulence. Cet article a été soumis pour publication dans la revue Applied and Environmental Microbiology. La contribution de chacun des auteurs est la suivante: Laetitia Bonifait a réalisé l'ensemble des expériences et participé à la rédaction de l'étude. Le Dr Steve J. Charette a conçu l'étude, supervisé l'interprétation des résultats et participé à la rédaction de l'article. Geneviève Filion a eu un apport technique significatif pour la réalisation de l'étude. Le Dr Marcelo Gottschalk a mis à notre disposition les souches mutantes nécessaires à la réalisation de l'étude. Le Dr Daniel Grenier a participé à la conception de l'étude et a supervisé la rédaction de l'article en y apportant ses commentaires et corrections.

En annexe se retrouvent deux articles de revue scientifique qu'il m'a été donné la chance de rédiger au cours de mes études de doctorat.

Annexe 1:

Les probiotiques en santé buccale: mythe ou réalité ? Cet article a été publié en 2009 dans la revue Journal of the Canadian Dental Association, sous la référence 75(8):585-90. Les auteurs sont Laetitia Bonifait, Dre Fatiha Chandad et Dr Daniel Grenier.

Annexe 2:

Les polyphénols de la canneberge: Effets bénéfiques potentiels contre la carie dentaire et la maladie parodontale. Cet article a été publié en 2010 dans la revue Journal of the Canadian Dental Association, sous la référence 76:a130. Les auteurs sont Laetitia Bonifait et Dr Daniel Grenier.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA	Acide aminé
Ac	Anticorps
AI-2	Auto-inducteur de type 2
Ag	Antigène
BBB	Barrière hémato-méningée
BMEC	Cellules endothéliales microvasculaires de cerveau
ClfA	Facteur d'agglutination de type A
CO ₂	Dioxyde de carbone
Coll.	Collaborateurs
CRIP	Centre de recherche en infectiologie porcine
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
DIG	Digoxygénine
DPP IV	Dipeptidyl peptidase IV
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EF	Facteur extracellulaire
FBPS	Protéine liant la fibronectine et le fibrinogène
FBS	Sérum de veau fœtal
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
Gal	Galactose
GCP-2	Protéine chimiotactique des granulocytes 2
GFP	Protéine à fluorescence verte
GlcNAc	N-acétyl glucosamine
Glu	Glucose
GREB	Groupe de recherche en écologie buccale
GREMIP	Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc
HBMEC	Cellules endothéliales microvasculaires de cerveaux humains
IgA	Immunoglobuline A
IL	Interleukine

IMPDH	Inosine 5-monophosphate déshydrogénase
IPA	Ilots de pathogénicité
Ivi	Induit <i>in vivo</i>
kDa	Kilo Dalton
LPS	Lipopolysaccharide
LTA	Acide lipotéchoïque
MAPK	Protéines kinases activées par les mitogènes
MCP-1	Protéine-1 chimioattractive des monocytes
MRP	Protéine relâchée par la muramidase
MSCRAMM	Composants de la surface microbienne reconnaissant les molécules de la matrice extracellulaire
NAP-2	Peptide d'activation des neutrophiles 2
Neu5Ac	N-acétylneuraminique
NPTr	Newborn pig trachea
OFS	Facteur opacifiant le sérum
PBMEC	Cellules endothéliales microvasculaires de cerveaux porcins
PRRSV	Virus du syndrome respiratoire et reproductif porcin
PSC	Peptide stimulant la compétence
Rha	Rhamnose
SGC	Streptocoques du groupe C
SNC	Système nerveux central
<i>S. suis</i>	<i>Streptococcus suis</i>
SsEno	Alpha-enolase de <i>S. suis</i>
SsnA	Désoxyribonucléase sécrétée de <i>S. suis</i>
STM	Mutagenèse par étiquette signature
StrA	Sortase A
THB	Bouillon Todd-Hewitt
UFC	Unité formant des colonies
6PDH	6-phosphogluconate déshydrogénase

LISTE DES FIGURES

Figure 1-1: Arbre phylogénétique représentatif du genre <i>Streptococcus</i> basé sur des comparaisons d'ARNr 16S (d'après Nobbs <i>et al.</i> 2009).	4
Figure 1-2: Synthèse des connaissances et des hypothèses proposées pour les différentes étapes de la pathogenèse de la méningite à <i>S. suis</i> sérotype 2 (d'après Gottschalk et Segura, 2000). Hem+: souches positives pour l'hémolysine; Hem-: souches négatives pour l'hémolysine; Mo: monocytes, M ϕ : macrophages; BBB: barrière hématoméningée.	25
Figure 1-3: Étapes dans la formation d'un biofilm (d'après Costerton, 1999).....	32
Figure 1-4: Représentation schématique d'un biofilm et de sa structure mature en forme « champignon » (d'après Donlan & Costerton, 2002).....	33
Figure 2-1: Effect of various mammalian proteins (5 mg/ml) added to the culture medium on biofilm formation by <i>S. suis</i> S735.	60
Figure 2-2: Effect of various concentrations of human fibrinogen added to the culture medium on biofilm formation by <i>S. suis</i> S735.	61
Figure 2-3: Effect of human fibrinogen on biofilm formation by various strains of <i>S. suis</i> .62	
Figure 2-4: Scanning electron micrographs of <i>S. suis</i> S735 biofilms formed on plastic tissue culture coverslips following growth in the absence (A and C) and presence of 5 mg/ml human fibrinogen (B and D).....	63
Figure 2-5: Biofilm formation by <i>S. suis</i> S735 and its unencapsulated mutant BD101.	79
Figure 2-6: Secretion of TNF- α (panel A), IL-1 β (panel B), IL-6 (panel C), and IL-8 (panel D) by monocyte-derived macrophages infected with whole cells of <i>S. suis</i> S735 and its capsule deficient mutant BD101 at MOIs of 1, 10, 50 and 100.	80

Figure 2-7: Scanning electron micrographs of human brain microvascular endothelial cells (HBMEC) infected with non-typeable (1078212, 1079277) and serotype 2 (S735) strains of <i>S. suis</i>	97
Figure 2-8: Visualization of <i>S. suis</i> capsule by transmission electron microscopy following ruthenium red staining.	98
Figure 2-9: Biofilm formation by non-typeable (1079277, 1097925, 1078212, 1185293, 1148795, 1077009, 1079506) and serotype 2 (S735, 90-1330, 99-1539B, 89-4223, 89-999, 31533) strains of <i>S. suis</i>	99
Figure 3-1: Southern blot of <i>S. suis</i> P1/7 and the Tn917 mutants. Chromosomal DNA was digested with <i>Hind</i> III restriction endonuclease and hybridized with a DIG-labeled probe specific for the <i>erm</i> gene.....	121
Figure 3-2: Alignment of the catalytic triad (Asp ₂₀₀ - His ₂₃₉ - Ser ₅₆₈ ; indicated by arrows) of <i>S. suis</i> SSU057 and homologous streptococcal subtilisin-like proteinases.	122
Figure 3-3: Distribution of the gene coding for the SSU0757 protein in various <i>S. suis</i> strains.....	123
Figure 3-4: Survival of <i>S. suis</i> wild-type strain P1/7 and mutants M3G and G6G in human whole blood	124
Figure 3-5: Survival of mice inoculated with the wild-type strain P1/7, M3G, or G6G...	125
Figure 3-6: SDS-PAGE analysis with Coomassie blue staining of the recombinant subtilisin-like protease (SspA) of <i>S. suis</i>	147
Figure 3-7: Effects of treatments or conditions on the activity of the recombinant subtilisin-like protease (SspA) of <i>S. suis</i> measured using the chromogenic substrate N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe- <i>p</i> Na.	148

Figure 3-8: Degradation of gelatin and human fibrinogen by the recombinant subtilisin-like protease (SspA) of <i>S. suis</i>	149
Figure 3-9: Effect of the recombinant subtilisin-like protease (SspA) of <i>S. suis</i> on fibrin formation from fibrinogen and on thrombin-mediated fibrin formation from fibrinogen. 150	
Figure 3-10: Effect of the recombinant subtilisin-like protease (SspA) of <i>S. suis</i> on viability of HBMEC and NPTr cells following a 48-h treatment.	151
Figure 3-11: Identification of the subtilisin-like protease (SspA) of <i>S. suis</i> by porcine sera, as determined by SDS-PAGE and Western immunoblotting.	152
Figure 3-12: Cytokine secretion by PMA-differentiated U937 macrophages stimulated with the recombinant SspA of <i>S. suis</i> or with pancreatic trypsin.	173
Figure 3-13: CCL5, IL-6 and CXCL8 degradation by the recombinant SspA of <i>S. suis</i> . 174	
Figure 3-14: Effect of kinase inhibitors on the secretion of CCL5, CXCL8 and IL-6 by PMA-differentiated U937 macrophages stimulated with the recombinant SspA (33 µg/ml) of <i>S. suis</i>	175
Figure 4-1: Assessment of <i>S. suis</i> virulence using the <i>D. discoideum</i> model.....	187
Figure 4-2: Visualization of <i>S. suis</i> capsule by transmission electron microscopy following ruthenium red staining.	188
Figure 5-1: Impact de la présence ou de l'absence d'une capsule chez <i>S. suis</i> dans le phénomène de formation du biofilm.....	196
Figure 5-2: Rôles pathogéniques de la pseudo-subtilisine SspA de <i>S. suis</i>	204
Figure 1: Propriétés idéales du probiotique destiné à un usage dans un contexte d'affections buccales.....	253

LISTE DES TABLEAUX

Table 2-1: Minimal inhibitory concentrations (MICs) and minimal bactericidal concentrations (MBCs) of penicillin G for planktonic- and biofilm-grown <i>S. suis</i> S735 and AAH4 cells.	64
Table 2-2: Comparative analyses of <i>S. suis</i> S735 and its unencapsulated mutant BD101 for lectin-binding, fibrinogen-binding, and chymotrypsin-like activities.	81
Table 2-3: Minimal inhibitory and minimal bactericidal concentrations of <i>S. suis</i> S735 and its unencapsulated mutant BD101 to penicillin G, ampicillin, and tetracycline.....	82
Table 2-4: Strains of <i>S. suis</i> used in this study.	100
Table 2-5: Autoaggregation, cell surface hydrophobicity, and adherence to protein-coated polystyrene surfaces of non-typeable (1079277, 1097925, 1078212, 1185293, 1148795, 1077009, 1079506) and serotype 2 (S735, 90-1330, 99-1539B, 89-4223, 89-999, 31533) strains of <i>S. suis</i>	101
Table 3-1: Percentage identity of the amino acid (a.a.) sequences of <i>S. suis</i> P1/7 SSU0757 with proteinases from other streptococcal species.....	126
Table 3-2: Generation times of <i>S. suis</i> P1/7 and the Tn917 mutants deficient in the cell surface subtilisin-like proteinase.	127
Table 3-3: Virulence in CD1 mice of <i>S. suis</i> wild-type strain P1/7 and mutants M3G and G6G.....	128
Table 3-4: Strains and plasmids used in the study.....	153
Table 3-5: Effect of protease inhibitors on degradation of the chromogenic substrate N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNa by the recombinant subtilisin-like protease (SspA) of <i>S. suis</i>	154

Table 3-6: Effect of heat treatment or the presence of polymyxin B on cytokine secretion by PMA-differentiated U937 macrophages stimulated with the recombinant SspA (33 µg/ml) of <i>S. suis</i>	176
Table 3-7: Cytokine secretion by PMA-differentiated U937 macrophages following stimulation with <i>S. suis</i> P1/7 and its SspA deficient mutant G6G.....	177
Table 4-1: Susceptibility of <i>S. suis</i> to <i>D. discoideum</i> predation. The ability of <i>D. discoideum</i> to grow on a bacterial lawn was assessed by plating different amounts of amoebae.....	189
Tableau 1: Résumé des modes d'action des polyphénols de la canneberge sur la carie dentaire et la maladie parodontale.....	266

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

1.1 Les infections porcines

L'industrie porcine représente en 2010 environ 15 millions de porcs au Canada dont 4 millions au Québec; lesquels sont susceptibles aux infections virales et bactériennes. Les infections porcines engendrent des pertes économiques considérables dans l'industrie agroalimentaire canadienne, américaine, française et chinoise (Staats, *et al.*, 1997, Euzéby, 1999). Plus spécifiquement, aux États-Unis, le coût annuel relié aux infections à *S. suis* s'élève à plus de 500 millions de dollars pour la filière porcine (Neumann, *et al.*, 2005).

Un grand nombre d'infections porcines sont causées par *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus suis*, *Escherichia coli*, *Treponema* sp., ou le virus du syndrome respiratoire et reproductif porcin (PRRSV) (Wesley, *et al.*, 2006, MacInnes, *et al.*, 2008). Les études microbiologiques menées chez le porc ont révélé la présence de nombreuses espèces de streptocoques, retrouvées tant au niveau des voies respiratoires que des intestins. Certaines d'entre elles sont des pathogènes opportunistes, *Streptococcus suis* et *Streptococcus bovis*, alors que d'autres sont considérées comme simplement membres de la flore commensale du porc, *Streptococcus intestinalis* et *Streptococcus hyointestinalis* (Lun, *et al.*, 2007).

1.2 Streptococcus suis

1.2.1 Historique et systématique de *S. suis*

1.2.1.1 Streptocoques

Les streptocoques ont été parmi les premiers microorganismes identifiés à l'origine de maladies contagieuses, et leur existence a conduit à l'introduction de pratiques d'hygiène et d'asepsie dans les services hospitaliers (Nobbs, *et al.*, 2009). *Streptococcus* vient du grec

strepto (tordue) et coccus (sphérique). Plus de cent espèces de streptocoques sont actuellement connues.

C'est en Hollande et au Royaume-Uni en 1950 que les premiers cas de septicémie chez le porc dus à une infection à streptocoques ont été mis en évidence (Staats, *et al.*, 1997). Ce n'est qu'en 1963 que De Moor a décrit cette espèce bactérienne hémolytique, isolée des porcs atteints d'une septicémie, comme un nouveau type de streptocoque. Cette nouvelle espèce, *S. suis*, démontrait des caractéristiques biochimiques et sérologiques différentes des streptocoques préalablement identifiés (Staats, *et al.*, 1997).

1.2.1.2 Classification et sérotypie

Les streptocoques isolés de porcs malades par De Moor au début des années 1960 ont été considérés comme appartenant à de nouveaux groupes du système de classification de Lancefield (De Moor, 1963). Classées parmi les groupes R, S, RS et T de Lancefield, les souches de streptocoques se sont avérées en réalité membres du groupe D. Les bactéries étaient capsulées et leur classification était fondée sur le matériel capsulaire et non sur la paroi. À cette époque, les streptocoques étaient connus comme *S. suis* sérotype 1 (groupe S), sérotype 2 (groupe R), sérotype 1/2 (groupe RS) et sérotype 15 (groupe T) (Elliott, *et al.*, 1977, Gottschalk, *et al.*, 2001).

La sérotypie des souches de *S. suis* est fondée sur la composition du matériel capsulaire. Actuellement, on dénombre 35 sérotypes de *S. suis* (sérotypes 1 à 34 et le sérotype 1/2), appelés types capsulaires ou sérovars dans la littérature (Higgins, *et al.*, 1995, Messier, *et al.*, 2008). Des études portant sur le séquençage de l'ARNr 16S ont montré que la plupart des souches de référence de *S. suis* appartenant aux divers sérotypes forment un groupe homogène, quoique les sérotypes 32, 33 et 34 semblent légèrement différents (Chatellier, *et al.*, 1998, Marois, *et al.*, 2006).

Le sérotypage est une étape importante dans la procédure de diagnostic des infections à *S. suis*. Quoique différentes méthodes aient été décrites, la plupart des laboratoires utilisent la technique de coagglutination (Breton, *et al.*, 1986, Gottschalk, *et al.*, 1993, Costa, *et al.*, 2005). Toutefois, Gottschalk et coll. ont démontré que des réactions croisées non-spécifiques pouvaient se produire entre les différents types capsulaires de *S. suis* (Gottschalk, *et al.*, 1989). Ainsi, il est conseillé de confirmer le résultat obtenu par un test de précipitation capillaire ou un test de réaction capsulaire (Hommez, *et al.*, 1986).

L'existence de souches non-sérotypables de *S. suis* a également été rapportée (Higgins & Gottschalk, 2000, Marois, *et al.*, 2006, Benga, *et al.*, 2008, Wei, *et al.*, 2009, Bonifait, *et al.*, 2010). Plus précisément, Wei et coll. ont caractérisé 407 souches de *S. suis* isolées de porcs malades en Chine et ont démontré que 43.2% des souches étaient de sérotype 2 alors que 5.4% étaient dites non-sérotypables (Wei, *et al.*, 2009). La diversité des sérotypes chez les porcs varie principalement en fonction de l'origine géographique des échantillons. Les sérotypes 2, 1/2, 3 et 8 sont les plus fréquemment isolés de porcs malades au Québec (Gottschalk, *et al.*, 2010).

1.2.1.3 Arbre phylogénétique

Les streptocoques peuvent également être sous-divisés en six grands groupes (Figure 1-1) selon leurs séquences d'ARNr 16S, soit *anginosus*, *bovis*, *mitis*, *mutans*, pyogénique et *salivarius* (Kilian, 2005, Nobbs, *et al.*, 2009). Toutefois, *S. suis* tout comme *Streptococcus entericus* et *Streptococcus pluranimalium* n'ont pu être intégrés à aucun des groupes.

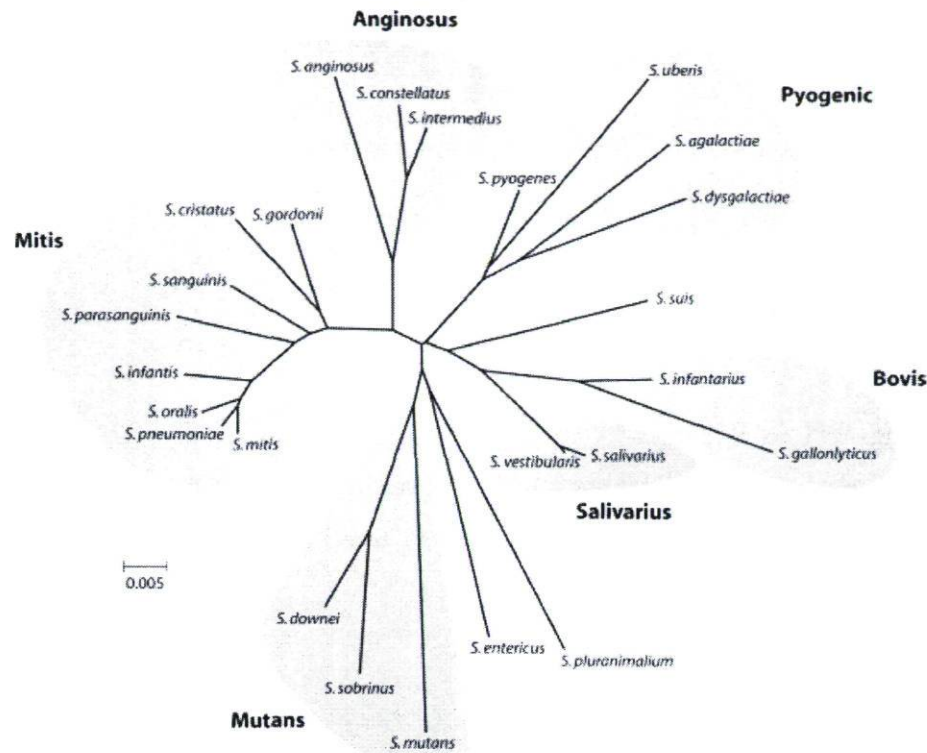


Figure 1-1: Arbre phylogénétique représentatif du genre *Streptococcus* basé sur des comparaisons d'ARNr 16S (d'après Nobbs *et al.* 2009).

1.2.2 Caractères bactériologiques de *S. suis*

S. suis est un coque à Gram-positif, d'un diamètre inférieur à 2 μm , fréquemment observé sous une forme isolée, en paire ou en courtes chaînes (Wertheim, *et al.*, 2009). Ces bactéries, généralement capsulées, sont anaérobies facultatives et catalase négative. La croissance de *S. suis* est inhibée en présence d'une concentration de 6.5% de chlorure de sodium. Un résultat négatif au test de Voges-Proskauer et la production d'acide dans des bouillons contenant du tréhalose ou de la salicine sont caractéristiques de *S. suis* (Higgins & Gottschalk, 1990). Les souches isolées chez le porc sont souvent α -hémolytiques, c'est-à-dire capables de lyser les globules rouges, indicateur de leur pouvoir pathogène (De Moor, 1963).

S. suis est un organisme capable de survivre dans les fèces pendant 104 jours à 0°C, 10 jours à 9°C et jusqu'à 8 jours à une température comprise entre 22 et 25°C (Clifton-Hadley & Enright, 1984). *S. suis* peut également survivre 54 jours dans la poussière à 0°C, 25 jours à 9°C, mais moins de 24 h à 22-25°C (Clifton-Hadley & Enright, 1984). Le microorganisme survit à 4°C dans un milieu nutritif pendant neuf mois au maximum, mais seulement une à deux semaines dans de l'eau distillée. À 50°C, *S. suis* survit pour un maximum de deux heures, mais à 60°C seulement dix minutes (Clifton-Hadley & Enright, 1984). *S. suis* est rapidement inactivé par les désinfectants et les nettoyants couramment utilisés dans les fermes et dans les laboratoires, même à des concentrations inférieures à celles recommandées par les fabricants (Clifton-Hadley & Enright, 1984).

1.2.3 Épidémiologie des infections à *S. suis*

Les porcs, principaux hôtes de *S. suis*, sont fréquemment porteurs d'au moins un représentant d'un des sérotypes de *S. suis* au niveau de leurs amygdales (Higgins & Gottschalk, 2000). Ce microorganisme est habituellement introduit dans un élevage par l'arrivée de porteurs sains. Ainsi, plusieurs animaux peuvent être porteurs de la bactérie au niveau des voies respiratoires supérieures (cavité nasale et amygdales), sans présenter de signes cliniques évidents. Par exemple, il a déjà été rapporté que 21.2% des membres d'un troupeau montrent la présence de *S. suis* sans signe clinique et que 4.7% des animaux porteurs de *S. suis* de sérotype 2 développent une infection (Luque, *et al.*, 2009). Tous les sérotypes ne sont pas responsables de pathologies graves (méningite, septicémie) et le pouvoir pathogène peut varier au sein d'un même sérotype. Le sérotype 2 est le plus fréquemment isolé et associé à une pathologie (Higgins & Gottschalk, 1999, Lun, *et al.*, 2007). Toutefois, les sérotypes 5 et 7 ont été également souvent associés à l'origine de plusieurs cas d'infections (Cloutier, *et al.*, 2003, Tian, *et al.*, 2004, Costa, *et al.*, 2005, Ye, *et al.*, 2008, Zhang, *et al.*, 2008, Gottschalk, *et al.*, 2010). Plusieurs auteurs ont également rapporté que les sérotypes 1, 9, 14 et 16 peuvent être responsables de cas d'infections graves (Nghia, *et al.*, 2008, Wertheim, *et al.*, 2009, Gottschalk, *et al.*, 2010).

Les porcs porteurs asymptomatiques de *S. suis* peuvent développer la maladie dans certaines circonstances (conditions d'élevage défavorables, déplacement des animaux, stress, environnement inadapté...) et contaminer leurs congénères (Gottschalk, *et al.*, 2001). Ces animaux porteurs asymptomatiques qui jouent un rôle critique dans la transmission de la bactérie doivent donc être identifiés et sont repérés grâce à de nouvelles technologies dérivées de la biologie moléculaire (Berthelot-Herault, *et al.*, 2002, Luque, *et al.*, 2009). Les animaux sont colonisés très tôt au cours de leur vie (Johannson, 2006). Néanmoins, dans le cas de *S. suis* sérotype 2, il semble que la fréquence de colonisation soit plus faible et que la contamination soit généralement plus tardive, mais possible tout au long de la vie des porcs (Staats, *et al.*, 1997, Higgins & Gottschalk, 1999). L'expression de la maladie ne se traduit qu'après la disparition de l'immunité d'origine maternelle, sous forme d'une infection systémique (Staats, *et al.*, 1997). *S. suis* peut également être transmis de la truie au porcelet lors de la mise bas, au contact et/ou en avalant les sécrétions vaginales de la truie (Amass, *et al.*, 1997).

En plus des porcs, d'autres animaux comme le cheval (Devriese, *et al.*, 1990), le rat, le chevreuil et d'autres ruminants peuvent également être infectés par *S. suis* et présenter lors de l'infection les mêmes signes cliniques que les porcs (Williams, *et al.*, 1988, Gottschalk, *et al.*, 2010). Muckle et coll. ont récemment rapporté un cas d'infection à *S. suis* chez le chien (Muckle, *et al.*, 2010). La recrudescence de nouveaux hôtes-porteurs pour *S. suis* est inquiétante, puisqu'elle augmente le risque d'infection et de transmission à l'homme.

1.2.4 *S. suis* comme agent de zoonose

Le premier cas d'infection humaine à *S. suis* a été décrit au Danemark en 1968 (Lun, *et al.*, 2007). L'infection est depuis fréquemment rapportée à travers le monde: Amérique du Nord (États-Unis, Canada), Amérique du Sud (Brésil), Europe (France, Pays-Bas, Royaume-Uni, Danemark, Norvège, Espagne, Italie et Allemagne), Asie (Chine, Thaïlande, Vietnam et Japon), Australie et Nouvelle-Zélande (Staats, *et al.*, 1997,

Wertheim, *et al.*, 2009). À ce jour, plus de 700 cas d'infections à *S. suis* ont été décrits, dont les trois quarts environ en Asie du Sud-Est. La comparaison entre les cas recensés en Europe et en Asie montre un taux de mortalité beaucoup plus élevée en Asie, particulièrement due à l'épidémie survenue à l'été 2005 en Chine (Wangkaew, *et al.*, 2006, Willenburg, *et al.*, 2006, Yu, *et al.*, 2006, Gottschalk, *et al.*, 2007, Mai, *et al.*, 2008, Wertheim, *et al.*, 2009, Gottschalk, *et al.*, 2010). Plusieurs hypothèses ont été mises de l'avant pour expliquer cette épidémie en Chine: présence de souches plus virulentes, diagnostic tardif, mauvais traitements thérapeutiques et une proximité entre l'humain et les animaux (Bahloul, *et al.*, 2008, Gottschalk, *et al.*, 2010).

S. suis est un agent infectieux responsable de zoonoses relativement rares, mais souvent graves (Euzéby, 1999, Higgins & Gottschalk, 1999). Une recrudescence importante des cas d'infection chez l'humain au cours de la dernière décennie a été observée (Gottschalk, *et al.*, 2007, Lun, *et al.*, 2007). La grande majorité de ces cas d'infections peut être attribuée à l'exposition professionnelle aux porcs (Lutticken, *et al.*, 1986, Dupas, *et al.*, 1992, Tarradas, *et al.*, 2001, Strangmann, *et al.*, 2002). Le sérotype 2 est responsable de la majorité des infections à *S. suis* chez l'humain. Toutefois, les sérotypes 1, 4, 14 et 16 sont également associés à l'infection humaine (Durand, *et al.*, 2001). Les signes cliniques chez l'homme sont similaires à ceux observés chez le porc, ainsi cette bactérie a déjà été associée à des cas de méningites, d'endocardites et de septicémies (Arends & Zanen, 1988, Higgins & Gottschalk, 1999).

Il semble que la contamination interhumaine soit seulement possible lors d'un contact sanguin (Bahloul, *et al.*, 2008). Cependant, la rareté de l'infection chez l'humain porte à croire que sa survenue nécessiterait l'implication d'autres facteurs. L'immunodépression, le diabète, l'alcoolisme, l'asplénie et les cancers constituent ainsi des facteurs de risque pour ces infections (Bahloul, *et al.*, 2008). Une atteinte valvulaire rhumatismale ou dégénérative exposerait à l'endocardite infectieuse. De plus, il semblerait que l'infection ne conduit pas au développement d'une immunité protectrice; un patient a ainsi été infecté deux fois à 15 ans d'intervalle (Bahloul, *et al.*, 2008).

1.2.5 Traitements des infections à *S. suis*

Le sevrage précoce est souvent un moyen efficace d'élimination de plusieurs pathogènes porcins. Cette procédure est cependant inefficace pour le contrôle des infections à *S. suis*, puisque de nombreux porcelets âgés de seulement quelques jours sont déjà porteurs de la bactérie (MacInnes & Desrosiers, 1999). L'utilisation d'antibiotiques présente une efficacité variable due en partie à l'augmentation de la résistance de *S. suis* à ces molécules. Les antibiotiques les plus couramment utilisés sont la pénicilline, l'ampicilline, le ceftriaxone, la vancomycine et la tiamuline (Staats, *et al.*, 1997, Gottschalk, *et al.*, 2007, Zhang, *et al.*, 2008, Wertheim, *et al.*, 2009). *S. suis* a été la première bactérie Gram-positive pour laquelle un gène de résistance *tet(B)* à la tétracycline a été identifié (Chander, *et al.*, 2010).

Le contrôle de la maladie se fait également par vaccination à l'aide de bactéries mortes (Holt, *et al.*, 1990). L'immunisation passive des porcs avec des antisérums porcins semble protéger les porcs contre l'infection (Holt, *et al.*, 1988), ce qui démontre que l'immunité humorale est importante pour la protection contre ce pathogène (Zhang, *et al.*, 2008). Les résultats étant très controversés, il n'existe pas de vaccin entièrement efficace contre *S. suis* chez le porc (Pallares, *et al.*, 2004, Higgins R & Gottschalk, 2005). L'absence de vaccin s'explique par une efficacité dépendante de la souche et du sérotype. Plus récemment, l'intérêt dans la vaccination s'est déplacé vers les antigènes protéiques de *S. suis* comme cible thérapeutique potentielle. Les vaccins sous-unitaires (formés d'une ou plusieurs protéines purifiées) composés de suilysine (Jacobs, *et al.*, 1996, Smith, *et al.*, 1997) ou de MRP (Protéine relâchée par la muramidase) et EF (extracellular factor) ont induit une protection chez la souris et/ou le porc (Wisselink, *et al.*, 2001). Cependant, leur application est restreinte par le nombre important de souches de *S. suis* virulentes qui n'expriment pas ces protéines. Ainsi, il est nécessaire d'identifier d'autres facteurs antigéniques ce qui contribuera à l'élaboration de vaccins mono- ou polyvalents qui pourront ainsi protéger un plus grand nombre de porcs contre l'infection. Dans ce but, Okwumabua et Chinnapakkagari ont identifié une protéine de 38 kDa qui permet d'assurer une

protection des porcs contre l'infection à *S. suis* de sérotype 2 (Okwumabua & Chinnapakkagari, 2005). Li et coll. ont également identifié une protéine de surface (Sao), conservée chez plusieurs sérotypes de *S. suis*, comme candidat pour un vaccin potentiel (Li, *et al.*, 2006, Li, *et al.*, 2007). Pour de nombreuses bactéries, les protéines associées à la paroi sont des cibles thérapeutiques intéressantes dans la conception d'un vaccin. Kock et coll. ont proposé d'utiliser le nouveau facteur opacifiant le sérum (OFS) comme cible potentielle pour la création d'un vaccin permettant une protection contre *S. suis* sérotype 2 et 9 (Kock, *et al.*, 2009). Li et coll. ont suggéré aussi l'utilisation de la protéine HP0245, laquelle est induite *in vivo* et localisée à la surface de *S. suis* sérotype 2 (Li, *et al.*, 2010). À leur tour, Tan et coll. ont proposé l'utilisation de la 6-phosphogluconate déshydrogénase (6PDH), une enzyme impliquée dans le cycle des pentoses phosphate (Tan, *et al.*, 2008). Présente à la surface de *S. suis*, elle serait une protéine intéressante dans la fabrication d'un vaccin (Tan, *et al.*, 2009). Mandacini et coll. ont suggéré l'utilisation de la protéine Sat associée à la paroi de *S. suis* de sérotype 2 (Mandanici, *et al.*, 2010). Chez des souris immunisées avec la protéine Sat recombinante, une augmentation du taux de survie de 80% et une diminution de la charge bactérienne ont été observées (Mandanici, *et al.*, 2010). Ceci suggère que Sat est une protéine prometteuse en vue du développement d'un futur vaccin contre les infections à *S. suis* de sérotype 2 (Mandanici, *et al.*, 2010). Bethe et coll. ont proposé la pseudo-subtilisine de *Streptococcus pneumoniae* comme candidat potentiel pour un futur vaccin contre ce microorganisme (Bethe, *et al.*, 2001).

1.2.6 Facteurs de virulence de *S. suis*

La pathogenèse de l'infection causée par *S. suis* est encore mal connue. La virulence de *S. suis* est dépendante du sérotype et des souches. Tous les sérotypes ne sont pas responsables d'infections et, pour un même sérotype, toutes les souches ne sont pas responsables du même type de maladie (virulence extrêmement variable). La participation de plusieurs composantes bactériennes dans la virulence de *S. suis* a été proposée. Cependant, la

majorité de ces facteurs ne sont pas absolument essentiels à la virulence où alors sont présents à la fois chez les souches virulentes et non virulentes.

1.2.6.1 Capsule polysaccharidique

La présence d'une capsule, riche en acide sialique, est classiquement considérée comme un facteur de virulence chez *S. suis* (Charland, *et al.*, 1998, Smith, *et al.*, 1999). Plus en détail, cette capsule est composée de cinq sucres différents: le rhamnose, le galactose (Gal), le glucose, le N-acétyl glucosamine (GlcNAc, qui permettra la fabrication d'acide hyaluronique (Allen, *et al.*, 2004)) et l'acide sialique (Elliott & Tai, 1978). La capsule de *S. suis* partage la séquence Neu5Ac-Gal-GlcNAc-Gal en commun avec les streptocoques du groupe B de type Ia, Ib, II, III et IV, mais diffère de ceux-ci par la présence de rhamnose et le fait que l'acide sialique soit lié en 2,6 plutôt qu'en 2,3 au Gal suivant (Van Calsteren, *et al.*, 2010).

Le rôle de la capsule dans la pathogénie de *S. suis* n'est toujours pas clair, car des souches capsulées peuvent être non virulentes (Gottschalk & Segura, 2000). Ceci suggère que d'autres facteurs sont essentiels à la virulence de cette bactérie (Gottschalk & Segura, 2000). Toutefois, quelques études ont appuyé le rôle de la capsule dans le pouvoir pathogène de *S. suis* (Segura, *et al.*, 2004). La présence d'une capsule s'opposerait à l'activation du système du complément par la voie alterne et à la phagocytose (Chabot-Roy, *et al.*, 2006). En effet, les souches fortement capsulées de *S. suis* sont plus difficilement phagocytées que les souches faiblement capsulées ou non capsulées (Charland, *et al.*, 1998, Smith, *et al.*, 1999, Chabot-Roy, *et al.*, 2006). La présence de la capsule augmente la résistance à la lyse par les cellules phagocytaires et pourrait donc aider la bactérie à survivre au niveau de la circulation sanguine (Smith, *et al.*, 1999, Chabot-Roy, *et al.*, 2006). Wilson et coll. ont démontré en utilisant un système de mutagenèse par étiquette signature (STM) que des gènes impliqués dans la biosynthèse de

la capsule faisaient partie du groupe de gènes impliqués dans la virulence de *S. suis* (Wilson, *et al.*, 2007).

Récemment, Tanabe et coll. ont utilisé un mutant non capsulé (BD101) de *S. suis* afin d'étudier les effets pléiotropiques résultant de la perte de la capsule (Tanabe, *et al.*, 2009). Ce mutant BD101 a été construit par insertion d'un transposon par Fittipaldi et coll. (Fittipaldi, *et al.*, 2007). La suppression de l'opéron Aro dans ce mutant empêche l'expression des gènes *aroA*, *aroK*, *pheA* et *orf10* et ainsi le mutant BD101 est un mutant dépourvu d'acide sialique, et par conséquent de sa capsule (Fittipaldi, *et al.*, 2007). Le mutant BD101 présente une augmentation significative de l'hydrophobicité de surface. Comparativement à la souche parentale, le mutant non-capsulé induit une réponse inflammatoire plus importante en présence de macrophages, résultant en une augmentation de la sécrétion de TNF- α , d'IL-1 β , d'IL-6 et de CXCL8. La capsule semble donc interférer avec certaines composantes de la paroi cellulaire capables de stimuler les cellules du système immunitaire (Tanabe, *et al.*, 2009) (CHAPITRE 2).

De plus, la présence ou l'absence d'une capsule chez *S. suis* a pu être reliée à sa capacité à former un biofilm. Cette structure sous forme de biofilm a été suggérée comme favorisant la virulence des souches de *S. suis* (Wang, *et al.*, 2010). Cet aspect sera développé plus en détail dans la section 1.3 (le biofilm de *S. suis*) et au cours du chapitre 2 de cette thèse.

1.2.6.2 Protéines MRP et EF

D'autres facteurs semblent intervenir dans le caractère de virulence lié à *S. suis*. Ainsi, la virulence a déjà été associée à deux protéines (Vecht, *et al.*, 1991). La première a un poids moléculaire de 136 kDa (MRP = Protéine relâchée par la muramidase) et est associée au peptidoglycane. Certaines données ont suggéré que cette MRP serait une adhésine de *S. suis* (Vecht, *et al.*, 1991, Fittipaldi, *et al.*, 2009). La deuxième protéine de 110 kDa (EF = Facteur extracellulaire) est sécrétée dans le surnageant de culture de la bactérie et semble

jouer plusieurs rôles au cours de l'infection (Vecht, *et al.*, 1991, Fittipaldi, *et al.*, 2009). Ces deux protéines sont à l'origine de quatre phénotypes caractéristiques de *S. suis*: MRP⁺ EF⁺, MRP⁺ EF⁻, MRP⁻ EF⁺ et MRP⁻ EF⁻ (Staats, *et al.*, 1997). D'autres phénotypes ont également été identifiés car certaines souches synthétisent des protéines apparentées, mais différentes des protéines MRP ou EF. Le rôle des protéines MRP et EF dans la virulence avait été suggéré sur la base que les souches virulentes de *S. suis* sérotype 2 semblaient être MRP⁺ et EF⁺ alors que les souches non virulentes semblaient être MRP⁻ et EF⁻ (Staats, *et al.*, 1997).

La présence des protéines MRP et EF a été démontrée chez des souches de sérotype 1, 2, 1/2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 14, 15, 16 et 22 (Berthelot-Herault, *et al.*, 2000, Wisselink, *et al.*, 2000). L'absence d'une ou des deux protéines n'est pas nécessairement associée à une absence ou à une diminution de la virulence des souches. En effet, de nombreuses souches de *S. suis* (européennes, nord-américaines) dépourvues des protéines MRP et EF sont virulentes (Galina, *et al.*, 1996, Gottschalk, *et al.*, 1998, Berthelot-Herault, *et al.*, 2000, Fittipaldi, *et al.*, 2009, Kim, *et al.*, 2010). Cependant, ces deux protéines ne représentent pas des facteurs indispensables pour la virulence de *S. suis*.

1.2.6.3 Suilysine

S. suis produit une hémolysine (appelée "suilysine"), initialement mise en évidence par Jacobs et coll., qui appartient au groupe des hémolysines activées par les groupements thiols et qui montre un poids moléculaire de 54 - 65 kDa (Jacobs, *et al.*, 1994, Gottschalk, *et al.*, 1995). Cette protéine appartient à la famille des cytolysines cholestérol-dépendantes (CDC) (Jacobs, *et al.*, 1994, Xu, *et al.*, 2010). La suilysine forme des pores transmembranaires à la surface des cellules cibles; plusieurs molécules de suilysine étant nécessaires à la formation d'un seul de ces pores (Jacobs, *et al.*, 1994). Cette hémolysine permettrait aux bactéries de quitter les phagolysosomes des macrophages et de gagner le cytoplasme au sein duquel elles échapperaient aux processus bactéricides (Segura &

Gottschalk, 2002). De fait, des souris et des porcs immunisés avec cette toxine sont résistants à une infection expérimentale par *S. suis* sérotype 2 (Gottschalk, *et al.*, 1995). L'hémolysine serait également impliquée dans l'interaction entre *S. suis* et les cellules hôtes (Gottschalk & Segura, 2000, Segura & Gottschalk, 2002, Vanier, *et al.*, 2004). Vanier et coll. ont également démontré que l'hémolysine de *S. suis* était en grande partie responsable de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les cellules endothéliales (Vanier, *et al.*, 2009). De plus, Lalonde et coll. ont démontré que la suilysine était cytotoxique envers les cellules épithéliales (Lalonde, *et al.*, 2000). Ainsi, la suilysine pourrait largement contribuer à la pathogenèse de la méningite induite par *S. suis*. La synthèse de la suilysine n'est cependant pas obligatoire à la virulence puisque cette protéine n'est pas retrouvée chez la plupart des souches isolées en Amérique du Nord, y compris celles isolées d'animaux malades (Fittipaldi, *et al.*, 2009). Toutefois, il a été démontré que le gène *ssp*, codant pour la suilysine, faisait partie des quatre-vingts gènes dont l'expression est augmentée au cours d'une infection à *S. suis* (Li, *et al.*, 2010).

1.2.6.4 Adhésines

Plusieurs adhésines ont été proposées comme des facteurs de virulence potentiels chez *S. suis*. Les protéines antigéniques AgI/II représentent les premières adhésines ancrées dans la paroi qui ont été étudiées chez les bactéries à Gram positifs. Elles servent entre autres à l'attachement de *Streptococcus mutans* à la surface des dents. Ces polypeptides AgI/II reconnaissent les glycoprotéines salivaires et sont également impliqués dans la formation de biofilm, l'agrégation plaquettaire, l'invasion tissulaire et la modulation de la réponse immunitaire (Brady, *et al.*, 2010). Les streptocoques de la cavité buccale humaine de même que *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* et *S. suis* expriment les gènes codant les protéines antigéniques AgI/II (Brady, *et al.*, 2010).

Une adhésine importante chez *S. suis* est une protéine de liaison à la fibronectine et au fibrinogène, la FBPS (fibronectin-fibrinogen binding protein), initialement mise en

évidence par De Greeff et coll. (De Greeff, *et al.*, 2002). De par ses propriétés d'adhésion, cette protéine de 64 kDa semble jouer un rôle dans la colonisation des organes lors des infections à *S. suis* (De Greeff, *et al.*, 2002).

Jobin et coll. ont démontré la capacité de *S. suis* à lier à sa surface le plasminogène humain et porcin, qui peut être subséquentment activé en plasmine par des activateurs endogènes telle l'urokinase (Jobin, *et al.*, 2004). Cette liaison permet à *S. suis* de se camoufler des molécules et des cellules de reconnaissance de l'hôte et peut aussi augmenter sa capacité d'invasion (Jobin, *et al.*, 2005). En effet, l'acquisition d'une activité plasmine à la surface des bactéries permet à celles-ci d'augmenter leur capacité de détruire l'intégrité tissulaire et d'envahir plus profondément les tissus (Huang, *et al.*, 2000, Lahteenmaki, *et al.*, 2001).

S. suis possède également à sa surface une glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) de 39 kDa capable de lier diverses protéines (Brassard, *et al.*, 2004). Elle présente des homologies de séquence avec une protéine de *S. pyogenes* capable de fixer la fibronectine, l'actine et la myosine (Gottschalk & Segura, 2000). Quessy et coll. ont démontré que cette protéine de *S. suis*, permettait la fixation de l'albumine et que cette interaction avec l'albumine pourrait jouer un rôle dans la pathogenèse (Quessy, *et al.*, 1997). En 2004, Jobin et coll. ont rapporté que la GAPDH de *S. suis* était en partie responsable de la liaison du plasminogène humain et porcin (Jobin, *et al.*, 2004). La liaison du plasminogène et son activation en plasmine pourraient être impliquées dans l'invasion et la destruction des tissus par *S. suis* en contribuant notamment à la dégradation de la fibronectine (Jobin, *et al.*, 2004). De plus, Wang et coll. ont démontré que la GAPDH favorise l'adhésion de *S. suis* aux cellules épithéliales (Wang & Lu, 2007). La GAPDH n'apparaît pas être un facteur essentiel à la virulence de *S. suis* puisque la protéine a déjà été retrouvée chez des souches non-virulentes de *S. suis* (Quessy, *et al.*, 1997).

1.2.6.5 α -énolase

Sehir et coll. ont mis en évidence une protéine de 52 kDa qui possède une capacité de liaison à la portion Fc des IgG d'un large spectre d'espèces de mammifères (humain, porcin, bovin, murin) et des IgA d'origine humaine (Serhir, *et al.*, 1995). La protéine peut également lier la fibronectine (Serhir, *et al.*, 1995). Le rôle exact de cette protéine dans la virulence de *S. suis* est inconnu, quoiqu'elle puisse contribuer à l'établissement de l'infection (Serhir, *et al.*, 1995). Cette protéine anciennement connue sous le nom de Hsp 60 (Benkirane, *et al.*, 1998) a été renommée α -énolase (SsEno) par Esgleas et coll. (Esgleas, *et al.*, 2008). Ces auteurs ont démontré que l' α -énolase de *S. suis* montrait également une affinité pour le plasminogène (Esgleas, *et al.*, 2008). L'énolase est impliquée dans la virulence de plusieurs streptocoques en liant le plasminogène de l'hôte infecté, participant ainsi à la migration des bactéries (Pancholi & Fischetti, 1998, Bergmann, *et al.*, 2001, Jones & Holt, 2007). L'énolase a déjà été identifiée comme une protéine immunosuppressive chez *Streptococcus sobrinus* (Veiga-Malta, *et al.*, 2004). De plus, l' α -énolase de *S. suis* a été identifiée comme un antigène important de la paroi de toutes les souches *S. suis* de sérotype 2 testées (Jing, *et al.*, 2008, Zhang, *et al.*, 2009).

1.2.6.6 Protéases

Chez plusieurs agents pathogènes, les activités protéolytiques jouent un rôle important dans l'acquisition de nutriments, la perturbation des mécanismes de défense de l'hôte et la destruction tissulaire (Jobin & Grenier, 2003). Cinq activités protéolytiques majeures ont été identifiées chez *S. suis*: Arg-aminopeptidase, pseudo-chymotrypsine (maintenant connue comme pseudo-subtilisine), caséinase, dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) et IgA1 protéase (Jobin & Grenier, 2003, Jobin, *et al.*, 2005, Zhang, *et al.*, 2010). Cette partie sera développée plus en détail dans la section 1.4 (les protéases de *S. suis*).

1.2.6.7 Facteur opacifiant le sérum

Baums et coll. ont identifié le facteur opacifiant le sérum (OFS) de *S. suis* sérotype 2 comme un facteur impliqué dans la virulence de cette bactérie (Baums, *et al.*, 2006). L'OFS (>100 kDa) de *S. suis* partage des homologies de structure avec des membres de la famille des composants de la surface microbienne reconnaissant les molécules de la matrice extracellulaire (MSCRAMM) (Baums, *et al.*, 2006). Bien qu'il puisse jouer un rôle dans la pathogénèse de *S. suis*, l'OFS ne serait cependant pas impliqué dans la colonisation des voies respiratoires par cette bactérie (Baums, *et al.*, 2006). Toutefois, Takamatsu et coll. ont nuancé les propos de Baums et coll. en indiquant que seulement 30% des souches de *S. suis* posséderaient un OFS fonctionnel pouvant jouer un rôle dans la virulence de *S. suis* (Takamatsu, *et al.*, 2008).

1.2.6.8 Désoxyribonucléase SsnA

Fontaine et coll. ont mis en évidence une désoxyribonucléase (SsnA) associée à la paroi comme un facteur contribuant à la virulence de *S. suis* sérotype 1 à 9 (Fontaine, *et al.*, 2004). La nucléase SsnA est constituée de 35 AA comportant une séquence signal de 22 AA et un motif de liaison à l'ADN. La SsnA nécessite un apport en Ca^{2+} et Mg^{2+} pour son activité. Sa spécificité de substrat a été démontrée pour l'ADN linéaire simple et double brin. Les expériences de Fontaine et coll. par PCR en transcription inverse ont démontré que l'expression de la SsnA avait lieu durant toutes les étapes de la croissance de *S. suis* (Fontaine, *et al.*, 2004). Cette DNase est similaire à celle identifiée chez *S. pyogenes* par Hasegawa et coll. (Hasegawa, *et al.*, 2009).

1.2.6.9 Sortases

Les sortases sont des transpeptidases liées de manière covalente du côté C-terminal à la paroi de bactéries. *S. suis* sérotype 2 compte cinq à six gènes (*srtA-F*) codant pour des sortases (Osaki, *et al.*, 2002). La sortase A (StrA), initialement identifiée comme une transpeptidase chez *Staphylococcus aureus*, joue un rôle clé dans la virulence des bactéries pathogènes (Wang, *et al.*, 2009). Le gène *strA* a été détecté chez 28 sérotypes de *S. suis*, indiquant que le gène est présent dans la plupart sinon toutes les souches de *S. suis* (Baums & Valentin-Weigand, 2009). La *strA* a été reconnue pour son rôle important dans l'ancrage des protéines portant un motif LPXTG à la paroi cellulaire (Osaki, *et al.*, 2002). Un mutant *srtA* de *S. suis* sérotype 2 a démontré une adhésion et une capacité d'invasion des cellules hôtes porcines significativement atténuées, démontrant le rôle de la sortase A dans cette interaction (Vanier, *et al.*, 2008, Wang, *et al.*, 2009). De la même manière, la liaison à la fibronectine et au collagène de type I s'est avérée diminuée chez le mutant *srtA*. Toutefois, la contribution de la *srtA* à la virulence de *S. suis* n'a pu être clairement établie lors d'infections chez les souris CD1 utilisant le mutant et la souche sauvage de *S. suis* (Vanier, *et al.*, 2008, Vanier, *et al.*, 2009). La contribution des sortases dans la pathogenèse de *S. suis* est encore mal connue (Baums & Valentin-Weigand, 2009).

1.2.6.10 AdcR et Fur

Chez les streptocoques, les régulateurs d'absorption de cations AdcR et Fur contrôlent le transport du zinc et du fer, qui sont des éléments essentiels pour la fonction de nombreuses protéines. Aranda et coll. ont mis en évidence le rôle de ces régulateurs dans la virulence de *S. suis*, en infectant des souris avec des mutants montrant une inactivation des gènes AdcR et Fur (Aranda, *et al.*, 2010). Une diminution de la virulence de *S. suis* a été observée avec les mutants en comparaison avec la souche parentale (Aranda, *et al.*, 2010).

1.2.6.11 *Trag*

Lors d'une infection, les gènes non essentiels aux microorganismes pathogènes sont généralement régulés à la baisse, tandis que les gènes importants pour la survie du microorganisme tels les gènes de virulence, sont régulés à la hausse (Zhang, *et al.*, 2010). Les gènes impliqués dans les pathologies *in vivo* chez l'hôte sont appelés des gènes induits *in vivo* (ivi). Ils ont un rôle clé dans le processus pathogénique (Heithoff, *et al.*, 1997, Zhang, *et al.*, 2010). Le gène *traG* a été identifié par IVIAT (*in vivo* induced antigen technology) codant pour un nouveau facteur contribuant à l'infection par *S. suis* (Gu, *et al.*, 2009). Il semble être impliqué au niveau du système de sécrétion de type IV de la bactérie. Présent chez la majorité des souches de *S. suis* sérotype 2, en particulier chez celles isolées de porcs malades, le gène est absent chez la souche avirulente *S. suis* T15 (Zhang, *et al.*, 2010). Son rôle dans la virulence a été établi lors d'infections de poissons-zèbres avec des souches de *S. suis* sérotype 2 sauvages et des mutants présentant une délétion du gène *trag*. Les résultats ont révélé une diminution de la virulence des mutants comparativement aux souches sauvages (Zhang, *et al.*, 2010).

1.2.6.12 *CiaRH*

Les systèmes de régulation à deux composantes *CiaRH* sont largement distribués parmi les bactéries et leur permettent d'effectuer des changements coordonnés dans l'expression des gènes en réponse à une variété de stimuli environnementaux. Li et coll. ont construit des mutants de *S. suis* sérotype 2 sans système de régulation à deux composantes *CiaRH* afin d'évaluer sa contribution dans la virulence de la bactérie (Li, *et al.*, 2010). Par rapport à la souche sauvage, le mutant a montré une diminution significative de sa capacité d'adhérence aux cellules épithéliales, une plus grande sensibilité à l'activité bactéricide des macrophages et une réduction du taux de mortalité de souris CD1 et de porcs, suggérant ainsi que la *CiaRH* est nécessaire pour la virulence de *S. suis* sérotype 2 (Li, *et al.*, 2010).

1.2.6.13 Hyaluronate lyase

Allen et coll. ont mis en évidence chez *S. suis* une hyaluronate lyase laquelle catalyse la dégradation de l'acide hyaluronique (Allen, *et al.*, 2004). Présente chez plusieurs espèces de streptocoques, la hyaluronate lyase n'est pas retrouvée chez la grande majorité des isolats de *S. suis*, indiquant que cette protéine n'est probablement pas essentielle à la virulence bien qu'elle soit associée à tous les isolats responsables de pneumonie (King, *et al.*, 2004).

1.2.6.14 Inosine 5-monophosphate déshydrogénase

Zhang et coll. ont mis en évidence le rôle de l'inosine 5-monophosphate déshydrogénase (IMPDH) chez *S. suis*. Cet enzyme catalyserait la conversion de l'inosine monophosphate en xanthosine monophosphate avec réduction du NAD en NADH. L'IMPDH est l'une des enzymes nécessaires à la synthèse de multiples purines et est associée à la synthèse de l'acide hyaluronique de la capsule nécessaire pour la survie de ce pathogène. Dans un modèle murin, la virulence de mutants déficients pour l'expression de l'IMPDH s'est avérée atténuée par rapport à la souche parentale (Zhang, *et al.*, 2009).

1.2.6.15 VirA

Li et coll. ont mis en évidence un nouveau gène, *virA*, également appelé *lin0523* (Wilson, *et al.*, 2007) qui semble être associé à la virulence de *S. suis* (Li, *et al.*, 2010). L'exacte fonction du gène *virA* reste encore incertaine (Li, *et al.*, 2010). Toutefois, tous les lapins infectés par des souches de *S. suis* présentant le gène *virA* ont démontré une perte de poids et développé des symptômes cliniques. À l'inverse, les lapins inoculés avec des mutants ne présentant pas le gène *virA* n'ont développé aucun symptôme clinique. VirA semble donc jouer un rôle dans la pathogénicité de *S. suis* sérotype 2 (Li, *et al.*, 2010).

1.2.6.16 Îlot de pathogénicité

Le concept d'îlot de pathogénicité (IPA) a été introduit pour expliquer le caractère pathogène de certaines bactéries. Cette notion correspond à la découverte de régions chromosomiques ayant des caractères particuliers associés à la pathogénicité des souches (Occhialini & Megraud, 2002). Les IPA jouent un rôle dans l'adaptation rapide et l'augmentation de la virulence des pathogènes (Li, *et al.*, 2011). 89K est un nouvel IPA identifié chez *S. suis* et qui s'avère spécifique aux souches isolées des deux épidémies humaines qui ont eu lieu en Chine en 1998 et 2005 (Tang, *et al.*, 2006, Chen, *et al.*, 2007). Li et coll. ont montré qu'un système à deux composants (SalK/SalR) codé par des gènes présent sur 89K est indispensable à la virulence des souches de *S. suis* hautement invasives provenant de la Chine (Li, *et al.*, 2008) renforçant l'idée que 89K est un IPA (Li, *et al.*, 2008, Li, *et al.*, 2011). Il a été rapporté que 89K pouvait s'exciser spontanément pour former un produit extracellulaire circulaire; son transfert a lieu par conjugaison via un système de sécrétion de type IV. C'est la première démonstration d'un transfert horizontal d'un IPA d'une bactérie à Gram-positif relié à un système de sécrétion de type IV. Ceci laisse supposer que ces événements génétiques jouent un rôle important dans l'émergence, la pathogénèse et la persistance des épidémies à *S. suis* (Li, *et al.*, 2011).

1.2.6.17 Phospholipase C

La libération d'acide arachidonique est le principal précurseur des prostaglandines (PGI₂, PGD₂, PGE₂, PGJ₂, PGF₂). Ces lipides favorisent la perméabilité de la barrière hémato-méningée (BBB) et la production d'oxyde nitrique par les cellules endothéliales microvasculaires de cerveaux humains (HBMEC) (Jobin, *et al.*, 2005), contribuant ainsi à la destruction des tissus et la migration cellulaire (Harris, *et al.*, 2002). Jobin et coll. ont mis en évidence la présence d'une phospholipase C chez *S. suis*. La phospholipase C hydrolyse la phosphatidylcholine en choline phosphate et en diacyl-glycérol, un messenger qui active la protéine kinase C, une importante enzyme dans la production de l'acide arachidonique

(Jobin, *et al.*, 2005). Le largage d'acide arachidonique associé à la membrane des HBMEC suite à une stimulation par *S. suis* semble impliquer également la suylisine (Jobin, *et al.*, 2005).

1.2.6.18 D-alanylation des acides lipotéichoïques

Chez *S. suis*, la D-alanylation par l'opéron *dlt* des acides lipotéichoïques est un phénomène qui participe à la virulence de la bactérie (Fittipaldi, *et al.*, 2008). L'absence de D-alanylation des acides lipotéichoïques chez un mutant de *S. suis* a démontré une augmentation de la susceptibilité aux peptides antimicrobiens et aux activités bactéricides des neutrophiles, de même qu'une diminution de la capacité d'adhésion aux cellules endothéliales (Fittipaldi, *et al.*, 2008).

1.2.6.19 Régulateur de transcription Rgg

Les régulateurs Rgg sont des facteurs de transcription présents chez de nombreuses bactéries à Gram positifs. Ils jouent de multiples rôles, notamment dans le contrôle de la virulence des pathogènes. L'inactivation du gène *rgg* chez *S. suis* 05ZYH33 sérotype 2 a significativement atténuée la virulence de la souche dans un modèle d'infection *in vivo* de porcelets (Zheng, *et al.*, 2010). Zheng et coll. ont démontré que la suppression de Rgg réduisait l'utilisation de glucides tels que le lactose et le maltose, et entraînait des modifications du taux de croissance des bactéries. Ces données suggèrent que Rgg est un régulateur de transcription qui joue un rôle important dans la survie des bactéries au cours des interactions hôtes pathogènes (Zheng, *et al.*, 2010).

1.2.6.20 Pili

Les pili semblent contribuer à la virulence de différentes espèces pathogènes à Gram-positifs. Parmi les étapes essentielles de la pathogenèse bactérienne, ces structures participent à l'adhérence aux cellules hôtes, à la colonisation et à la virulence systémique (Fittipaldi, *et al.*, 2010). Des pili ont été découverts chez *S. suis* de sérotypes 1 à 8 et 1/2 (Jacques, *et al.*, 1990). Ce sont des petits pili court qui mesurent jusqu'à 250 nm et qui possèdent un diamètre d'environ 2 nm. Récemment, la présence d'au moins quatre groupes de gènes codant pour des pili ont été démontrés chez *S. suis* (Fittipaldi, *et al.*, 2010). Toutefois, les pili de *S. suis* semblent atypiques par rapport aux pili d'autres bactéries à Gram-positif suggérant que ces structures ne semblent pas jouer un rôle important dans la pathogenèse de ce microorganisme.

1.2.7 Pathogenèse des infections à *S. suis*

Après contamination des voies respiratoires, *S. suis* colonise les amygdales puis gagne les ganglions lymphatiques mandibulaires (Madsen, *et al.*, 2002, Wilson, *et al.*, 2007, Bahloul, *et al.*, 2008). Le germe peut rester localisé et provoquer une infection inapparente ou alors être disséminé dans l'organisme et induire une maladie (Williams & Blakemore, 1990). Certains animaux sont des porteurs sains et ne développeront jamais la maladie, tandis que d'autres, tôt ou tard, développeront une bactériémie, parfois une septicémie, et finalement une méningite. Par conséquent, dans ces cas, les bactéries semblent se disséminer et persister dans toute la circulation sanguine de manière à atteindre le système nerveux central.

Il existe plusieurs théories concernant les voies d'entrées possibles de *S. suis* dans le sang et sa dissémination dans l'organisme (figure 1-2). Pour atteindre la circulation sanguine, *S. suis* doit traverser la muqueuse épithéliale des voies respiratoires supérieures (Norton, *et al.*, 1999, Lalonde, *et al.*, 2000). *S. suis* est capable d'adhérer aux cellules épithéliales

d'origine porcine et humaine (Norton, *et al.*, 1999, Lalonde, *et al.*, 2000, Benga, *et al.*, 2004); cette adhésion semble avoir un lien avec les composantes de la paroi cellulaire puisque l'adhésion est plus importante chez les souches non capsulées (Lalonde, *et al.*, 2000). St. Geme et Cutter, ont suggéré que l'encapsulation des souches d'*Haemophilus influenzae* pouvait être modulée en fonction de la phase infectieuse, phénomène qui pourrait également avoir lieu chez *S. suis* (St Geme & Cutter, 1996). Ainsi, l'expression de la capsule pourrait être régulée à la baisse pendant la colonisation des cellules épithéliales des voies respiratoires et, une fois dans la circulation sanguine, une régulation à la hausse de la capsule pourrait protéger les bactéries du système immunitaire de l'hôte (Gottschalk & Segura, 2000). Cette hypothèse est appuyée par le fait que la capsule produite *in vivo* par *S. suis* est plus appréciable que celle produite *in vitro* (Charland, *et al.*, 1996). Haataja et coll. ont mis en évidence le fait que l'expression de la capsule chez *S. suis* peut influencer l'accessibilité de ligands à certaines adhésines de la bactérie (Haataja, *et al.*, 1996).

Une hypothèse a également été émise proposant qu'une fois adhérent aux cellules épithéliales, *S. suis* sécréterait des facteurs cytotoxiques pour ces cellules, de manière à endommager les cellules de la barrière épithéliale afin de faciliter l'accès à la circulation sanguine (Lalonde, *et al.*, 2000). Dans le cas de *S. suis*, la suilysine semble responsable d'un certain nombre de lésions des cellules épithéliales *in vitro*. En effet, les souches de *S. suis* non-productrices de la suilysine ne sont pas cytotoxiques pour les cellules épithéliales (Norton, *et al.*, 1999, Lalonde, *et al.*, 2000). Plus récemment Benga et coll. ont mis en évidence l'invasion de cellules par endocytose médiée par des récepteurs en utilisant des souches acapsulées et non-typables (Benga, *et al.*, 2004).

Les interactions entre *S. suis* et les cellules phagocytaires jouent un rôle déterminant dans l'initiation de l'infection. Pour se disséminer au travers de l'organisme, *S. suis* doit survivre dans la circulation sanguine. Une fois en circulation, la bactérie peut être responsable d'une bactériémie puis d'une septicémie conduisant à la mort de l'hôte (Gottschalk & Segura, 2000, Madsen, *et al.*, 2002). Il a déjà été démontré que les souches capsulées de *S. suis* possèdent des propriétés anti-phagocytaires, alors que les souches sans

capsule sont facilement phagocytées et détruites (Charland, *et al.*, 1998, Smith, *et al.*, 1999). Par conséquent, il est possible que *S. suis* se retrouve en libre circulation dans le sang, s'attache aux monocytes, et envahisse le système nerveux central par un mécanisme apparenté à la théorie du « Cheval de Troie » (Gottschalk & Segura, 2000, Segura & Gottschalk, 2002) (figure 1-2).

La sécrétion de cytokines par les monocytes conduit à une inflammation accompagnée d'un afflux de cellules qui gênerait la circulation du liquide céphalorachidien et qui serait responsable d'une augmentation de la pression intracrânienne. Quoique les mécanismes conduisant à une stimulation de la synthèse des cytokines chez *S. suis* soient peu définis, plusieurs études suggèrent cependant un rôle joué par les composants de la paroi (Segura, *et al.*, 2006).

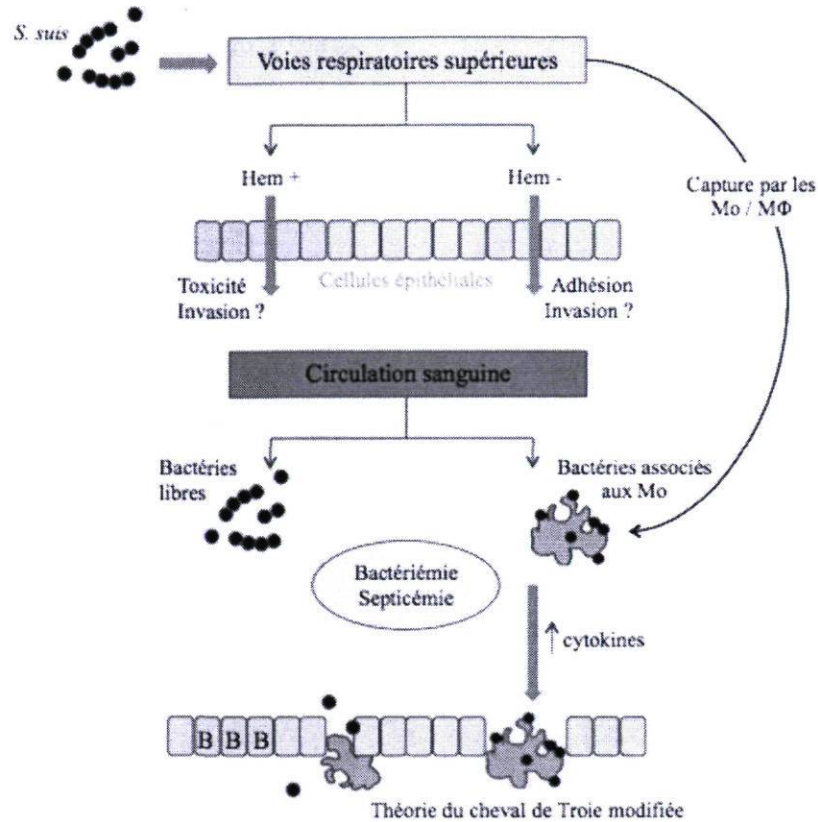


Figure 1-2: Synthèse des connaissances et des hypothèses proposées pour les différentes étapes de la pathogenèse de la méningite à *S. suis* sérotype 2 (d'après Gottschalk et Segura, 2000). Hem+: souches positives pour l'hémolysine; Hem-: souches négatives pour l'hémolysine; Mo: monocytes, Mφ: macrophages; BBB: barrière hémato-méningée.

S. suis peut adhérer aux cellules endothéliales microvasculaires de cerveau humain et porcin (HBMEC, PBMEC) (Gottschalk & Segura, 2000, Vanier, *et al.*, 2004). La cytotoxicité associée à *S. suis* peut augmenter la perméabilité de la BBB. La conséquence de cette adhérence spécifique de *S. suis* aux cellules endothéliales microvasculaires est à l'origine de plusieurs phénomènes tels qu'une augmentation du recrutement des leucocytes et de la perméabilité de la BBB (Vadeboncoeur, *et al.*, 2003). Cette adhérence peut également induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme le facteur de nécrose tumorale (TNF- α), l'interleukine 1 (IL-1) et l'interleukine 6 (IL-6), mais aussi de chemokines comme l'interleukine 8 (CXCL8) et la protéine 1 chimioattractrice des

monocytes (MCP-1) (Gottschalk & Segura, 2000, Vanier, *et al.*, 2004). Conduisant ainsi au développement d'un œdème cérébral avec une augmentation de la pression intracrânienne caractéristique de la méningite bactérienne.

Les cellules microgliales apparaissent également impliquées dans l'activation de la réponse inflammatoire contre *S. suis* (Dominguez-Punaro, *et al.*, 2007, Dominguez-Punaro, *et al.*, 2010). La souche sauvage de *S. suis* induit une régulation à la hausse du TLR2 ainsi que la production de plusieurs médiateurs proinflammatoires, dont le TNF- α et le MCP-1. *S. suis* induit également la translocation du NF- κ B. De plus, la souche de *S. suis* sauvage stimule l'expression de la phosphotyrosine ainsi que différentes cascades liées à l'activation des enzymes mitogen-activated protein kinase (MAPK). Finalement, *S. suis* stimule aussi l'expression de l'oxyde nitrique synthétase inductible et par conséquent la production d'oxyde nitrique par la microglie. Ce phénomène pourrait être lié *in vivo* à la neurotoxicité et à la vasodilatation (Dominguez-Punaro, *et al.*, 2010).

1.2.8 Modèles d'étude de la virulence de *S. suis*

La majorité des études *in vivo* visant à évaluer la virulence de *S. suis* ont été réalisées à l'aide d'un modèle porcin. L'infection de *S. suis* dans ce modèle est réalisée par voie intraveineuse ou intranasale. Les porcs sont suivis quotidiennement après l'infection; les changements de poids et de température de même que les signes cliniques tels que la claudication, l'enflure des articulations, la prostration, l'ataxie, le décubitus et la dépression sont observés (Gottschalk, *et al.*, 1995, Charland, *et al.*, 1998, De Greeff, *et al.*, 2002, Tang, *et al.*, 2006, Fittipaldi, *et al.*, 2008, Ge, *et al.*, 2009, Hu, *et al.*, 2010, Li, *et al.*, 2010, Zhang, *et al.*, 2010, Zheng, *et al.*, 2010). Un second modèle animal communément utilisé pour l'étude de la virulence de *S. suis* est le modèle murin. Les modèles murins sont ordinairement infectés à l'aide d'injections intrapéritonéales. Ces modèles s'avèrent utiles pour l'étude des symptômes conduisant au choc septique ou à des lésions cérébrales évidentes. Les changements de poids corporels, les signes cliniques d'infections

(gonflement des yeux, poil rugueux, *etc.*) et les signes neurologiques déficients, sont enregistrés quotidiennement après l'infection du modèle (Beaudoin, *et al.*, 1992, Gottschalk, *et al.*, 1995, Vecht, *et al.*, 1997, Charland, *et al.*, 1998, Allen, *et al.*, 2001, Allen, *et al.*, 2004, Costa, *et al.*, 2005, Dominguez-Punaro, *et al.*, 2007, Fittipaldi, *et al.*, 2008, Fittipaldi, *et al.*, 2008, Feng, *et al.*, 2009, Vanier, *et al.*, 2009, Zhang, *et al.*, 2009, Aranda, *et al.*, 2010, Bonifait, *et al.*, 2010, Garibaldi, *et al.*, 2010, Li, *et al.*, 2010). Dans le but d'étudier la virulence de *S. suis* des cochons d'Inde ont également été utilisés (Kay, 1991). Des études plus récentes ont également porté sur l'utilisation de poissons-zèbres. L'infection des poissons-zèbres par *S. suis* est réalisée par voie intrapéritonéale. La virulence des souches est analysée en fonction du taux de mortalité de ces animaux (Wu, *et al.*, 2010, Zhang, *et al.*, 2010). Récemment, un modèle de lapins dans lequel l'infection est induite similairement au modèle murin, a été utilisé (Li, *et al.*, 2010). Les lapins sont évalués quotidiennement en fonction de leur mortalité mais également des signes cliniques (dépression, gonflement des yeux, rugosité du poil, léthargie et nervosité) (Li, *et al.*, 2010).

Les modèles animaux sont souvent utilisés dans l'espoir qu'ils imitent le mieux possible la situation d'un être humain infecté avec le même microorganisme. Cependant, ces expériences sont souvent problématiques à la fois pour des raisons éthiques et pratiques, puisqu'elles sont coûteuses et requièrent un investissement considérable de temps. Un hôte non-mammifère représenterait une alternative intéressante en éliminant notamment les barrières de l'éthique. Les interactions hôtes-pathogènes ont évolué dans les environnements où les bactéries et leurs prédateurs eucaryotes cohabitent. Ce concept a conduit certains groupes à utiliser un de ces prédateurs eucaryotes, l'amibe *Dictyostelium discoideum*, afin de vérifier la sensibilité de ce microorganisme aux facteurs de virulence bactériens (Unal & Steinert, 2006).

D. discoideum est un organisme eucaryote du groupe des *Amoebozoa*. Cette amibe haploïde, motile et retrouvée dans le sol est également appelée «amibe sociale». Elle utilise des microorganismes, en particulier des bactéries, comme source de nutriments (Annesley & Fisher, 2009, Clarke, 2010). *D. discoideum* est un organisme phagocytaire très actif qui

se divise toutes les trois heures et consomme environ 1000 bactéries par génération (Bozzaro, *et al.*, 2008, Clarke, 2010). Le modèle de *D. discoideum* est maintenant utilisé pour étudier la virulence de nombreux agents pathogènes et cette approche a également été mise à profit pour effectuer du criblage à grande échelle. La majorité des microorganismes étudiés à ce jour demeurent des bactéries Gram-négatives. La détermination de la virulence de *S. suis* à l'aide de *D. discoideum* a fait l'objet d'une étude au cours de ce doctorat (CHAPITRE 4).

1.3 Le biofilm

1.3.1 Définition et historique du biofilm

Le biofilm constitue une communauté de microorganismes (bactéries, levures, moisissures) souvent hétérogène et structurée; vivant au sein d'une matrice extracellulaire généralement composée de polysaccharides, d'acides nucléiques et de protéines. Il est estimé que plus de 99% des bactéries sur la planète vivent à l'intérieur de biofilms (Donlan & Costerton, 2002). Cette structure offre la capacité aux microorganismes de se développer sur des surfaces vivantes, mais également inertes, et peut constituer une source d'infections diverses. Il est estimé qu'entre 60 et 80% des infections chez l'humain impliquent des biofilms (Costerton, 1999, Potera, 1999, Hall-Stoodley, *et al.*, 2004, Aparna & Yadav, 2008). Les analyses génomiques et protéomiques ont démontré que le mode de vie en biofilm est différent du mode de vie planctonique (Prigent-Combaret, *et al.*, 1999).

C'est en 1674 qu'Antonie Van Leeuwenhoek met en évidence pour la première fois et sans le savoir le concept du biofilm; son microscope lui ayant permis de décrire les «animalcules» présents dans des agrégats à la surface de ses dents (Costerton, 1999). Ce n'est qu'en 1934 que Claude Zobell lors d'analyses microscopiques de populations marines réalise que les bactéries sont attirées par des surfaces auxquelles elles adhèrent parfois pour former des populations sessiles (Zobell, 1943). Toutefois, le terme biofilm n'apparaîtra dans la littérature pour la première fois qu'en 1977, avant d'être reconnu et accepté par le monde scientifique suite aux travaux de Costerton (Costerton, *et al.*, 1978). Entre 1935 et 1978, deux microbiologistes du « Forsyth Dental Center », Gibbons et Van Houte, ont décrit en détail la plaque dentaire qui est l'un des biofilms microbiens le plus étudié à ce jour. C'est en 1964 que les étapes menant à la formation de biofilms par des bactéries en cultures pures ont été décrites (Costerton, 1999). Par la suite, la distinction entre l'adsorption réversible des bactéries aux surfaces et l'adsorption irréversible de celles-ci, qui constitue la première étape de la formation d'un biofilm, a été rapportée (Costerton, 1999).

La croissance en mode biofilm s'effectue tant sur des surfaces naturelles, telles que les dents (Kolenbrander, 2000), que sur des surfaces artificielles, telles que les prothèses cardiaques et dentaires (Hoiby, *et al.*, 1986, Parsek & Singh, 2003). La formation des biofilms bactériens a été intensément étudiée *in vitro* par microscopie confocale au laser en utilisant des bactéries exprimant une protéine fluorescente (GFP: green fluorescent protein) (Hoiby, *et al.*, 2010). Cette technique a par la suite été combinée à des analyses *in silico* pour générer des images en trois dimensions du biofilm (Hoiby, *et al.*, 2010). L'utilisation d'indicateurs fluorescents pour le pH et le potentiel redox a aussi permis de mettre en évidence la complexité de ces structures tridimensionnelles (Feipeing, *et al.*, 1994, Nadell, *et al.*, 2009).

1.3.2 Formation du biofilm

Le développement du biofilm est un processus dynamique impliquant des étapes d'adhérence, de croissance, de motilité et de production de polysaccharide extracellulaire. On reconnaît un cycle de cinq stades de croissance dans la formation du biofilm avec des caractéristiques communes indépendantes du microorganisme (Aparna & Yadav, 2008). La formation d'un biofilm bactérien débute par la phase 1 dite de conditionnement de la surface. Cette phase ne requiert que quelques secondes et est activée par des signaux environnementaux (figure 1-3) (Costerton, 1999, Aparna & Yadav, 2008). Ces signaux diffèrent d'un organisme à l'autre ; ils comprennent un changement de nature et de concentration en nutriments, de pH, de température, de concentration en oxygène, d'osmolarité et de quantité en fer (Baillie & Douglas, 1998, Aparna & Yadav, 2008, Nobbs, *et al.*, 2009). L'adhésion initiale des cellules planctoniques sur la surface fait intervenir un certain nombre de molécules spécifiques appelées adhésines et correspond à la phase 2 (adhésion primaire) de la formation du biofilm (O'Toole & Kolter, 1998, Nobbs, *et al.*, 2009). Lors de cette phase, des protéines de même que d'autres molécules se lient à la surface pour permettre l'adhésion subséquente des microorganismes. Les surfaces rugueuses sont plus propices à la formation du biofilm, ce qui est probablement dû à

l'augmentation de la surface disponible ainsi qu'à la réduction des forces d'adhésion nécessaires. Les biofilms ont également tendance à se former plus facilement sur des matériaux de nature hydrophobe, comme le téflon et autres plastiques, plutôt que sur le verre et le métal (Fletcher & Loeb, 1979, Costerton, 1999). Au cours de cette phase, le taux de croissance des microorganismes présents dans le biofilm est exponentiel (Aparna & Yadav, 2008). La phase 2 débute quelques minutes après la première et est irréversible (figure 1-3). Au cours de la phase 3, les bactéries doivent survivre dans l'environnement et résister à un grand nombre de facteurs antibactériens. Par conséquent, elles ont besoin rapidement d'une couche extérieure de protection et produisent ainsi des exopolysaccharides qui entourent toutes les cellules. Cette couche dite « matrice extracellulaire » leur permet également de piéger les nutriments retrouvés dans le milieu, de maintenir leur stabilité et de gérer les contacts avec la phase liquide (Costerton, 1995, Costerton, 1999). La matrice extracellulaire est également constituée d'autres types de molécules biologiques (protéines, lipides, ADN et ARN). Les microcolonies ainsi formées peuvent être composées d'une seule espèce de microorganismes ou de plusieurs espèces. Les bactéries en se multipliant secrètent de nombreux signaux chimiques, les phéromones, qui permettent l'établissement d'un mode de communication entre elles (appelé *quorum sensing*) (Aparna & Yadav, 2008). La phase 3 est en réalité, une étape de prolifération des cellules ; le biofilm peut atteindre une épaisseur de 10 μm . C'est à ce stade que l'on remarque l'initiation du développement de la structure particulière des biofilms (figure 1-3). Durant la phase 4, le biofilm mature et possède une épaisseur supérieure à 100 μm .

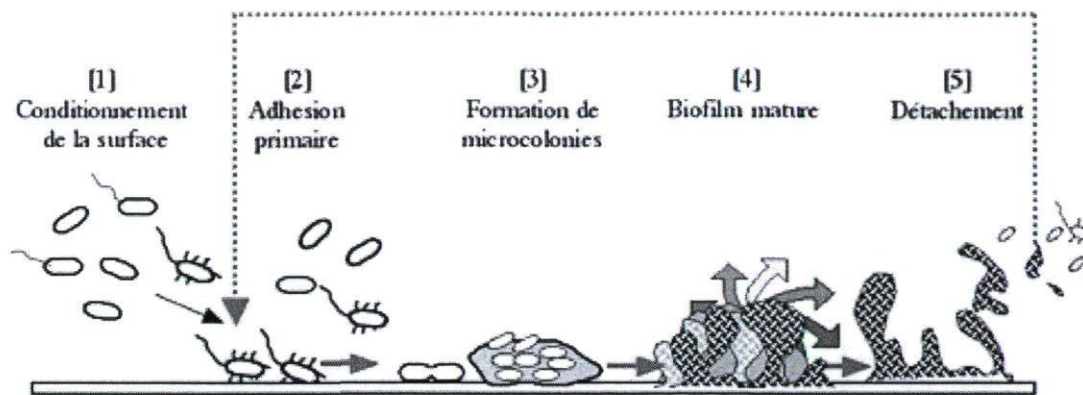


Figure 1-3: Étapes dans la formation d'un biofilm (d'après Costerton, 1999).

La représentation schématique d'un biofilm microbien montre une organisation particulière. Une simple prolifération crée des « montagnes » de bactéries, mais dans le cas du biofilm l'intervention des mouvements de fluide induit la formation de canaux permettant le passage des nutriments à l'intérieur du biofilm (Hoiby, *et al.*, 2001). Cette structure complexe, couramment appelée structure « champignon » (figure 1-4), implique l'intervention d'un système de contrôle de la croissance des bactéries par *quorum sensing*, ou par un mode complexe de communication cellules-cellules (Kaiser & Losick, 1993, Fuqua, *et al.*, 1994).

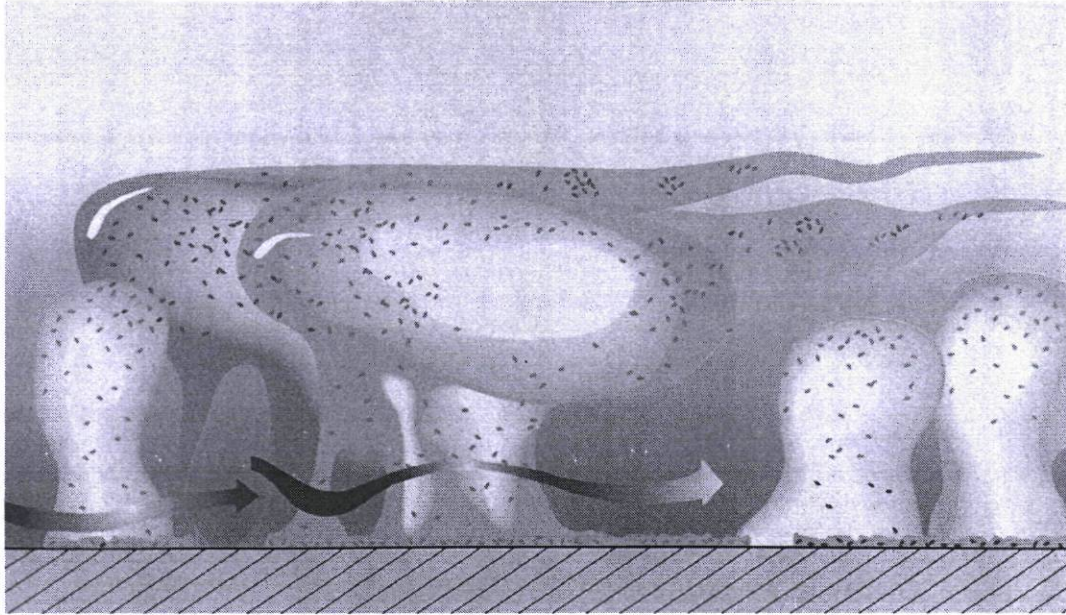


Figure 1-4: Représentation schématique d'un biofilm et de sa structure mature en forme de « champignon » (d'après Donlan & Costerton, 2002).

La phase 5 correspond à une phase de dispersion reliée au vieillissement du biofilm; des fragments s'en détachent permettant aux microorganismes d'aller coloniser une autre région (figure 1-3) (John & Donale, 2007).

1.3.3 Biofilm et *quorum sensing* chez les bactéries à Gram positifs

Le *quorum sensing* fait référence aux mécanismes de régulation qui contrôlent l'expression simultanée d'un ou plusieurs gènes bactériens au sein d'une même population. Le passage des microcolonies en biofilm mature implique l'intervention d'un signal de maturation de type *quorum sensing*. Bien que ce système soit largement décrit et caractérisé chez les bactéries à Gram négatifs, il reste encore mal défini pour les bactéries à Gram positifs (Suntharalingam & Cvitkovitch, 2005). Chez les bactéries à Gram positif, les systèmes de *quorum sensing* sont généralement constitués de trois composants, un peptide signal et un système de régulation à deux composants (Kleerebezem, *et al.*, 1997, Ng & Bassler, 2009).

Le *quorum sensing* chez les bactéries à Gram-positif régule un certain nombre d'activités physiologiques en réponse au stress oxydatif comme chez *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus mutans* (Cvitkovitch, 2001). Le *quorum sensing* peut également être associé à l'expression de facteurs de virulence chez *Staphylococcus aureus* et à la biosynthèse de peptides antimicrobiens chez *Lactococcus lactis* (Kleerebezem & Quadri, 2001). L'induction de la compétence et le processus de transformation des streptocoques semblent se faire par *quorum sensing* et via un peptide stimulant la compétence (PSC) comme le CiaRH (Cvitkovitch, *et al.*, 2003, Nobbs, *et al.*, 2009).

La protéine LuxS nécessaire pour la biosynthèse d'un auto-inducteur de type 2 (AI-2), qui est impliqué dans la détection du *quorum sensing* pour un grand nombre d'espèces bactériennes, a été identifiée chez les streptocoques (Merritt, *et al.*, 2003, Strocher, *et al.*, 2003). Une mutation dans le gène *luxS* a été associée à une diminution de la formation du biofilm chez *S. mutans* (Merritt, *et al.*, 2003) et à une réduction de la virulence de *S. pneumoniae* dans un modèle de souris (Strocher, *et al.*, 2003).

1.3.4 Résistance du biofilm

La nature du biofilm et l'état physiologique dans lequel s'y retrouvent les cellules bactériennes lui confèrent un niveau élevé de résistance aux agents antimicrobiens (Hoiby, *et al.*, 2010) ainsi qu'au système de défense immunitaire de l'hôte (Costerton, 1999).

1.3.4.1 Résistance aux antibiotiques

La résistance des bactéries du biofilm face aux antibiotiques contribue à la chronicité des infections. Au sein du biofilm, il existe un gradient de nutriments et d'oxygène. La concentration en oxygène s'avère élevée à la surface, mais faible au centre du biofilm où

des conditions anaérobies peuvent être rencontrées (Costerton, *et al.*, 1995). La croissance, la synthèse protéique et l'activité métabolique des bactéries sont modifiées en fonction des strates du biofilm. À la surface, un niveau élevé d'activité est observé alors qu'au centre du biofilm, l'activité métabolique est plutôt faible voire absente. C'est l'une des explications de la sensibilité réduite des biofilms aux antibiotiques qui attaquent souvent des cellules en croissance active (Werner, *et al.*, 2004, Hoiby, *et al.*, 2010). De plus, la proximité des bactéries dans les biofilms les rend favorables aux échanges génétiques entre elles (Sorensen, *et al.*, 2005, Nadell, *et al.*, 2009).

Les mécanismes de résistance aux antibiotiques classiques, tels que les pompes à efflux, la production de β -lactamase, les modifications d'enzymes, et les mutations de la cible de l'antibiotique chez les bactéries contribuent à la survie des bactéries du biofilm (Hoiby, *et al.*, 2010). Néanmoins, une fois les bactéries en dehors du biofilm, la majorité d'entre elles deviennent rapidement sensibles aux antibiotiques (Anwar, *et al.*, 1989). La résistance aux antibiotiques est également liée à la faible capacité de diffusion des antibiotiques à l'intérieur du biofilm. En effet, la matrice d'exopolysaccharides limite la diffusion (Lewis, 2001). Les biofilms peuvent cependant être éliminés au début de leur formation par une prescription d'antibiotiques agressive. Une stratégie intéressante dans l'élimination des biofilms semble être l'utilisation d'enzymes permettant la destruction de la matrice extracellulaire (DNAse et alginate lyase) ainsi que d'inhibiteurs de *quorum sensing* (Hoiby, *et al.*, 2010).

1.3.4.2 Résistance au système immunitaire de l'hôte

Plus de la moitié des maladies infectieuses impliquent des espèces bactériennes commensales du corps humain ou communes à leur environnement (Costerton, 1995, Costerton, *et al.*, 1999). En 1994, Rodgers et coll. ont mis en évidence que l'exopolysaccharide de *Staphylococcus epidermidis* assurerait sa survie en le protégeant de la réponse immunitaire de l'hôte par interférence avec la phagocytose (Rodgers, *et al.*,

1994). Les bactéries sessiles relarguent des antigènes (Ag) et stimulent ainsi la production d'anticorps (Ac). Ces Ac sont incapables d'éliminer les bactéries présentes dans les biofilms. De plus, ils peuvent endommager les tissus environnants en menant à un phénomène inflammatoire important (Costerton, 1999, Jensen, *et al.*, 2010). Même chez les patients présentant une excellente réponse immunitaire à médiation cellulaire et humorale, les infections impliquant un biofilm sont rarement éliminées par les mécanismes de défense de l'hôte (Costerton, *et al.*, 1999).

1.3.5 Rôle du biofilm dans les endocardites et méningites bactériennes

La matrice du biofilm est souvent mentionnée comme étant uniquement d'origine bactérienne. Bien que cela s'applique aux biofilms cultivés sur une surface abiotique en laboratoire, les infections de type endocardites bactériennes sont caractérisées par des bactéries qui adhèrent aux tissus en incluant des cellules et des molécules de l'hôte (Hall-Stoodley, *et al.*, 2004). Les streptocoques sont les agents étiologiques responsables de plus de la moitié des cas d'endocardites infectieuses, l'autre moitié des cas étant due en grande majorité à des staphylocoques (Donlan & Costerton, 2002). Ces microorganismes ont accès à la circulation sanguine via l'oropharynx, le tractus gastro-intestinal et le tractus génito-urinaire. En temps normal les microorganismes adhèrent difficilement à un endothélium intact. Toutefois, lorsque l'endothélium des valves cardiaques est endommagé, une accumulation de plaquettes, de fibrine et parfois même de globules rouges se produira au site de la blessure. La liaison à ces agrégats de cellules bactériennes peut conduire aux endocardites bactériennes (Donlan & Costerton, 2002, Hall-Stoodley, *et al.*, 2004). La fibronectine a été identifiée dans les lésions thrombotiques des valves cardiaques, celle-ci peut se lier simultanément à la fibrine, au collagène, aux cellules humaines et aux bactéries (Donlan & Costerton, 2002, Hall-Stoodley, *et al.*, 2004). Plusieurs streptocoques dont *S. suis* possèdent des récepteurs pour la fibronectine qui auraient un rôle dans la virulence bactérienne (De Greeff, *et al.*, 2002). Les infections qui conduisent à une endocardite infectieuse impliquent une interaction complexe entre l'hôte

et les microorganismes pathogènes. Les microorganismes doivent se multiplier au niveau des lésions de l'endocarde valvulaire ou sur un matériel prothétique intracardiaque. Cette adhésion est souvent réalisée par des MSCRAMM (Bashore, *et al.*, 2006). Certains organismes produisent cette molécule de surface en quantité plus importante que d'autres, ce qui pourrait expliquer la prévalence des streptocoques dans les endocardites (Bashore, *et al.*, 2006).

La méningite bactérienne est une maladie grave qui représente 20 à 25% des méningites et une cause importante de mortalité et de morbidité définie par l'inflammation des méninges. Le facteur clé qui contribue à cette forte prévalence est la compréhension incomplète de sa pathogénie (Kim, 2003). La méningite bactérienne fait intervenir plusieurs interactions bactéries-hôte. Dans un premier temps, il se produit une colonisation des muqueuses nasopharyngées, par l'agent pathogène; c'est à cette étape que la capacité de formation du biofilm pourrait être critique dans la maladie. Parmi les bactéries responsables de méningites, on retrouve plusieurs streptocoques dont *S. pneumoniae* qui est la cause majeure des méningites chez l'adulte (Giebink, 2001). Après la colonisation du nasopharynx par *S. pneumoniae*, il s'ensuit dans les cas de méningite, une bactériémie, une invasion de la BBB et une prolifération dans le système nerveux central (SNC) (Barichello, *et al.*, 2010).

Beaucoup de bactéries responsables de méningites sont également des causes d'endocardites (Arditi, *et al.*, 1989, Moscoso, *et al.*, 2009, Rajasekhar & Clancy, 2010), ce qui nous permet d'émettre l'hypothèse d'un lien potentiel entre ces deux maladies. Nous supposons que la capacité de formation du biofilm par les bactéries est à l'origine de ces deux infections.

1.3.6 Biofilm et *S. suis*

Il y a très peu de données dans la littérature qui traitent de la capacité de *S. suis* à former un biofilm. Ce n'est que récemment que certains chercheurs ont émis l'hypothèse d'un lien possible entre la virulence des souches de *S. suis* et leur capacité à former un biofilm. Les études menées dans notre laboratoire ont démontré qu'une minorité de souches de *S. suis* sont capables de former un biofilm. Ceci peut être lié avec le fait que la formation d'un biofilm dépend des conditions environnementales, du milieu de culture et des conditions d'incubation (Grenier, *et al.*, 2009). Récemment, Wang et coll. ont mis en évidence la capacité de *S. suis* à former un biofilm afin de survivre dans un environnement hostile. Dans cette étude, les auteurs ont utilisé des souches virulentes de *S. suis* sérotype 2, HA9801 et ZY05719, et une souche avirulente T15. La virulence des souches semblait être liée à leur capacité de formation d'un biofilm; les souches virulentes formant un biofilm plus important (Wang, *et al.*, 2010). Une analyse comparative de la transcription des gènes de virulence connus a démontré que les niveaux de transcription des gènes codant pour la glutamate déshydrogénase (*gdh*), la capsule (*cps2*) et la MRP (*mrp*) étaient diminués chez les bactéries cultivées sous forme de biofilm, tandis que les gènes codant pour la suilysine (*sly*) et la GAPDH (*gapdh*) étaient surexprimés (Wang, *et al.*, 2010).

La capacité de formation du biofilm chez *S. suis* a fait l'objet de plusieurs études au cours de ce doctorat, toutes décrites en détails au cours du chapitre 2.

1.4 Les protéases

1.4.1 Généralités

Les protéases et peptidases, également appelées enzymes protéolytiques, sont des enzymes qui catalysent le clivage des liaisons peptidiques entre les acides aminés qui constituent les peptides et protéines (Barrett, 2001). Elles font donc partie de la famille des hydrolases. Les protéases se retrouvent dans toutes les formes de vie, de la bactérie à l'homme et même chez les virus.

Les protéases sont divisées en deux principaux groupes en fonction de la coupure dans la chaîne peptidique: les exopeptidases et les endopeptidases. Les exopeptidases clivent la liaison peptidique au niveau du résidu carboxy ou amino terminal, tandis que les endopeptidases clivent les liaisons peptidiques à l'intérieur de la chaîne peptidique (Barrett, 2001). La plupart des endopeptidases clivent préférentiellement la chaîne peptidique à des positions bien définies, en fonction de sa composition en acides aminés (Appel, 1986). De cette classification résultent sept groupes, les sérines protéases, les protéases acides (protéases à groupement aspartate), les thiols protéases (protéases à groupement cystéine), les métallo-protéases, les protéases à groupement acide glutamique, les protéases de type thréonine (ajoutées récemment) (Seemuller, *et al.*, 1995, Barrett, 2001) et un septième groupe constitué par des peptidases inclassables dans les 6 premiers groupes: par exemple, les protéases ATP-dépendantes qui requièrent de l'ATP pour leur activité (Menon & Goldberg, 1987).

Les protéases exercent des fonctions biologiques variées qui peuvent entraîner des effets bénéfiques ou néfastes en fonction du contexte. Au niveau cellulaire, elles sont responsables de la dégradation des protéines endommagées ou incorrectement traduites. Elles jouent aussi un rôle cellulaire dans la maturation des protéines impliquant des processus post-traductionnels ainsi que dans leur transport. Indispensables pour les organismes vivants, les protéases exécutent une grande variété de fonctions aussi bien au

niveau de la cellule que de l'organe. Chez l'homme, il existe ainsi des processus physiologiques de protéolyse en cascade physiologique, comme l'hémostase et l'inflammation. Elles agissent au niveau de la coagulation sanguine et de la lyse des caillots de fibrine ; dans le remodelage des tissus au cours du développement de l'organisme ; dans la cicatrisation et dans la digestion des aliments. Certaines protéases agissent comme des toxines, telle la toxine botulique. En hydrolysant certaines liaisons peptidiques, les protéases peuvent modifier les propriétés biologiques d'une protéine. Ce sont des enzymes qui peuvent être dommageables pour la cellule et qui doivent donc être soumises à un contrôle rigoureux. La régulation peut être réalisée au niveau de la transcription, de la traduction et des mécanismes post-traductionnels, via des interactions avec des inhibiteurs de protéases ou d'autres protéines.

Chez les microorganismes procaryotes, les protéases sont souvent associées à la virulence. Leur implication dans le cycle de vie des organismes pathogènes et dans la création de dommages chez l'hôte les amène d'ailleurs à représenter des cibles potentielles pour le développement d'agents thérapeutiques contre certaines maladies comme le cancer et le SIDA.

Les protéases présentent également un grand intérêt dans l'industrie agroalimentaire et chimique (Rao, *et al.*, 1998). Leur grande diversité structurale des protéases et des rôles qu'elles peuvent jouer a conduit à de nombreuses tentatives destinées à exploiter leurs applications physiologiques et biotechnologiques (Rao, *et al.*, 1998). De ce fait, on les retrouve dans différents secteurs de l'activité humaine. Dans les détergents où elles améliorent le potentiel nettoyant, dans l'industrie du cuir pour remplacer les produits chimiques irritants dans le nettoyage des peaux et dans l'industrie alimentaire pour favoriser la coagulation du lait dans la fabrication de fromages ou pour permettre la dégradation contrôlée du gluten, une protéine allergène présente dans la farine de blé. Enfin, les protéases jouent un rôle dans l'industrie pharmaceutique alors qu'elles peuvent être utilisées pour pallier à certaines déficiences en protéases chez l'humain. L'importance des protéases dans le monde industriel de même que leurs propriétés biochimiques et

biotechnologiques ont fait l'objet de plusieurs revues de littérature (Kalisz, 1988, Rao, *et al.*, 1998, Inouye, *et al.*, 2007).

1.4.2 Protéases microbiennes

Les microorganismes représentent une importante source d'enzymes protéolytiques en raison de leur grande diversité biochimique. La plupart des protéases disponibles commercialement sont produites par des organismes appartenant au genre *Bacillus*. Les protéases peuvent jouer de multiples rôles chez les bactéries en vue de favoriser leur croissance et leur multiplication. Par exemple, plusieurs espèces microbiennes secrètent des protéases qui détruisent la matrice extracellulaire des biofilms, ce qui stimule leur croissance en leur apportant des éléments nutritifs (Travis, *et al.*, 1995, Potempa, *et al.*, 2000). Les protéases microbiennes peuvent également inactiver d'importantes molécules du système immunitaire de l'hôte comme les immunoglobulines (Von Pawel-Rammingen & Bjorck, 2003), les protéines du système du complément (Chen & Cleary, 1990) et les peptides antimicrobiens (Schmidtchen, *et al.*, 2002, Sieprawska-Lupa, *et al.*, 2004). Ainsi, elles représentent dans plusieurs cas des facteurs de virulence pour les bactéries pathogènes notamment *S. pyogenes* (Edwards, *et al.*, 2005, Hidalgo-Grass, *et al.*, 2006, Sumby, *et al.*, 2008), *Porphyromonas gingivalis* (Kumagai, *et al.*, 2000, Bodet, *et al.*, 2005, Grenier & Tanabe, 2010) et *S. pneumoniae* (Wani, *et al.*, 1996, Bergmann, *et al.*, 2001).

1.4.3 Protéases de *S. suis*

Chez plusieurs agents pathogènes, dont *S. suis*, les activités protéolytiques jouent un rôle important dans l'acquisition de nutriments, la perturbation des mécanismes de défense de l'hôte, de même que l'invasion et la destruction tissulaire (Jobin & Grenier, 2003, Jobin, *et al.*, 2004, Jobin, *et al.*, 2005). Cinq activités protéolytiques majeures ont été identifiées chez *S. suis*: Arginine-aminopeptidase (Arg-aminopeptidase), caséinase, pseudo-

chymotrypsine, dipeptidyl peptidase IV et IgA1 protéase (Jobin & Grenier, 2003, Zhang, *et al.*, 2010).

1.4.3.1 Arginine-aminopeptidase

L'Arg-aminopeptidase de *S. suis* est retrouvée associée aux cellules de *S. suis*, mais également excrétée dans le milieu extérieur (Jobin & Grenier, 2003). Chez les bactéries, les résidus arginines relargués par l'action d'une arg-aminopeptidase semblent être impliqués dans la production d'ATP et d'autres précurseurs métaboliques importants (Cunin, *et al.*, 1986). Bien que cette protéase n'ait pas encore été impliquée comme facteur de virulence chez *S. suis*, la présence d'une arg-aminopeptidase a été mise en évidence chez *S. gordonii* comme un facteur critique pour l'acquisition *in vivo* d'arginine en période de stress nutritionnel et aussi dans la protéolyse de protéines de l'hôte lors d'endocardites bactériennes subaiguës (Goldstein, *et al.*, 2002). Toutefois, on note également la présence de cette protéase chez d'autres streptocoques non pathogènes comme *S. mitis* (Hiraoka, *et al.*, 1983).

1.4.3.2 Caséinase

La caséinase est une protéase qui permet l'acquisition de nutriments chez de nombreuses bactéries (Titball, *et al.*, 1985) et peut dans certains cas être considérée comme un facteur de virulence (Titball, *et al.*, 1985, Esteve & Birbeck, 2004). Par exemple, Titball et coll. ont démontré la participation de la caséinase d'*Aeromonas salmonicida* dans l'activation de son hémolysine (Titball, *et al.*, 1985). Une forte activité caséinase a été détectée chez toutes les souches de *S. suis* sérotype 2 (Jobin & Grenier, 2003). *S. suis* possédant également une hémolysine, Jobin et coll. ont suggéré par conséquent un rôle potentiel de la caséinase de cette bactérie dans la maturation de la suilysine (Jacobs, *et al.*, 1994, Jobin & Grenier, 2003).

1.4.3.3 IgA1 protéase

L'immunoglobuline A (IgA) sécrétoire constitue un acteur important des mécanismes de défense du système immunitaire. Elle se localise au niveau des muqueuses et des voies respiratoires. Le clivage de l'IgA sécrétoire par des protéases bactériennes la rend inactive et favorise donc le développement d'infections (Diebel, *et al.*, 2004). L'IgA1 protéase a d'abord été considérée comme facteur de virulence chez les bactéries pathogènes Gram-négatives (Diebel, *et al.*, 2004) puis par la suite chez les bactéries Gram-positives (Kadioglu, *et al.*, 2008). Mise en évidence chez *S. suis* par Zhang et coll., l'IgA1 protéase a été identifiée comme jouant un rôle dans la virulence de cette bactérie (Zhang, *et al.*, 2010). Chez *S. suis*, l'IgA1 protéase pourrait permettre aux bactéries de lutter contre les composants du système immunitaire présents au niveau des muqueuses et ainsi d'envahir l'hôte (Zhang, *et al.*, 2010). Le gène codant cette enzyme est présent dans la plupart des souches virulentes, mais seulement sporadiquement chez les isolats non pathogènes de *S. suis* (Zhang, *et al.*, 2010). L'IgA1 protéase décrite par Zhang et coll., est active sur les IgA d'origine humaine quoique les IgA d'origine porcine sont différentes. Il serait donc intéressant de tester l'effet de l'IgA1 protéase sur des IgA de type porcin avant d'assigner à cette protéine un rôle majeur dans la virulence.

1.4.3.4 Dipeptidyl peptidase IV

La dipeptidyl peptidase IV (DPP IV), anciennement connue sous le nom de CD26, est une sérine protéase qui clive les dipeptides X-Pro et Ala-X à partir des extrémités N-terminales des chaînes polypeptidiques. L'activité DPP IV a été retrouvée non seulement chez les eucaryotes, mais également chez les bactéries comme *Flavobacterium meningosepticum* (Kabashima, *et al.*, 1995), *Porphyromonas gingivalis* (Kiyama, *et al.*, 1998), *S. gordonii* (Goldstein, *et al.*, 2001) et *S. suis* (Jobin & Grenier, 2003). Elle permet de lier l'adénosine désaminase (Dong, *et al.*, 1997) et certaines protéines tissulaire de l'hôte comme le collagène ou la fibronectine (Cheng, *et al.*, 1998). Chez l'humain, la DPP IV contribue à la

pathogénèse de certaines maladies comme le cancer du sein, le diabète ou le SIDA (Gutheil, *et al.*, 1994, Cheng, *et al.*, 1998). Chez les procaryotes, la DPP IV est reconnue comme un facteur de virulence pour divers agents pathogènes (Yagishita, *et al.*, 2001).

La DPP IV de *S. suis* a été clonée et purifiée (Jobin, *et al.*, 2005). Tout comme pour l'argininopeptidase, la DPP IV de *S. suis* se retrouve soit liée aux cellules ou alors dans l'environnement extracellulaire (Jobin, *et al.*, 2005). L'action de la DPP IV de *S. suis* sur les protéines et les polypeptides pourrait en modifier l'activité biologique et conduire à des molécules tronquées ou générer de nouveaux peptides biologiquement actifs (Jobin, *et al.*, 2005). En effet, beaucoup de cytokines naturelles, telles l'IL-1 β , IL-2 et CCL-5, possèdent une proline en seconde position dans leurs chaînes polypeptidiques et peuvent être sensibles à l'action de la DPP IV de *S. suis* (Mentlein, 1999). Il pourrait ainsi en résulter des modifications locales de la réponse immunitaire de l'hôte lors de l'infection et mener à la dérégulation des processus inflammatoires au cours la méningite (Jobin, *et al.*, 2005). La DPP IV de *S. suis* pourrait également participer à la destruction tissulaire. En effet, Abiko et coll. ont démontré la capacité de la DPP IV de *P. gingivalis* à dégrader le collagène de type I (Abiko, *et al.*, 1985, Kumagai, *et al.*, 2000). De plus, Ge et coll. ont démontré que la DPP IV de *S. suis* purifiée possède la capacité de lier la fibronectine humaine et pourrait ainsi contribuer à l'adhérence de *S. suis* à la surface des cellules hôtes (Ge, *et al.*, 2009).

1.4.3.5 Pseudo-subtilisine

À l'origine, une activité pseudo-chymotrypsine appartenant à la classe des sérines protéases a été mise en évidence chez *S. suis* sérotype 2 (Jobin & Grenier, 2003). Cette protéase présente de nombreuses similitudes avec la protéinase PrtS, une pseudo-subtilisine associée à la paroi de *S. thermophilus* et mise en évidence par Fernandez-Espla et coll. (Fernandez-Espla, *et al.*, 2000, Jobin & Grenier, 2003). Ce n'est que récemment que le lien a été établi entre les deux. La pseudo-chymotrypsine de *S. suis* est en réalité une pseudo-subtilisine qui est maintenant connue sous le nom de SspA (Hu, *et al.*, 2010).

Les pseudo-subtilisines sont des protéases produites par de nombreux microorganismes. On les retrouve chez les microorganismes eucaryotes comme *Trichomonas vaginalis* (Hernandez-Romano, *et al.*, 2010), mais particulièrement chez les procaryotes comme *Bacillus intermedius* (Mikhailova, *et al.*, 2009), *Fingoldia magna* (anciennement *Peptostreptococcus magnus*) (Karlsson, *et al.*, 2007), les streptocoques du groupe B (Harris, *et al.*, 2003), *S. thermophilus* (Fernandez-Espla, *et al.*, 2000), *S. pneumoniae* (Bethe, *et al.*, 2001), *S. agalactiae* (Brown, *et al.*, 2005) et *S. suis* (Hu, *et al.*, 2010).

Harris et coll. ont étudié le rôle de la pseudo-subtilisine dans la virulence des streptocoques du groupe B (Harris, *et al.*, 2003). Cette protéase est un homologue des C5A peptidases qui permettent une résistance des bactéries à l'opsonisation et qui possèdent une capacité de conversion du fibrinogène en fibrine (Harris, *et al.*, 2003). Chez *F. magna*, Karlsson et coll. ont confirmé la capacité de la pseudo-subtilisine (SufA) à cliver le fibrinogène pour empêcher sa transformation en fibrine par la thrombine (Karlsson, *et al.*, 2009). Ils ont démontré également sa capacité d'inactiver les peptides antimicrobiens et les cytokines favorisant ainsi la survie et la colonisation par *F. magna*, une bactérie responsable d'endocardites chez l'humain (Karlsson, *et al.*, 2007, Karlsson, *et al.*, 2009). De plus, Bryan et Shelver ont montré la capacité de la pseudo-subtilisine de *S. agalactiae* (CspA) de dégrader et inactiver plusieurs chimiokines (GRO- α , GRO- β , GRO- γ , peptides d'activation des neutrophiles 2 [NAP-2] et les protéines chimiotactiques des granulocytes 2 [GCP-2]) (Bryan & Shelver, 2009). La pseudo-subtilisine SpcC des streptocoques du groupe A possède également la capacité de dégrader des chimiokines comme l'CXCL8, les kératinocytes chemoattractants (KC) et les protéines inflammatoires des macrophages 2 (MIP-2) et ainsi la capacité d'inhiber le recrutement des polynucléaires neutrophiles au site de l'infection (Hidalgo-Grass, *et al.*, 2006). Il a été démontré dans un modèle murin, que la SpcC est un facteur de virulence essentiel capable d'inactiver directement un élément clé de la réponse immunitaire de l'hôte (Hidalgo-Grass, *et al.*, 2006). La pseudo-subtilisine de *S. pneumoniae* (PrtA), mise en évidence à l'origine par Courtney (Courtney, 1991) a également été identifiée comme un facteur de virulence pour ce pathogène (Bethe, *et al.*,

2001). Produite comme une protéine précurseur, elle est transloquée à la surface des cellules, tronquée puis relâchée dans le milieu extracellulaire (Bethe, *et al.*, 2001).

Récemment, Hu et coll. ont rapporté que l'expression de la SspA par *S. suis* était augmentée par un facteur de 1000 dans des conditions *in vivo* par rapport à des conditions *in vitro*, ce qui suggère son importance dans la pathogenèse des infections à *S. suis* (Hu, *et al.*, 2010). La pseudo-subtilisine SspA de *S. suis* a fait l'objet du présent projet de doctorat; son rôle dans la virulence de même que sa capacité à induire la sécrétion de cytokines par les macrophages seront présentés dans le chapitre 3.

1.5 Problématique, hypothèse et objectifs

1.5.1 Problématique

Les mécanismes de pathogénicité de *S. suis* intervenant dans les infections porcines et humaines demeurent encore mal définis.

1.5.2 Hypothèse

La contribution du biofilm et des protéases est déterminante dans la pathogénicité de *S. suis*

1.5.3 Objectifs

Le premier objectif fut de caractériser les mécanismes de formation du biofilm chez *S. suis*. Dans ce but, nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, aux conditions environnementales qui pourraient moduler la formation du biofilm chez *S. suis* et en augmenter sa résistance aux antibiotiques. Dans un second temps, la possibilité que la capsule polysaccharidique de *S. suis* puisse constituer un obstacle dans sa capacité de formation du biofilm a été étudiée.

Le second objectif fut de caractériser les propriétés biochimiques et biologiques de la pseudo-subtilisine de *S. suis*. Pour ce faire, la pseudo-subtilisine a d'abord été clonée et purifiée. L'utilisation d'un mutant déficient pour la protéase a permis d'évaluer son importance pour le développement d'une infection dans un modèle animal.

Le troisième objectif fut de mettre au point un nouveau modèle d'étude de la virulence de *S. suis*. Ce modèle fut basé sur l'utilisation des amibes, plus particulièrement *D. discoideum*.

1.6 Impact de l'étude

Par la réalisation des objectifs de cette étude, nous avons généré des résultats qui ont permis une meilleure compréhension de la pathogenèse des infections à *S. suis* et pourraient aider à la mise au point de nouveaux outils pour protéger les exploitations agricoles. En particulier, la connaissance des mécanismes de formation du biofilm chez *S. suis* pourrait permettre de proposer un traitement efficace pour lutter contre cet agent infectieux. Nous souhaitons également que la pseudo-subtilisine de *S. suis* au vu de son implication dans la virulence de *S. suis* puisse être reconnue comme candidate potentielle pour un futur vaccin à base de protéines.

CHAPITRE 2: ÉTUDE DE LA FORMATION DU BIOFILM CHEZ *S. suis*

2.1 Article 1: Fibrinogen induces biofilm formation by *Streptococcus suis* and enhances its antibiotic resistance

SHORT COMMUNICATION

Article publié en 2008 dans la revue Applied and Environmental Microbiology, sous la référence 74(15):4969-72.

Laetitia Bonifait, Louis Grignon, and Daniel Grenier*

^aGroupe de Recherche en Écologie Buccale, Faculté de Médecine Dentaire,
Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada

Running title: Fibrinogen and biofilm formation

Keywords: *Streptococcus suis*, biofilm, fibrinogen, antibiotic resistance

*Corresponding author. Mailing address: Groupe de Recherche en Écologie Buccale,
Faculté de Médecine Dentaire, Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada, G1K 7P4
Phone: (418) 656-7341. Fax: (418) 656-2861. E-mail: Daniel.Grenier@greb.ulaval.ca

2.1.1 Résumé

Dans cette étude, nous avons démontré que l'addition de fibrinogène (humain, porcin) au milieu de culture induit la formation d'un biofilm par *Streptococcus suis* de manière dose-dépendante. La croissance de *S. suis* en biofilm était associée à une augmentation de sa résistance face à la pénicilline G. La liaison du fibrinogène à la surface de *S. suis* pourrait contribuer à la formation du biofilm.

2.1.2 Abstract

In this study, we showed that supplementing the culture medium with fibrinogen induced biofilm formation by *Streptococcus suis* in a dose-dependent manner. Biofilm-grown *S. suis* were much more resistant to penicillin G than planktonic cells. *S. suis* bound fibrinogen to its surface, a property that likely contributes to biofilm formation.

2.1.3 Introduction, results, discussion, conclusion

Streptococcus suis, a major swine pathogen world-wide, is transmitted via the respiratory route and colonizes the palatine tonsils of pigs (11). Although thirty-five serotypes (1 to 34 and 1/2) have been identified, serotype 2 is considered the most prevalent and virulent in pigs (9). Major infections caused by this pathogen include septicemia, meningitis, and endocarditis (9). Zoonotic diseases caused by *S. suis* occur sporadically in individuals who work in close contact with pigs or pork byproducts (7, 10).

Biofilm formation by pathogenic microorganisms is a mechanism that allows them to become persistent colonizers, resist clearance by the innate and adaptive host immune system, enhance their resistance to antibiotics, and exchange genetic material (6). Biofilm formation is influenced by environmental parameters such as the nature and availability of nutrients, which may modulate adhesin and polysaccharide production (15). We recently investigated the capacity of *S. suis* isolates to form biofilms and showed that this property was restricted to few strains (8). In the present study, we report that fibrinogen induced biofilm formation by *S. suis* and increased its resistance to antibiotics.

The basal broth medium used to investigate biofilm formation by *S. suis* S735, a virulent serotype 2 strain, contained 0.5% glucose, 2% peptone (Proteose Peptone No. 3, BBL Microbiology Systems), 0.3% K₂HPO₄, 0.2% KH₂PO₄, 0.01% MgSO₄•7H₂O, 0.002% MnSO₄•6H₂O, and 0.5% NaCl. An overnight culture of *S. suis* was diluted in fresh culture broth to obtain an optical density at 660 nm (OD₆₆₀) of 0.2. Samples (100 µl) were added to the wells of a 96-well polystyrene tissue culture plate containing 100 µl of culture medium. The effect on biofilm formation by *S. suis* of supplementing the medium with various mammalian proteins was investigated. The following proteins were added (5 mg/ml) to the basal broth medium: fibrinogen (human, bovine, porcine), serum albumin (bovine), transferrin (human), gamma-globulin (human), plasminogen (human), and mucin (porcine). Human fibrinogen was also tested at final concentrations of 0.5, 1, and 2 mg/ml. The plates were incubated for 18 h at 37°C, and bacterial growth was evaluated by measuring the

optical density at 655 nm (OD_{655}) using a microplate reader. Medium and free-floating bacteria were then removed and biofilms were stained with crystal violet dye as previously described (8).

As shown in Figure 2-1, human, bovine, and porcine fibrinogen all induced marked biofilm formation. The effect was dose dependent and was observed at the lowest human fibrinogen concentration tested (0.5 mg/ml) (Figure 2-2). Pre-coating the wells with fibrinogen (5 mg/ml for 2 h) did not induce biofilm formation (data not shown). Fibrinogen-induced biofilm formation was not related to increased growth since the fibrinogen had no impact on the growth of *S. suis* (data not shown). Other mammalian proteins, including serum albumin, transferrin, gamma-globulin, plasminogen, and mucin, did not promote biofilm formation by *S. suis* in the polystyrene microplate (Figure 2-1). To ensure that fibrinogen-induced biofilm formation was not a strain-specific phenomenon, additional strains of *S. suis* were tested. As shown in Figure 2-3, human fibrinogen induced all ten strains, including one serotype 1/2 (2651) and one serotype 3 (4961) strain, to form biofilms to various extents.

The structural architecture of the *S. suis* S735 biofilm formed in the absence and presence of human fibrinogen (5 mg/ml) was examined by scanning electron microscopy using the procedure previously described (8). As shown in Figure 2-4, in the absence of fibrinogen, individual bacteria and short chains of *S. suis* S735 were observed attached to the polystyrene surface but were rarely bound to each other. However, when the culture medium was supplemented with fibrinogen, aggregates and microcolonies of *S. suis* almost completely covered the surface of the support.

The minimal inhibitory concentrations (MICs) and minimal bactericidal concentrations (MBCs) of penicillin G for planktonic *S. suis* S735 and AAH4 cells were determined using a micro-broth dilution method. The wells of a microtiter plate, each containing 100 μ l of serially diluted penicillin G (62 to 0.0004 μ g/ml), were inoculated with 100 μ l of an overnight culture of *S. suis* diluted in fresh culture broth to obtain an OD_{655} of 0.5. The

MIC was the lowest concentration of antibiotic for which no significant increase in OD₆₅₅ was noted after a 24 h incubation at 37°C. To determine the MBCs, 10 µl of culture was collected from wells with no apparent growth and spread on Todd Hewitt broth (THB) agar plates. The MBC was the lowest concentration of antibiotic at which no colonies grew on the plates. The MICs and MBCs for biofilm-grown *S. suis* S735 and AAH4 were determined using a microtiter plate containing a 24 h pre-formed fibrinogen-induced biofilm in each well. The culture supernatants were aspirated and 200 µl of two-fold serial dilutions of antibiotic in fresh culture broth was added to the wells. The plate was then incubated at 37°C for 24 h. The biofilm-grown bacteria were then suspended by scraping the bottom of the wells with a 200 µl pipet tip and performing up and down aspiration until an homogenous suspension was obtained. Growth was then estimated by recording the OD₆₅₅. The MICs were the lowest concentrations of antibiotic for which no significant increase in OD₆₅₅ was noted following the addition of the antibiotic. The MBCs of the biofilm-grown cells were determined by spreading 10 µl of the resuspended biofilm on a THB agar plate. The MBC was the lowest concentration of antibiotic for which no colonies grew on the agar medium. The MICs and MBCs of penicillin G for *S. suis* strains S735 and AAH4 grown in biofilms (presence of fibrinogen) and planktonic cultures are reported in Table 2-1. *S. suis* (both strains) grown in a biofilm induced by the presence of fibrinogen had MICs similar to those of the planktonic cultures. However, the MBCs were much higher for biofilm cells. More specifically, the MBCs for *S. suis* S735 and AAH4 biofilm cells were 1.95 µg/ml (0.03 µg/ml for planktonic cells) and 15.6 µg/ml (1.95 µg/ml for planktonic cells), respectively. This enhanced resistance to antibiotics is likely related to the stable architecture of biofilms, which restricts the penetration of antibiotics.

The mechanisms by which human fibrinogen promotes biofilm formation by *S. suis* S735 and AAH4 were then investigated. First, the ability of *S. suis* (cells and culture supernatant) to produce fibrin from fibrinogen was assayed using a plate assay as previously described (1). Thrombin (1 unit/ml) was used as a positive control. Neither *S. suis* cells nor culture supernatants converted fibrinogen into fibrin. Second, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed to investigate fibrinogen binding to *S. suis*. Briefly, bacterial

cells were harvested by centrifugation, suspended ($OD_{660} = 0.25$) in 50 mM carbonate buffer (pH 9.6) and allowed to attach to the bottom of microplate wells. It was found that approximately 10^7 bacteria were attached to the well walls (data not shown). *S. suis*-coated wells were then incubated with fibrinogen (400 ng), washed in PBS containing 0.5% gelatin and 0.05% (v/v) Tween 20, and further incubated with horseradish (HRP)-conjugated goat anti-fibrinogen antibody (1:1,000). After washing, 0.2 M sodium phosphate (4.86 ml), 0.1 M citric acid (5.15 ml), 30% H_2O_2 (10 μ l), and 1 mg tetramethylbenzidine was added to each well (30 min) and the absorbance at 450 nm (A_{450}) was recorded with a microplate reader. The amount of fibrinogen bound by *S. suis* was estimated from a standard curve in which increasing amounts of fibrinogen (ranging from 2 to 200 ng) were immobilized on the bottom of the wells was also created using the ELISA procedure described above. This assay, which was performed in triplicate, showed the ability of *S. suis* S735 to bind fibrinogen. The amounts of fibrinogen bound by *S. suis* S735 and AAH4 were estimated at 22.8 ± 3.8 ng and 17 ± 3.1 ng per 10^7 cells bound to microplate wells, respectively.

The ability of bacteria to form biofilms on host surfaces is critical to their virulence. While research on biofilms formed by animal pathogens is rather limited, biofilms are likely involved in many diseases, including pneumonia, endocarditis, and mastitis (3). In the present study, we showed that *S. suis* biofilm formation on a polystyrene surface was stimulated in a dose-dependent manner when fibrinogen, a 340-kDa glycoprotein found in human blood plasma (17), was added to the culture medium. The stimulation occurred at relevant *in vivo* concentrations since the *in vivo* concentration of fibrinogen in blood plasma is approximately 2.5 mg/ml. This phenomenon appeared to be highly specific since other mammalian proteins did not stimulate biofilm formation. To the best of our knowledge, this is the first report of fibrinogen-induced biofilm formation. The stimulation of bacterial biofilm formation by an exogenous mammalian protein has been previously reported. Shanks *et al.* (14) showed that heparin, a heterogeneous glycosaminoglycan, increased biofilm formation by several *Staphylococcus aureus* strains and suggested that it stimulates the formation of adhesion molecules that help *S. aureus* to better adhere to one

another in either a heparin-dependent (where heparin acts as a cross-bridge) or heparin-independent manner.

We showed that *S. suis* can bind fibrinogen to its surface, a property that may allow bacteria to attach to each other through fibrinogen-mediated cross-bridging. Interestingly, Cheung *et al.* (2) reported that fibrinogen can act as a bridging molecule in the adherence of *S. aureus* to cultured endothelial cells. Fibrinogen binding to streptococci also plays a significant role in enabling them to adhere to host surfaces and in protecting them from the host immune system, notably by preventing opsonophagocytosis (4, 13, 16). De Greeff *et al.* (5) reported that *S. suis* produces cell surface fibrinogen-binding proteins and showed, using a deficient mutant, that this property contributes to the virulence of *S. suis* in a piglet model (5). The 64-kDa protein receptor was also found to bind fibronectin (5). Fibrinogen may also contribute to biofilm formation by stimulating the expression of adhesion molecules that help *S. suis* cells better adhere to one another. A comparative proteome analysis of *S. aureus* biofilm and planktonic cells showed that biofilm cells express higher levels of protein associated with cell attachment and, in particular, fibrinogen-binding proteins (12).

2.1.4 Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC grant 194703-04). We thank Marie-Claude Jacques for her technical assistance.

2.1.5 References

1. Bouchara, J.P., G. Larcher, F. Joubaud, P. Penn, G. Tronchin, and D. Chabasse. 1993. Extracellular fibrinogenolytic enzyme of *Aspergillus fumigatus*: substrate-dependent

variations in the proteinase synthesis and characterization of the enzyme. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **7**: 81-91.

2. Cheung, A.L., M. Krishnan, E.A. Jaffe, and V.A. Fischetti. 1991. Fibrinogen acts as a bridging molecule in the adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured human endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **87**: 2236-2245.

3. Clutterbuck, A.L., E.J. Woods, D.C. Knottenbelt, P.D. Clegg, C.A. Cochrane, and S.L. Percival. 2007. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet. Microbiol.* **121**: 1-17.

4. Courtney, H.S., D.L. Hasty, and J.B. Dale. 2006. Anti-phagocytic mechanisms of *Streptococcus pyogenes*: binding of fibrinogen to M-related protein. *Mol. Microbiol.* **59**: 936-947.

5. De Greeff, A., H. Buys, R. Verhaar, J. Dijkstra, L. van Alphen, and H. Smith. 2002. Contribution of fibronectin-binding protein to pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect. Immun.* **70**: 1319-1325.

6. Donlan, R.M., and J.W. Costerton. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**: 167-193.

7. Dupas, D., M. Vignon, and C. Géraut. 1992. *Streptococcus suis* meningitis. A severe noncompensated occupational disease. *J. Occup. Med.* **34**: 1102-1105.

8. Grenier, D., L. Grignon, and M. Gottschalk. 2009. Characterisation of biofilm formation by a *Streptococcus suis* meningitis isolate. *Vet J.* **179**: 292-295

9. Higgins, R., and M. Gottschalk. 1999. Streptococcal diseases, p.563-578. *In* B.E.I. Straw, S. Allaire, W.L. Mangeling, D.J. Taylor (ed.), *Diseases of Swine*, 8th ed. Iowa University Press, Iowa.

10. **Huang, Y.T., L.J. Teng, S.W. Ho, and P.R. Hsueh.** 2005. *Streptococcus suis* infection. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **38**: 306-313.

11. **MacInnes, J.I., and R. Desrosiers.** 1999. Agents of the "suis-ide diseases" of swine: *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, and *Streptococcus suis*. *Can. J. Vet. Res.* **63**: 83-89.

12. **Resch, A., S. Leicht, M. Saric, L. Pasztor, A. Jakob, F. Götz, and A. Nordheim.** 2006. Comparative proteome analysis of *Staphylococcus aureus* biofilm and planktonic cells and correlation with transcriptome profiling. *Proteomics* **6**: 1867-1877.

13. **Schubert, A., K. Zakikhany, M. Schreiner, R. Frank, B. Spellerberg, B.J. Eikmanns, and D.J. Reinscheid.** 2002. A fibrinogen receptor from group B *Streptococcus* interacts with fibrinogen by repetitive units with novel ligand binding sites. *Mol. Microbiol.* **2**: 557-569.

14. **Shanks, R.M.Q., N.P. Donegan, M.L. Graber, S.E. Buckingham, M.E. Zegans, A.L. Cheung, and G.A. O'Toole.** 2005. Heparin stimulates *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Infect. Immun.* **73**: 4596-4606.

15. **Stanley, N.R., and B.A. Lazazzera.** 2004. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **52**: 917-924.

16. **Tenenbaum, T., C. Bloier, R. Adam, D.J. Reinscheid, and H. Schroten.** 2005. Adherence to and invasion of human brain microvascular endothelial cells are promoted by fibrinogen-binding protein FbsA of *Streptococcus agalactiae*. *Infect. Immun.* **73**: 4404-4409.

17. **Weisel, J.W.** 2005. Fibrinogen and fibrin. *Adv. Prot. Chem.* **70**: 247-255.

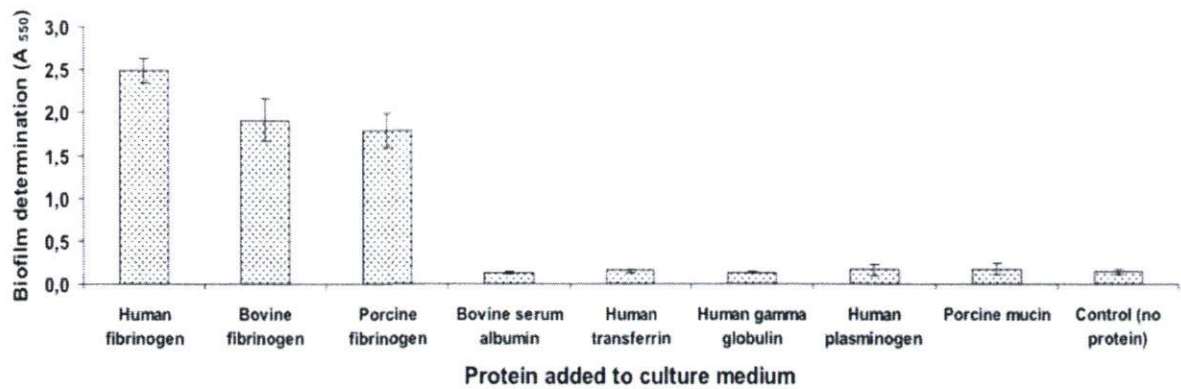


Figure 2-1: Effect of various mammalian proteins (5 mg/ml) added to the culture medium on biofilm formation by *S. suis* S735. Assays were run in triplicate, and the means \pm standard deviations of two independent experiments were calculated.

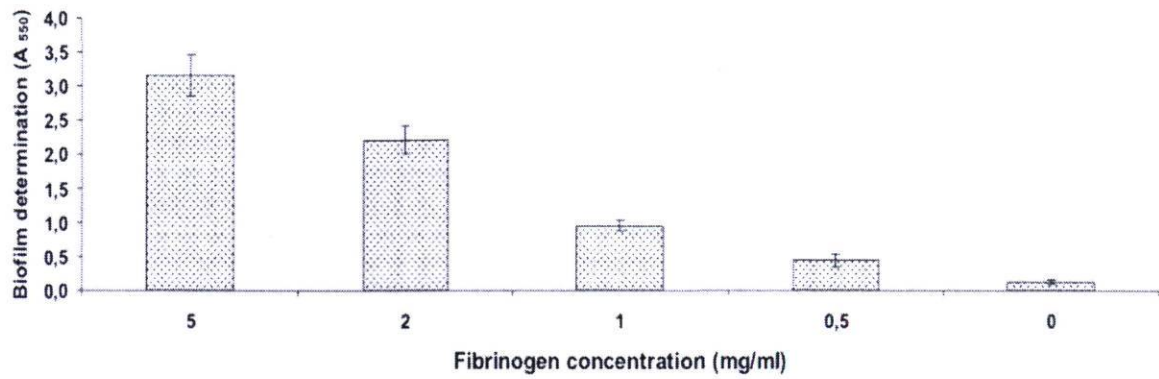


Figure 2-2: Effect of various concentrations of human fibrinogen added to the culture medium on biofilm formation by *S. suis* S735. Assays were run in triplicate, and the means \pm standard deviations of two independent experiments were calculated.

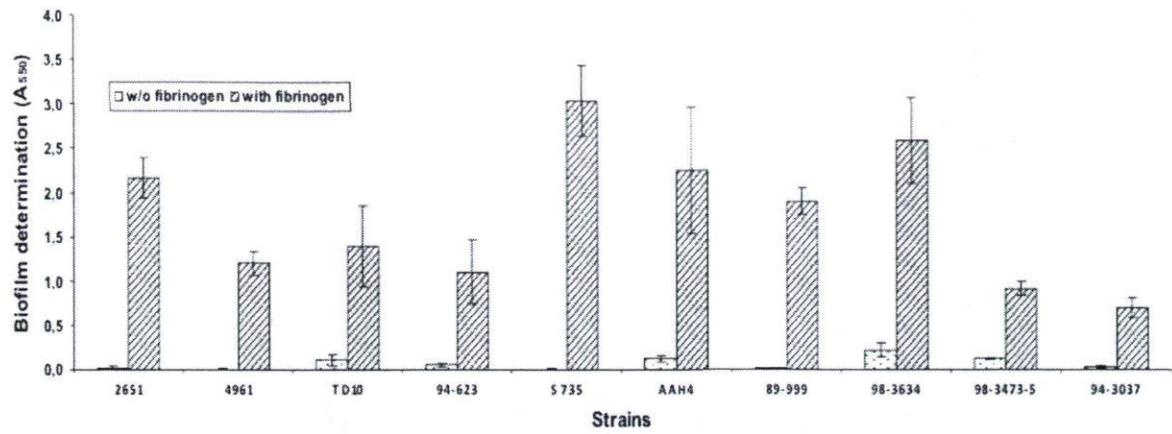


Figure 2-3: Effect of human fibrinogen on biofilm formation by various strains of *S. suis*. Assays were run in triplicate, and the means \pm standard deviations of two independent experiments were calculated.

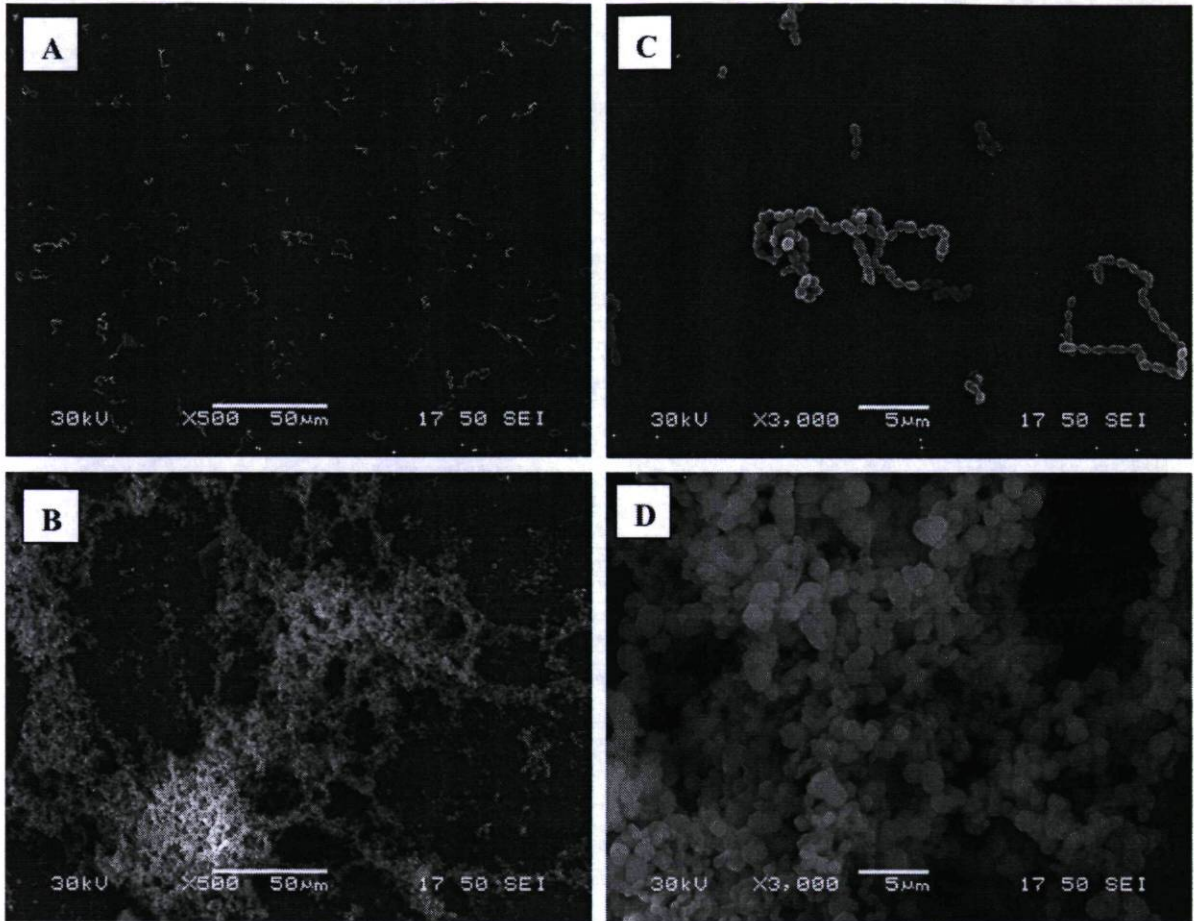


Figure 2-4: Scanning electron micrographs of *S. suis* S735 biofilms formed on plastic tissue culture coverslips following growth in the absence (A and C) and presence of 5 mg/ml human fibrinogen (B and D). Magnification: A and B, 500 X; C and D, 3000 X.

Table 2-1: Minimal inhibitory concentrations (MICs) and minimal bactericidal concentrations (MBCs) of penicillin G for planktonic- and biofilm-grown *S. suis* S735 and AAH4 cells. Values are representative of three independent experiments.

Strain	Growth	Penicillin G	
		MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)
S735	Planktonic	0.015	0.031
S735	Fibrinogen-induced biofilm	0.015	1.95
AAH4	Planktonic	0.007	1.95
AAH4	Fibrinogen-induced biofilm	0.007	15.6

2.2 Article 2: Pleiotropic effects of polysaccharide capsule loss on selected biological properties of *Streptococcus suis*

SHORT COMMUNICATION

Article publié en 2010 dans la revue Canadian Journal of Veterinary Research, sous la référence 74(1):65-70.

Shin-Ichi Tanabe¹, Laetitia Bonifait¹, Nahuel Fittipaldi², Louis Grignon¹, Marcelo Gottschalk^{2,3} and Daniel Grenier^{1,3*}

¹Groupe de Recherche en Écologie Buccale, Faculté de Médecine Dentaire, Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada;

²Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada; and

³Centre de Recherche en Infectiologie Porcine, Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies

Keywords: *Streptococcus suis*, capsule, biofilm, antibiotic, cytokine

* Corresponding author. Mailing address: Groupe de Recherche en Écologie Buccale, Faculté de Médecine Dentaire, Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada, G1K 7P4
Phone: (418) 656-7341. Fax: (418) 656-2861. E-mail: Daniel.Grenier@greb.ulaval.ca

2.2.1 Résumé

Dans la présente étude, un mutant non-capsulé de *Streptococcus suis* a été utilisé afin d'examiner les effets pléiotropiques résultant de la perte de la capsule. Le mutant déficient de *S. suis* a acquis un phénotype positif pour le biofilm, qui était associé avec une augmentation significative de l'hydrophobicité de surface. La liaison du fibrinogène et l'activité apparentée à celle de la chymotrypsine étaient diminuées chez le mutant non-capsulé. Il n'y avait pas de différence significative entre le mutant et le parent capsulé en ce qui a trait aux concentrations minimales inhibitrices de la pénicilline G, de l'ampicilline et de la tétracycline. Toutefois, alors que la souche capsulée était très résistante à l'action bactéricide de la pénicilline G et de l'ampicilline, le mutant non-capsulé était approximativement 60 fois plus sensible. Comparativement à la souche parentale, le mutant non-capsulé a induit une réponse inflammatoire beaucoup plus marquée sur les macrophages dérivés des monocytes, ce qui a entraîné une sécrétion augmentée du facteur nécrosant des tumeurs (TNF)- α , d'interleukine (IL)-1 β , IL-6 et IL-8. La capsule semble interférer avec des adhésines importantes ou des molécules hydrophobes qui sont impliquées dans la formation de biofilm, ainsi que des composantes de la paroi cellulaire capables de stimuler les cellules du système immunitaire.

2.2.2 Abstract

In this study, we used an unencapsulated *Streptococcus suis* mutant to investigate the pleiotropic effects resulting from capsule loss. The capsule deficient mutant of *S. suis* acquired a biofilm-positive phenotype, which was associated with a significantly increased cell surface hydrophobicity. Cell-associated fibrinogen-binding and chymotrypsin-like activities were decreased in the unencapsulated mutant. The mutant did not differ significantly from the encapsulated parent strain for minimal inhibitory concentrations to penicillin G, ampicillin, and tetracycline. However, while the encapsulated strain was highly resistant to the bactericidal action of penicillin G and ampicillin, the unencapsulated mutant was approximately 60 fold more sensitive. Compared to the parent strain, the unencapsulated mutant induced a much higher inflammatory response in monocyte-derived macrophages resulting in an increased secretion of TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-8. Capsule appears to hinder important adhesins or hydrophobic molecules that mediate biofilm formation as well as cell wall components capable of stimulating immune cells.

2.2.3 Introduction, results, discussion, conclusion

Streptococcus suis is an important swine pathogen worldwide, causing meningitis, septicaemia, arthritis and endocarditis (1). This bacterium can also affect humans being in close contact with sick or carrier pigs or with their derived-products (2). Although 35 serotypes are known, serotype 2 is most often associated with cases of infections in pigs and humans (1). In recent years, various potential virulence factors produced by *S. suis* have been described, including muramidase-released protein, extracellular protein factor, suilysin, adhesins, and capsule (3). Among the potential virulence determinants identified, the polysaccharide capsule appears to be critical for the pathogenicity of *S. suis*. Indeed, unencapsulated mutants were shown to be avirulent in mice and in two different pig models of infection (4, 5). Charland *et al.* (6) reported that an unencapsulated mutant of *S. suis* was more susceptible to phagocytosis by macrophages compared to the parent strain. The capsular material of *S. suis* serotype 2 contains five different sugars: rhamnose, galactose, glucose, N-acetylglucosamine, and N-acetyl neuraminic acid (sialic acid), the latter being the third most important in amounts (7). Sialic acid is well known as an antiphagocytic factor for many bacterial species through inhibition of the activation of the alternative complement pathway (8). For a bacterium, the presence of a capsule may both provide particular cell surface properties while interfering physically with other cell surface components. The aim of this study was to investigate the pleiotropic effects associated with capsule loss, on selected biological properties of *S. suis*.

S. suis S735, a reference virulent serotype 2 strain of European phenotype, and the unencapsulated mutant BD101 were routinely grown in Todd Hewitt broth (THB; BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MA, USA) at 37°C under aerobiosis. The mutant BD101 was constructed in a previous study and was impaired in capsule production as a result of the deletion of the cognate promoter of the *aro* operon resulting in abolishment of *aroA*, *aroK*, *pheA* and *orf10* expression (9). Mutant BD101 was devoid of capsular sialic acid and the absence of capsule was confirmed by electron microscopy (9). Although the exact explanation for the absence of capsule in the *aro* deficient mutant is still speculative,

it has been proposed that it may be related to abolishment of the expression of orf10. This gene is predicted to belong to the LytR_cpsA_psr family of transcriptional regulators; members of this family have been shown to act as positive regulators of capsule expression in other streptococci (10).

The culture broth medium used to investigate biofilm formation by *S. suis* S735 and the unencapsulated mutant BD101 contained 0.5% glucose, 2% peptone (Proteose Peptone No. 3, Difco, Detroit, MI, USA), 0.3% K₂HPO₄, 0.2% KH₂PO₄, 0.01% MgSO₄•7H₂O, 0.002% MnSO₄•6H₂O, and 0.5% NaCl. This medium contained sufficient aromatic amino acids required for growth of mutant BD101. Biofilm formation was measured in polystyrene microtiter plates and crystal violet staining as previously described (11). Assays were run in triplicate and the means ± standard deviations of two independent experiments were calculated. The structural architecture of the *S. suis* (S735, mutant BD101) biofilm was examined by scanning electron microscopy. *S. suis* was inoculated in 35 mm dishes (Nunc, Denmark) containing a 10.5 x 22 mm plastic coverslip (Thermanox®, Nunc). After a 24 h incubation, medium and free-floating bacteria were removed. The biofilms formed on each coverslip were incubated overnight in fixation buffer (4% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2), washed with 0.1 M cacodylate buffer (3 x 20 min) and post-fixed for 90 min at room temperature in 1% osmic acid containing 2 mM potassium ferrocyanide and 6% sucrose in cacodylate buffer. Samples were dehydrated through a graded series of ethanol (50, 70, 95, and 100%), critical point dried, gold sputtered, and examined using a JEOL JSM6360LV scanning electron microscope operating at 30 kV.

The relative cell surface hydrophobicity of *S. suis* S735 and the unencapsulated mutant BD101 was determined by measuring their absorption to n-hexadecane according to the procedure described by Rosenberg *et al.* (12). To compare lectin-binding activity, seven FITC (fluorescein isothiocyanate)-labeled lectins (E-Y Laboratories, San Mateo, CA) were used: Con A (*Conavalia ensiformis*, specific for mannose and glucose residues), DBA (*Dolichos biflorus*, specific for N-acetyl galactosamine residues), MPA (*Maclura pomifera*,

specific for N-acetyl galactosamine residues), PNA (*Arachis hypogaea*, specific for galactose residues), SBA (*Glycine max*, specific for N-acetyl galactosamine and galactose residues), UEA I (*Ulex europaeus*, specific for fucose residues), and WGA (*Triticum vulgare*, specific for N-acetyl glucosamine and sialic acid residues). Powdered lectins were dissolved, to a concentration of 1 mg/ml, in PBS and stored at -20°C until used. Bacterial cells were harvested from THB agar plates, washed in PBS and suspended in diluted lectin solutions (40 µg/ml) at an optical density of 0.5 at 660 nm. Following incubation at room temperature under darkness for 60 min, bacteria were washed three times in PBS and suspended in the initial volume. Cell bound lectins were quantified using a fluorometer with an excitation wavelength of 490 nm and an emission wavelength of 520 nm. The above assays were run in triplicate and the means ± standard deviations of two independent experiments were calculated.

The fibrinogen-binding activity of *S. suis* S735 and the unencapsulated mutant BD101 was quantified using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the procedure described by Bonifait *et al.* (13). Cell-associated chymotrypsin-like activity was determined as previously described using N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNa as substrate (14). Assays for fibrinogen-binding and chymotrypsin-like activities were run in triplicate and the means ± standard deviations of two independent experiments were calculated.

The minimal inhibitory concentrations (MIC) and minimal bactericidal concentrations (MBC) of planktonic cultures of *S. suis* S735 and the capsule deficient mutant BD101 to penicillin G, ampicillin, and tetracycline were determined using a microdilution procedure. Briefly, two-fold serial dilutions (5 000 – 0.6 ng/ml) of antibiotics were prepared in THB. The wells of a microtiter plate, each containing 100 µl of medium, were inoculated with 100 µl of an overnight culture of *S. suis* diluted in fresh THB to obtain an OD₆₆₀ of 0.2 (equivalent CFUs for S735 and BD101). The plate was then incubated at 37°C for 24 h. The MICs were the lowest concentrations of antibiotic for which no significant increase in OD₆₆₀ was noted following inoculation and incubation. To determine the MBCs, 10 µl of culture was recovered from wells showing no visible growth and spread on THB agar

plates. The MBCs were the lowest concentrations of antibiotic at which no colonies grew on THB plates. Three independent experiments were performed.

U937 cells (ATCC CRL-1593.2), a monoblastic leukemia cell line, were cultivated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere in RPMI-1640 medium (HyClone Laboratories, Logan, UT, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (RPMI-FBS) and 100 µg/ml of penicillin-streptomycin. Monocytes (2 x 10⁵ cells/ml) were incubated in RPMI-FBS containing 10 ng/ml of phorbol myristic acid (PMA) for 48 h to induce differentiation into adherent macrophage-like cells. Following the PMA treatment, the medium was replaced with fresh medium and the differentiated cells were incubated for an additional 24 h prior to use. Adherent monocyte-derived macrophages were washed and suspended in RPMI with 1% heat-inactivated FBS without antibiotics at a density of 1 x 10⁶ cells/ml and incubated in 6-well plates (2 x 10⁶ cells/well in 2 ml) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 2 h prior stimulation. *S. suis* cells (S735 and mutant BD101) were harvested by centrifugation at 11 000 g for 10 min and suspended in RPMI medium to a concentration of 1 x 10⁹ bacteria/ml, as determined using a Petroff-Hausser counting chamber. The bacterial suspensions were added to the monocyte-derived macrophages to obtain at multiplicity of infection (MOI) of 1, 10, 50, and 100. After a 24 h incubation, the culture medium supernatants were collected and stored at -20°C until used. Monocyte-derived macrophages were also stimulated with a cell wall fraction (10, 25, and 50 µg/ml) of *S. suis*, prepared as previously described (15). Commercial ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) were used to quantify interleukin-1β (IL-1β), tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-8 (IL-8) concentrations in the cell-free culture supernatants according to the manufacturer's protocols. The A₄₅₀ was read using a microplate reader with the wavelength correction set at 550 nm. The rated sensitivities of the commercial ELISA kits were 3.9 pg/ml for IL-1β, 15.6 pg/ml for TNF-α, 9.3 pg/ml for IL-6, and 31.2 pg/ml for IL-8. All stimulation assays were run in triplicate and the means ± standard deviations were calculated.

The effect of capsule loss on the capacity of *S. suis* to form biofilms was evaluated using a polystyrene microtiter plate assay. As shown in Figure 2-5 A, the parent strain S735 was unable to form biofilm whereas the unencapsulated mutant BD101 acquired the capacity to form a thick biofilm that stained with crystal violet. Biofilm formation was not related to a more pronounced growth of the capsule-deficient mutant since the growth of both strains was comparable, as evaluated by measuring the A_{660} . A scanning microscopic examination confirmed the results obtained with the microtiter plate assay (Figure 2-5 B). Individual bacteria and short chains of *S. suis* S735 were observed attached to the polystyrene surface but were rarely bound to each other. On the other hand, aggregates and microcolonies of the capsule deficient mutant (BD101) almost completely covered the surface of the plastic support. The capacity of the unencapsulated mutant BD101 to form a biofilm is in agreement with previous studies reporting that capsule inhibited the adherence of *S. suis* to epithelial (16) and endothelial cells (17). Interestingly, capsules produced by *Neisseria meningitidis* (18) and *Escherichia coli* (19) have also been reported to prevent biofilm formation. The inhibition of bacterial attachment to mammalian cells and of biofilm formation by the capsule of *S. suis* is likely related to the masking of adhesins and other structures, making them non-functional. Infections by such pathogens would thus require modulation of capsule production allowing transitions from highly encapsulated states where bacteria could resist host immune system to lower unencapsulated states as where bacteria could form biofilm and adhere to host cells.

The polysaccharide capsule of *S. suis* is likely to provide particular properties to bacterial cells. First, we showed that capsule loss resulted in a significant modification of the cell surface hydrophobicity. The hydrophobicity of the unencapsulated mutant was $90.7\% \pm 1.6$ whereas it was $11.2\% \pm 3.2$ for the parent strain (Table 2-2). This suggests that hydrophilic capsule hinders more-hydrophobic structures or components important for biofilm formation by *S. suis*. The possibility that hydrophobic interactions may be important for biofilm formation by *S. suis* is in agreement with the study of Yi *et al.* (20), who reported a direct correlation between biofilm formation by *Neisseria meningitidis* and cell surface hydrophobicity.

The cell surface of both *S. suis* S735 and the mutant BD101 was further characterized by investigating the binding of fluorescein-labeled lectins. Among the seven lectins tested, positive binding to *S. suis* S735 cell surface was observed with WGA and to a lesser extent with SBA and MPA (Table 2-2). The unencapsulated mutant showed a significant reduction (77%) in binding of WGA while it was only slightly affected for SBA and MPA binding. This decreased capacity of to bind WGA, a lectin specific for N-acetyl glucosamine and sialic acid residues, is consistent with the fact that sialic acid is a major constituent of the *S. suis* capsule.

The effect of capsule loss on two cell-associated properties, namely fibrinogen-binding activity and chymotrypsin-like activity, was then investigated. Using a fibrinogen-binding microplate assay, both the parental strain and the capsule deficient mutant were found to bind human fibrinogen on their surface (Table 2-2). The parent strain possessed a significantly higher fibrinogen-binding activity than the mutant BD101. Regarding the cell-associated chymotrypsin-like activity, the parent strain also showed a significantly higher activity compared to the unencapsulated mutant (Table 2-2). This suggests that capsule expression may help stabilize these cell surface activities.

Table 2-3 reports the MICs and MBCs to penicillin G, ampicillin, and tetracycline for *S. suis* S735 and the mutant BD101. Penicillin G and ampicillin were found to be much more effective than tetracycline on *S. suis* S735, as demonstrated by the low values of MIC. Compared to the parent strain, MIC values for the unencapsulated mutant were either not modified (ampicillin) or one dilution lower (penicillin G and tetracycline). The MBCs to all three antibiotics were found to be markedly decreased for the capsule deficient mutant. More particularly, MBCs to penicillin G and ampicillin were approximately 60-fold lower for the mutant BD101 compared to the parent strain. This may be related to the fact that internal concentration of antibiotics required to kill bacteria are more easily reached when the capsule is absent in *S. suis*. It is also possible that the capsule stabilizes the plasma membrane and protecting it from rupture and bacterial death.

The secretion of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-8 by monocyte-derived macrophages stimulated with whole cells of either *S. suis* S735 or the mutant BD101 is reported in Figure 2-6. For all four cytokines, stimulation of macrophages with the parental strain induced a dose-dependent increased secretion. In general, MOIs of 50 and 100 were necessary to induce a marked cytokine response. For all cytokines, the response induced by the mutant BD101 was significantly higher ($P < 0.01$) at MOIs of 50 and 100 compared to that induced by *S. suis* S735. More specifically, at an MOI of 100, the secretion of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-8 by monocyte-derived macrophages was increased 2-, 4-, 5-, and 2-fold, respectively, compared to the parent strain. A cell wall preparation of *S. suis* was also found to induce dose-dependent TNF- α , IL-1 β , IL-8 and to a lesser extent IL-6 responses in monocyte-derived macrophages (Figure 2-6). The above results suggest that the absence of capsule uncovers the components, namely the cell wall, that triggers the monocyte-derived macrophages. This is in agreement with the results of Graveline *et al.* (21), who showed that an unencapsulated mutant (B218) derived from a *S. suis* virulent field isolate induced significantly higher levels of TNF- α and IL-1 β in THP-1 human monocytic cell line. Although the biological significance of this observation is unclear, two consequences may be proposed. On the one hand, the capsule of *S. suis* may suppress the host immunological response, a critical step at the early step of infection to prevent the bacteria from growing following by severe septicaemia and death. On the other hand, the loss of capsule in *S. suis* may be associated with an exaggerate immunological response, induced by cell wall components, leading to uncontrolled inflammatory reactions. This phenomenon can increase the permeability of the blood brain barrier, of which microvascular endothelial cells are the main constituents. An increased permeability of the blood brain barrier facilitates the migration of bacteria and leukocytes, that may promote the development of an inflammatory exudate and a severe disease outcome.

In conclusion, the study showed that loss of capsule in *S. suis* is associated with several pleiotropic effects. Capsule appears to hinder important adhesins or hydrophobic molecules that mediate biofilm formation as well as cell wall components capable of stimulating immune cells. These observations suggest that future studies to better understand how the

capsule expression is regulated in vivo will contribute to a better knowledge to the pathogenesis of *S. suis*.

2.2.4 Acknowledgments

We wish to thank Marie-Pier Levasseur for her technical assistance. This study was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). All authors report no conflicts of interest related to their study. N. Fittipaldi is the holder of a NSERC postgraduate scholarship. S.-I. Tanabe is the holder of a fellowship from the Training Program in Applied Oral Health Research (Canadian Institutes of health Research).

2.2.5 References

1. Higgins R, Gottschalk M. Streptococcal Diseases. In: Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ, eds. Diseases of Swine, 9th edition. Iowa University Press, Iowa, 2005:769-783.
2. Huang YT, Teng LJ, Ho SW, Hsueh PR. *Streptococcus suis* infection. J Microbiol Immunol Infect 2005;38:306-313.
3. Gottschalk M, Segura M. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. Vet Microbiol 2000;76:259-272.
4. Charland N, Harel J, Kobisch M, Lacasse S, Gottschalk M. *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. Microbiology 1998;144:325-332.

5. Smith HE, Damman M, van der Velde J, Wagenaar F, Wisselink HJ, Stockhofe-Zurwieden N, Smits MA. Identification and characterization of the *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. *Infect Immun* 1999;67:1750-1756.
6. Charland N, Kobisch M, Martineau-Doizé B, Jacques M, Gottschalk M. Role of capsular sialic acid in virulence and resistance to phagocytosis of *Streptococcus suis* capsular type 2. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1996;14:195-203.
7. Elliot SD, Tai J. The type-specific polysaccharides of *Streptococcus suis*. *J Exp Med* 1978;148:1699-1704.
8. Edwards MS, Kasper DL, Jennings HJ, Baker CJ, Nicholson-Weller A. Capsular sialic acid prevents activation of the alternative complement pathway by type III, group B streptococci. *J Immunol* 1982;128:1278-1283.
9. Fittipaldi N, Harel J, D'amours B, Lacouture S, Kobisch M, Gottschalk M. Potential use of an unencapsulated and aromatic amino acid-auxotrophic *Streptococcus suis* mutant as a live attenuated vaccine in swine. *Vaccine* 2007;25:3524-3535.
10. Cieslewicz MJ, Kasper DL, Wang Y, Wessels MR. Functional analysis in type Ia group B *Streptococcus* of a cluster of genes involved in extracellular polysaccharide production by diverse species of streptococci. *J Biol Chem* 2001;276:139-146.
11. Grenier D, Grignon L, Gottschalk M. 2008. Characterisation of biofilm formation by a *Streptococcus suis* meningitis isolate. *Vet J* 2009; 179:292-5.
12. Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett* 1980;9:29-33.

13. Bonifait L, Grignon L, Grenier D. Fibrinogen induces biofilm formation by *Streptococcus suis* and enhances its antibiotic resistance. *Appl Environ Microbiol* 2008;74:4969-4972.
14. Jobin MC, Grenier D. Identification and characterization of four proteases produced by *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiol Lett* 2003;220:113-119.
15. Segura M, Stankova J, Gottschalk M. Heat-killed *Streptococcus suis* capsular type 2 strains stimulate tumor necrosis alpha and interleukin-6 production by murine macrophages. *Infect Immun* 1999;67:4646-4654.
16. Benga L, Goethe R, Rohde M, Valentin-Weigand P. Non-encapsulated strains reveal novel insights in invasion and survival of *Streptococcus suis* in epithelial cells. *Cell Microbiol* 2004;6:867-881.
17. Vanier G, Segura M, Friedl P, Lacouture S, Gottschalk M. Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* 2004;72:1441-1449.
18. Yi K, Rasmussen AW, Gudlavalleti SK, Stephens DS, Stojiljkovic I. Biofilm formation by *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 2004;72:6132-6138.
19. Schembri MA, Dalsgaard D, Klemm P. Capsule shields the function of short bacterial adhesins. *J Bacteriol* 2004;186:1249-1257.
20. Yi K, Rasmussen AW, Gudlavalleti SK, Stephens DS, Stojiljkovic I. Biofilm formation by *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 2004;72:6132-6138.

21. Graveline R, Segura M, Radzioch D, Gottschalk M. TLR2-dependent recognition of *Streptococcus suis* is modulated by the presence of capsular polysaccharide which modifies macrophage responsiveness. *Int Immunol* 2007;19:375-389.

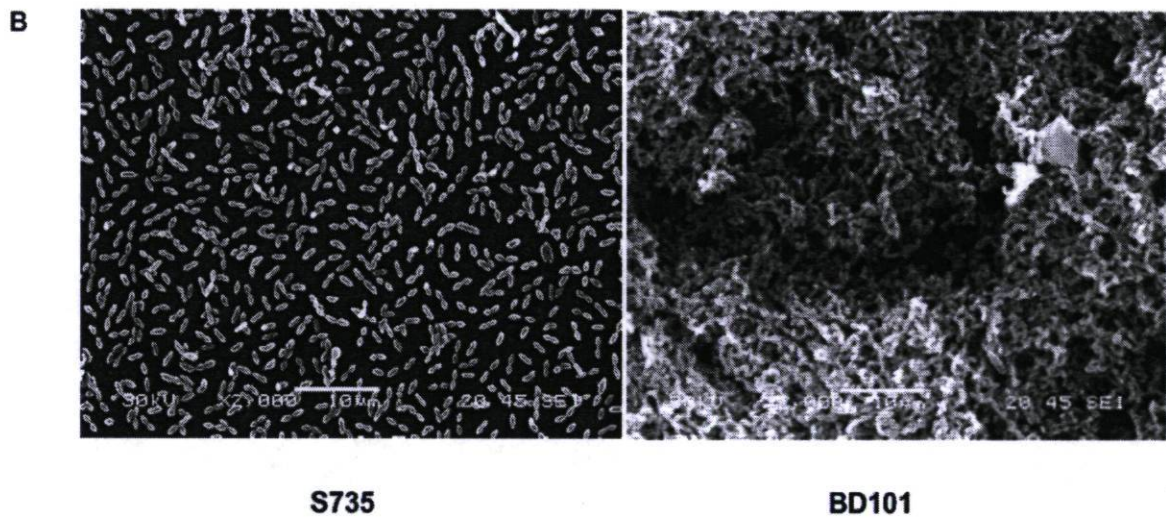
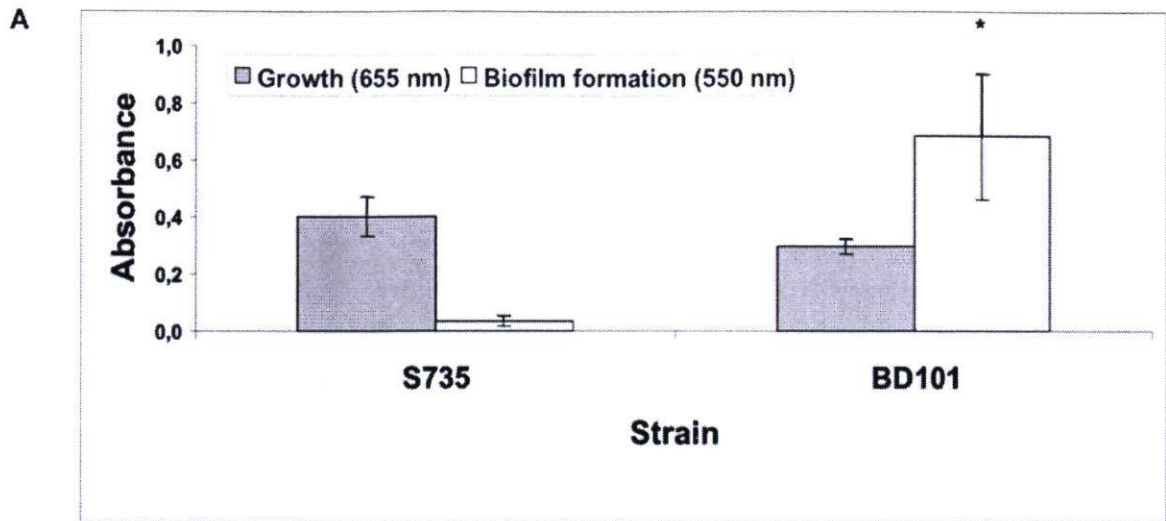


Figure 2-5: Biofilm formation by *S. suis* S735 and its unencapsulated mutant BD101. A, Crystal violet-stained biofilm following growth in polystyrene microplate; B, Scanning electron micrographs of *S. suis* biofilms formed after 24 h of growth. Asterisk indicates a significant difference ($P < 0.01$) with the Student's t test between *S. suis* S735 and its unencapsulated mutant BD101.

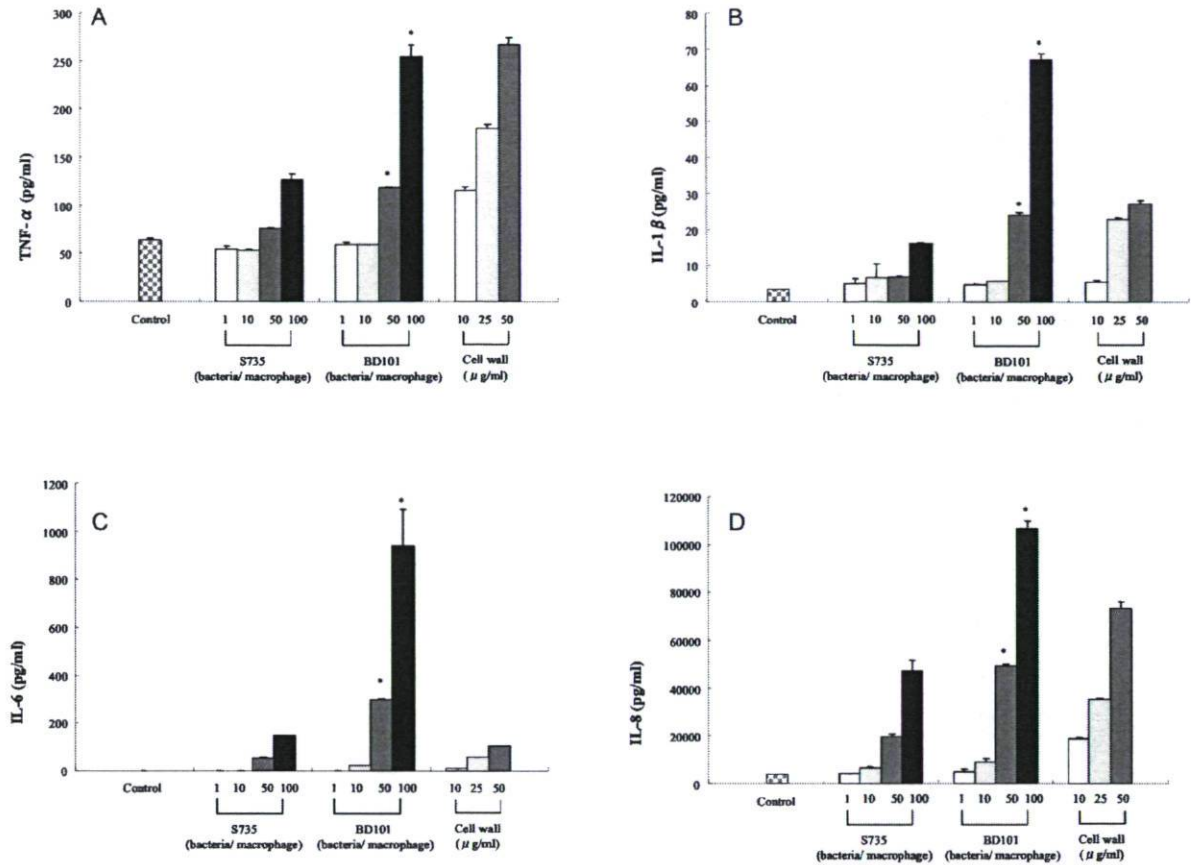


Figure 2-6: Secretion of TNF- α (panel A), IL-1 β (panel B), IL-6 (panel C), and IL-8 (panel D) by monocyte-derived macrophages infected with whole cells of *S. suis* S735 and its capsule deficient mutant BD101 at MOIs of 1, 10, 50 and 100. Monocyte-derived macrophages were also stimulated with a cell wall preparation (10, 25 and 50 μ g/ml) of *S. suis*. Asterisks indicate a significant difference ($P < 0.01$) with the Student's t test between *S. suis* S735 and its unencapsulated mutant BD101.

Table 2-2: Comparative analyses of *S. suis* S735 and its unencapsulated mutant BD101 for lectin-binding, fibrinogen-binding, and chymotrypsin-like activities.

Activity	<i>S. suis</i>		% change (parent vs mutant)
	S735	BD101	
Lectin-binding activity (RFU) ¹			
WGA	1 859 ± 54	431 ± 46	-77 * ²
SBA	743 ± 40	658 ± 45	-11
MPA	613 ± 19	572 ± 23	-7
Fibrinogen-binding activity (ng bound/well)	193 ± 10	136 ± 7	-30 *
Chymotrypsin-like activity (A ₄₀₅)	1.25 ± 0.07	0.86 ± 0.04	-31 *

¹RFU: Relative Fluorescence Units.

²Asterisks indicate a significant difference (P < 0.01) with the Student's t test between *S. suis* S735 and its unencapsulated mutant BD101.

Table 2-3: Minimal inhibitory and minimal bactericidal concentrations of *S. suis* S735 and its unencapsulated mutant BD101 to penicillin G, ampicillin, and tetracycline. Values are representative of three independent experiments.

Strain	Penicillin G (ng/ml)		Ampicillin (ng/ml)		Tetracycline (ng/ml)	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>S. suis</i> S735	20	1 250	20	2 500	312	> 5 000
<i>S. suis</i> BD101	10	20	20	40	156	1 250

2.3 Article 3: Cell surface characteristics of non-typeable isolates of *Streptococcus suis*

Article publié en 2010 dans la revue FEMS Microbiology Letters, sous la référence 311(2):160-6.

Laetitia Bonifait^{1,3}, Marcelo Gottschalk^{2,3} and Daniel Grenier^{1,3}

¹Groupe de Recherche en Écologie Buccale (GREB), Faculté de Médecine Dentaire, Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada;

²Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP), Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada; and

³Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT)

Running title: Characteristics of non-typeable *S. suis*

Keywords: *Streptococcus suis*, capsule, hydrophobicity, adherence, biofilm

* Corresponding author. Mailing address: Groupe de Recherche en Écologie Buccale, Faculté de Médecine Dentaire, Université Laval, 2420 de la Terrasse, Quebec City, Quebec, Canada, G1V 0A6

Phone: (418) 656-7341. Fax: (418) 656-2861. E-mail: Daniel.Grenier@greb.ulaval.ca

2.3.1 Résumé

Streptococcus suis est une bactérie responsable d'infections porcines, mais aussi un important agent de zoonose. Les souches de *S. suis* sont classées en fonction de leur sérotype et à ce jour 35 sérotypes différents ont été proposés. Le but de cette étude était de caractériser des souches dites non-sérotypables de *S. suis* en fonction de leurs propriétés de surface et de les comparer avec des souches de sérotype 2, le sérotype le plus fréquemment associé à des infections. Les sept souches non-sérotypables de *S. suis* isolées de porcs malades ont démontré une capacité d'adhésion à une surface de polystyrène recouverte de fibronectine plus importante que celle des souches de sérotype 2. Trois souches non-sérotypables ont également été testées pour leur capacité d'adhésion à des cellules endothéliales. Un plus grand nombre de bactéries des souches non-sérotypables ont adhéré aux cellules endothéliales comparativement aux souches de sérotype 2. Des analyses en microscopie électronique ont révélé une absence de capsule pour les sept souches de *S. suis* non-sérotypables, ce qui est conséquent avec une hydrophobicité de surface beaucoup plus importante que pour les souches de sérotype 2. Contrairement aux souches de sérotype 2, toutes les souches non-sérotypables de *S. suis* ont démontré une capacité à former un biofilm. En conclusion, les souches non-sérotypables de *S. suis* analysées dans cette étude possèdent des propriétés de surface différentes de celles des souches de sérotype 2.

2.3.2 Abstract

Streptococcus suis is a worldwide cause of various swine infections and is also an important agent of zoonosis. Strains of *S. suis* are classified according to their serotype and currently 35 serotypes are recognized. The aim of this study was to characterize non-typeable isolates of *S. suis* in regard to their cell surface properties and compare them to serotype 2 strains, the most frequently associated with infections. The seven non-typeable strains of *S. suis* isolated from infected pigs demonstrated a stronger capacity to adhere to a fibronectin-coated polystyrene surface than the serotype 2 isolates. Three non-typeable strains were also tested for their ability to adhere to endothelial cells and were found to attach in higher amounts compared to the serotype 2 isolates. Electron microscopy analysis revealed the absence of capsule in the seven non-typeable isolates, which correlated with a much higher cell surface hydrophobicity than that of serotype 2 isolates. All non-typeable isolates of *S. suis* also showed the capacity to form biofilm while serotype 2 isolates were unable. In conclusion, the non-typeable isolates of *S. suis* examined in this study possess surface properties different from those of serotype 2 isolates.

2.3.3 Introduction

Streptococcus suis is an important swine pathogen causing severe diseases such as meningitis, septicemia, arthritis, and endocarditis (Arends & Zanen, 1988, Gottschalk & Segura, 2000). This Gram positive bacterium can also affect humans in close contact with sick or carrier pigs or with their derived products (Gottschalk & Segura, 2000, Gottschalk, *et al.*, 2007). Many putative virulence factors produced by *S. suis* have been described, including the muramidase-released protein, the extracellular protein factor, the haemolysin (also known as suilysin), and the capsule (Baums & Valentin-Weigand, 2009). Recently, a cell surface subtilisin-like protease was identified as a virulence determinant since it was demonstrated that protease deficient mutants were significantly less virulent in animal models compared to parent strains (Bonifait, *et al.*, 2010, Hu, *et al.*, 2010).

Serotyping, a procedure that relies on the composition of capsular material, is an important step in the identification of *S. suis*. While initially classified in the early 1960s under the Lancefield scheme (S, R and RS), strains of *S. suis* have subsequently been classified into serotype 1 (group S), serotype 2 (group R) and serotype 1/2 (RS) (Gottschalk, *et al.*, 2001). Currently, there are 35 serotypes of *S. suis* (1 to 34 and 1/2) (Messier, *et al.*, 2008). All serotypes are not responsible for serious diseases and pathogenicity may vary within the same serotype. Serotype 2 is most frequently associated with pathology (Gottschalk, *et al.*, 2001), although other serotypes are also the source of many infections (Tian, *et al.*, 2004, Costa, *et al.*, 2005, Zhang, *et al.*, 2008). The existence of non-typeable isolates of *S. suis* has been reported (Marois, *et al.*, 2007, Wei, *et al.*, 2009). More specifically, Wei *et al.* (Wei, *et al.*, 2009) characterized 407 strains of *S. suis* isolated from diseased pigs in China and recovered 5.4% of non-typeable isolates while serotype 2 represented 43.2% of the isolates. In Canada, between 12 and 20% of strains recovered from diseased pigs are untypeable (Higgins & Gottschalk, 2001). In the present study, seven non-typeable strains of *S. suis* isolated from infected pigs were characterized in regard to their cell surface properties and compared to serotype 2 strains.

2.3.4 Material and methods

Bacteria and growth conditions. *S. suis* strains used in this study and their origins are listed in Table 2-4. Bacteria were routinely grown aerobically in Todd Hewitt Broth (THB, BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MA, USA) without agitation at 37°C. Bacteria used in the assays described below were harvested from overnight (16 – 18 h) cultures.

Adherence of *S. suis* to fibronectin-coated surfaces. Wells of a flat-bottomed microtitre plate (Nunc-Immuno® MaxiSorp; Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA) were filled with 100 µl of fibronectin (0.1 mg ml⁻¹; Chemicon International, Danvers, Massachusetts, USA) or bovine serum albumin as control (1 mg ml⁻¹; BSA; Fisher Scientific, Ottawa, ON, CANADA), and the plate was incubated overnight at room temperature. The protein solution was then removed by aspiration and 0.05% glutaraldehyde (100 µl) was subsequently added. After 45 min at room temperature, glutaraldehyde was removed and the wells were washed twice with distilled water. Cells of *S. suis* harvested from an overnight culture were suspended in 50 mmol l⁻¹ phosphate buffered saline (PBS; pH 7.2) to an optical density at 660 nm (OD₆₆₀) of 1 and 100 µl were added to each well. The plate was incubated at 37°C for 90 min under agitation. Unbound bacteria were then removed by aspiration and the wells were washed three times with PBS containing 0.01% Tween 20 to minimize non-specific hydrophobic interactions. Adherent bacteria in the wells were fixed with 100 µl of methanol for 15 min, extensively washed with distilled water and then stained with 0.04% crystal violet (100 µl) for 15 min. Wells were rinsed with distilled water and dried at 37°C for 2 h. After adding 100 µl of 95% ethanol to each well, the plate was shaken for 10 min to release the stain. The absorbance at 550 nm (A₅₅₀) was recorded using a microplate reader. Assays were run in triplicate and the means ± standard deviations (SD) of three independent experiments were calculated.

Adherence of *S. suis* to human brain microvascular endothelial cells. The human brain microvascular endothelial cell (HBMEC) line, which was produced from a brain biopsy of an adult female with epilepsy, was kindly provided by Dr. K. Kim (Johns Hopkins

University, School of Medicine, Baltimore, MD, USA). The cells, which were immortalized by transfection with simian virus 40 large T antigen, maintained their morphological and functional characteristics (Stins, *et al.*, 1997). HBMEC were grown in Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI; HyClone, Logan, UT, USA) supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS), 10% Nu-serum IV supplement (BD Biosciences, Bedford, MA, USA), and 50 mg ml⁻¹ of penicillin-streptomycin. Cultures were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Confluent endothelial cells were suspended by gentle trypsinization in a 0.05% trypsin-EDTA solution (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) for 5 min at 37°C, diluted in culture medium and centrifuged at 200 g for 5 min. Cells were resuspended in RPMI at a concentration of 1 x 10⁵ cell ml⁻¹ and 2 ml of the suspension were placed in wells of 6-well plates (Sarstedt, Newton, NC, USA) containing a coverslip treated for cell culture (Nunc Thermanox plastic coverslips, Nalge Nunc International). The plates were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere to allow cell adhesion. After 24 h, the culture medium was aspirated from wells in order to eliminate non-attached endothelial cells and replaced with fresh medium (2 ml) containing *S. suis* in RPMI medium at OD₆₆₀ of 0.02 (2 x 10⁷ bacteria ml⁻¹, as determined with a Petroff-Hausser counting chamber). This resulted in a multiplicity of infection (MOI) of 200. After an incubation of 18 h at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂, the culture medium was removed by aspiration and endothelial cells were fixed (24 h at 4°C) in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.3) containing 2.5% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde, and 2 mg ml⁻¹ CaCl₂. Samples were then dehydrated through a graded series of ethanol, critical point dried, gold sputtered, and examined using a JEOL JSM6360LV scanning electron microscope operating at 30 kV. An MTT (3-[4,5-diethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) test performed according to the manufacturer's protocol (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) revealed that HBMEC viability was not significantly affected following incubation with *S. suis* (data not shown).

Detection of capsule by transmission electron microscopy. Bacteria were grown overnight in THB medium, harvested by centrifugation, and washed once in PBS. The cells were fixed for 2 h at room temperature in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7) containing 5%

glutaraldehyde and 0.15% ruthenium red. They were then reacted with polycationic ferritin (1 mg ml⁻¹) and processed as described by Vanrobaeys *et al.* (Vanrobaeys, *et al.*, 1999). Thin sections were examined using a JEOL 1230 transmission electron microscope at an accelerating voltage of 60 kV.

Autoaggregation assay. *S. suis* isolates were examined for their ability to autoaggregate according to the protocol of Basson *et al.* (Basson, *et al.*, 2008). Bacteria were grown overnight in THB medium, washed and resuspended in sterile distilled water to an OD₆₆₀ of 0.3. The degree of autoaggregation of all isolates was determined using the equation: % autoaggregation = ((OD₆₆₀ at T₀ - OD₆₆₀ at T_{60 min}) / OD₆₆₀ at T₀) x 100). OD₆₆₀ was recorded following a low speed centrifugation at 400 g for 2 min. Assays were run in triplicate and the means ± SD of three independent experiments were calculated.

Cell surface hydrophobicity. The relative surface hydrophobicity of *S. suis* cells was determined by measuring their absorption to n-hexadecane according to the procedure described by Rosenberg *et al.* (Rosenberg, *et al.*, 1980). Assays were run in triplicate and the means ± SD of three independent experiments were calculated.

Proteolytic activities. The subtilisin-like and dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) activities of *S. suis* cells were measured using the chromogenic substrates succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide (*p*Na) (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada) and Gly-Pro-*p*Na (Sigma-Aldrich Canada Ltd.), respectively. For both proteolytic assays, 100 µl of a cell suspension at OD₆₆₀ = 2 (in 50 mM Tris-HCl, pH 8, containing 5 mM CaCl₂) were added to 20 µl of substrate (2 mg/ml in 50% dimethyl sulfoxide), and the mixtures were incubated at 37°C for 4 h. The amount of *p*-Na released was determined visually by the apparition of a yellow color.

Biofilm formation. The culture broth medium used to investigate biofilm formation by *S. suis* contained 0.5% glucose, 2% peptone (Proteose Peptone No. 3, Difco, Detroit, MI, USA), 0.3% K₂HPO₄, 0.2% KH₂PO₄, 0.01% MgSO₄•7H₂O, 0.002% MnSO₄•6H₂O, and

0.5% NaCl. Biofilm formation was measured in 96-well polystyrene microplates (Nunc-Immuno® MaxiSorp; Nalge Nunc International) and crystal violet staining as previously described (Grenier, *et al.*, 2009). Assays were run in triplicate and the means \pm SD of two independent experiments were calculated.

2.3.5 Results

The adhesion property of thirteen *S. suis* strains (six of serotype 2 and seven non-typeable) to fibronectin immobilized onto polystyrene plate wells was investigated. The results presented in Table 2-5 indicate that none of the *S. suis* strains could adhere to bovine serum albumin, which was used as a control protein. However, the seven non-typeable isolates of *S. suis* (1078212, 1079277, 1097925, 1185293, 1148795, 1077009, 1079506) showed a marked capacity to adhere to the fibronectin-coated surface. Under the conditions used in our study, all strains of *S. suis* serotype 2 attached poorly to the fibronectin-coated surface. The adherence properties of three non-typeable strains of *S. suis* was further investigated by evaluating their attachment to brain microvascular endothelial cells. As shown in Figure 2-7 (C and D), when endothelial cell cultures were infected with non-typeable isolates 1079277 and 1078212, bacteria formed microcolonies on and around the endothelial cells. When endothelial cells were infected with *S. suis* S735 serotype 2, only isolated bacteria and small chains were visualized (Fig. 2-7B). Additional serotype 2 strains (90-1330, 99-1539B, 89-4223, 89-999, 31533) were also found to adhere markedly less to endothelial cells when compared to non-typeable isolates (data not shown).

S. suis strains were analyzed by transmission electron microscopy and ruthenium red staining for the presence of a polysaccharide capsule. Figures 2.8C to 2.8I shows that non-typeable *S. suis* 1079277, 1078212, 1185293 and 1148795 did not express a dense capsule. The three others non-typeable strain of *S. suis* (1097925, 1077009, 1079506) was also devoid of capsule (data not shown). By contrast, *S. suis* S735 (Figure 2-8A and 2-8B) as well as two other serotype 2 strains tested (data not shown) possessed a thick and dense

capsule. We then evaluated whether capsule expression alters the cell surface hydrophobicity of *S. suis*. As shown in Table 2-5, non-typeable *S. suis* 1079277, 1097925, 1078212, 1185293, 1148795, 1077009 and 1079506 showed a high percentage of cell surface hydrophobicity ($\geq 52\%$). On the contrary, the hydrophobicity of all *S. suis* serotype 2 strains was less than 29%. In view of the above results, we investigated the capacity of autoaggregation of *S. suis* strains. Table 2-5 shows that non-typeable isolates were able to autoaggregate to various extents, while the serotype 2 strains could not.

All tested *S. suis* strains possessed cell-associated DPP IV activity. However, only six strains of *S. suis* (S735, 1078212, 1079277, 1097925, 1185293 and 1148795) showed subtilisin-like protease activity after 4 h of incubation. Extending the incubation to 24 h did not modify the result.

Lastly, we compared biofilm formation by non-typeable and serotype 2 strains of *S. suis*. Figure 2-9 shows that non-typeable isolates had the capacity to form a dense biofilm into wells of the polystyrene plate while serotype 2 strains had not such property. Only slight variations were observed regarding growth capacity of all *S. suis* strains (data not shown).

2.3.6 Discussion

S. suis is a Gram positive cocci that possesses cell wall antigenic determinants related to Lancefield group D (Facklam, 2002). Based on capsular composition, there are 35 serotypes currently described for *S. suis* species (Gottschalk & Segura, 2000, Messier, *et al.*, 2008). Serotyping is an important step in the routine diagnostic procedure for *S. suis* infections. Different procedures have been described, but most laboratories use the coagglutination technique (Higgins & Gottschalk, 2001, Costa, *et al.*, 2005). Although the incidence of non-typeable isolates is in general low, their isolation is reported in the literature (Higgins & Gottschalk, 2000, Wei, *et al.*, 2009). Since very few data are available

regarding the properties of non-typeable pathogenic *S. suis*, we compared seven non-typeable isolates to serotype 2 isolates in terms of their cell surface characteristics.

The adherence of *S. suis* to host cells and tissue proteins is a critical factor that contributes to infections. Esgleas *et al.* (Esgleas, *et al.*, 2008) have previously reported the expression by *S. suis* of a cell surface α -enolase, which possesses the capacity to bind soluble fibronectin. Other studies demonstrated the ability of *S. suis* to adhere to porcine brain microvascular endothelial cells (Charland, *et al.*, 1998, Vanier, *et al.*, 2004, Vanier, *et al.*, 2009). In this study, we showed that the seven non-typeable strains of *S. suis* had a stronger capacity to adhere to a fibronectin-coated surface and to endothelial cells than serotype 2 strains. These increased adherence properties of non-typeable strains correlated with the absence of capsule, as demonstrated by transmission electron microscopy. These data are in agreement with Benga *et al.* (Benga, *et al.*, 2004, Benga, *et al.*, 2008), who suggested that the capsule in *S. suis* may hide adhesins or receptors, involved in adherence to epithelial cells. Further studies should investigate whether the gene(s) involved in capsule production is absent or not expressed in non-typeable isolates.

We also showed that the seven non-typeable strains examined, devoid of capsule, had a much higher cell surface hydrophobicity than serotype 2 strains. This suggests that cell surface hydrophobicity may modulate the adherence properties of non-typeable strains. We also found that non-typeable strains can form biofilm, supporting a relationship with the high percentage of hydrophobicity and the lack of capsule. Therefore, hydrophilic capsule may hinder hydrophobic structures or components important for biofilm formation by *S. suis*. These results are in agreement with a recent study showing that a *S. suis* serotype 2 mutant impaired in capsule expression acquired a biofilm-positive phenotype (Tanabe, *et al.*, 2009). Although the exact role of biofilm formation in *S. suis* infections is still not known, such a property may allow bacteria to become persistent colonizers, to resist clearance by the host immune system, to enhance their resistance to antibiotics and to exchange genetic materials, as previously reported for other pathogenic microorganisms (Donlan & Costerton, 2002). Regulation of capsule expression, which influences biofilm

formation, by environmental conditions may modulate virulence of *S. suis* and deserves to be investigated.

All *S. suis* strains tested possessed DDP IV activity. By contrast, not all strains showed subtilisin-like activity. No correlation could be established between the presence of this activity with the serotype 2 or non-typeable strains. Additional studies are required to determine whether the absence of activity is related to the fact that the gene is not expressed in our in vitro conditions or it is absent from the genome.

In conclusion, we showed that the seven non-typeable isolates of *S. suis* evaluated in this study were able to bind to fibronectin, to attach to endothelial cells and to form biofilm significantly more than serotype 2 strains. In addition, a relationship was demonstrated between the absence of capsule and the incapacity to serotype *S. suis* isolates.

2.3.7 Acknowledgments

We are grateful to K. Kim (Johns Hopkins University School of Medicine) for providing the HBMEC. We wish to thank Sonia Lacouture, Louis Grignon and Richard Janvier for their technical assistance. This study was supported by the Fond Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). All authors report no conflicts of interest related to their study.

2.3.8 References

Arends JP & Zanen HC (1988) Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. Rev Infect Dis 10: 131-137.

- Basson A, Flemming LA & Chenia HY (2008) Evaluation of adherence, hydrophobicity, aggregation, and biofilm development of *Flavobacterium johnsoniae*-like isolates. *Microb Ecol* 55: 1-14.
- Baums CG & Valentin-Weigand P (2009) Surface-associated and secreted factors of *Streptococcus suis* in epidemiology, pathogenesis and vaccine development. *Anim Health Res Rev* 10: 65-83.
- Benga L, Goethe R, Rohde M & Valentin-Weigand P (2004) Non-encapsulated strains reveal novel insights in invasion and survival of *Streptococcus suis* in epithelial cells. *Cell Microbiol* 6: 867-881.
- Benga L, Fulde M, Neis C, Goethe R & Valentin-Weigand P (2008) Polysaccharide capsule and suilysin contribute to extracellular survival of *Streptococcus suis* co-cultivated with primary porcine phagocytes. *Vet Microbiol* 132: 211-219.
- Bonifait L, de la Cruz Dominguez-Punaro M, Vaillancourt K, *et al.* (2010) The cell envelope subtilisin-like proteinase is a virulence determinant for *Streptococcus suis*. *BMC Microbiol* 10: 42.
- Charland N, Harel J, Kobisch M, Lacasse S & Gottschalk M (1998) *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology* 144 (Pt 2): 325-332.
- Costa AT, Lobato FC, Abreu VL, Assis RA, Reis R & Uzal FA (2005) Serotyping and evaluation of the virulence in mice of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 47: 113-115.
- Donlan RM & Costerton JW (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15: 167-193.
- Esgleas M, Li Y, Hancock MA, Harel J, Dubreuil JD & Gottschalk M (2008) Isolation and characterization of alpha-enolase, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus suis*. *Microbiology* 154: 2668-2679.
- Facklam R (2002) What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev* 15: 613-630.
- Gottschalk M & Segura M (2000) The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet Microbiol* 76: 259-272.

- Gottschalk M, Kobisch M & Berthelot-Herault F (2001) L'infection à *Streptococcus suis* chez le porc: revue générale. Journées Rech. Porcine en France 33: 269-276.
- Gottschalk M, Segura M & Xu J (2007) *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. Anim Health Res Rev 8: 29-45.
- Grenier D, Grignon L & Gottschalk M (2009) Characterisation of biofilm formation by a *Streptococcus suis* meningitis isolate. Vet J 179: 292-295.
- Higgins R & Gottschalk M (2000) Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in 1999. Can Vet J 41: 414.
- Higgins R & Gottschalk M (2001) Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in 2000. Can Vet J 42: 223.
- Hu Q, Liu P, Yu Z, *et al.* (2010) Identification of a cell wall-associated subtilisin-like serine protease involved in the pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. Microb Pathog 48: 103-109.
- Marois C, Le Devendec L, Gottschalk M & Kobisch M (2007) Detection and molecular typing of *Streptococcus suis* in tonsils from live pigs in France. Can J Vet Res 71: 14-22.
- Messier S, Lacouture S & Gottschalk M (2008) Distribution of *Streptococcus suis* capsular types from 2001 to 2007. Can Vet J 49: 461-462.
- Rosenberg M, Gutnick D & Rosenberg E (1980) Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. FEMS Microbiol Lett 9: 29-33.
- Stins MF, Prasadarao NV, Zhou J, Arditi M & Kim KS (1997) Bovine brain microvascular endothelial cells transfected with SV40-large T antigen: development of an immortalized cell line to study pathophysiology of CNS disease. In Vitro Cell Dev Biol Anim 33: 243-247.
- Tanabe SI, Bonifait L, Fittipaldi N, Grignon L, Gottschalk M & Grenier D (2009) Pleiotropic effects of polysaccharide capsule loss on selected biological properties of *Streptococcus suis*. Can J Vet Res.

- Tian Y, Aarestrup FM & Lu CP (2004) Characterization of *Streptococcus suis* serotype 7 isolates from diseased pigs in Denmark. *Vet Microbiol* 103: 55-62.
- Vanier G, Segura M, Friedl P, Lacouture S & Gottschalk M (2004) Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* 72: 1441-1449.
- Vanier G, Fittipaldi N, Slater JD, *et al.* (2009) New putative virulence factors of *Streptococcus suis* involved in invasion of porcine brain microvascular endothelial cells. *Microb Pathog* 46: 13-20.
- Vanrobaeys M, De Herdt P, Charlier G, Ducatelle R & Haesebrouck F (1999) Ultrastructure of surface components of *Streptococcus gallolyticus* (*S. bovis*) strains of differing virulence isolated from pigeons. *Microbiology* 145 (Pt 2): 335-342.
- Wei Z, Li R, Zhang A, *et al.* (2009) Characterization of *Streptococcus suis* isolates from the diseased pigs in China between 2003 and 2007. *Vet Microbiol* 137: 196-201.
- Zhang C, Ning Y, Zhang Z, Song L, Qiu H & Gao H (2008) In vitro antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* strains isolated from clinically healthy sows in China. *Vet Microbiol* 131: 386-392.

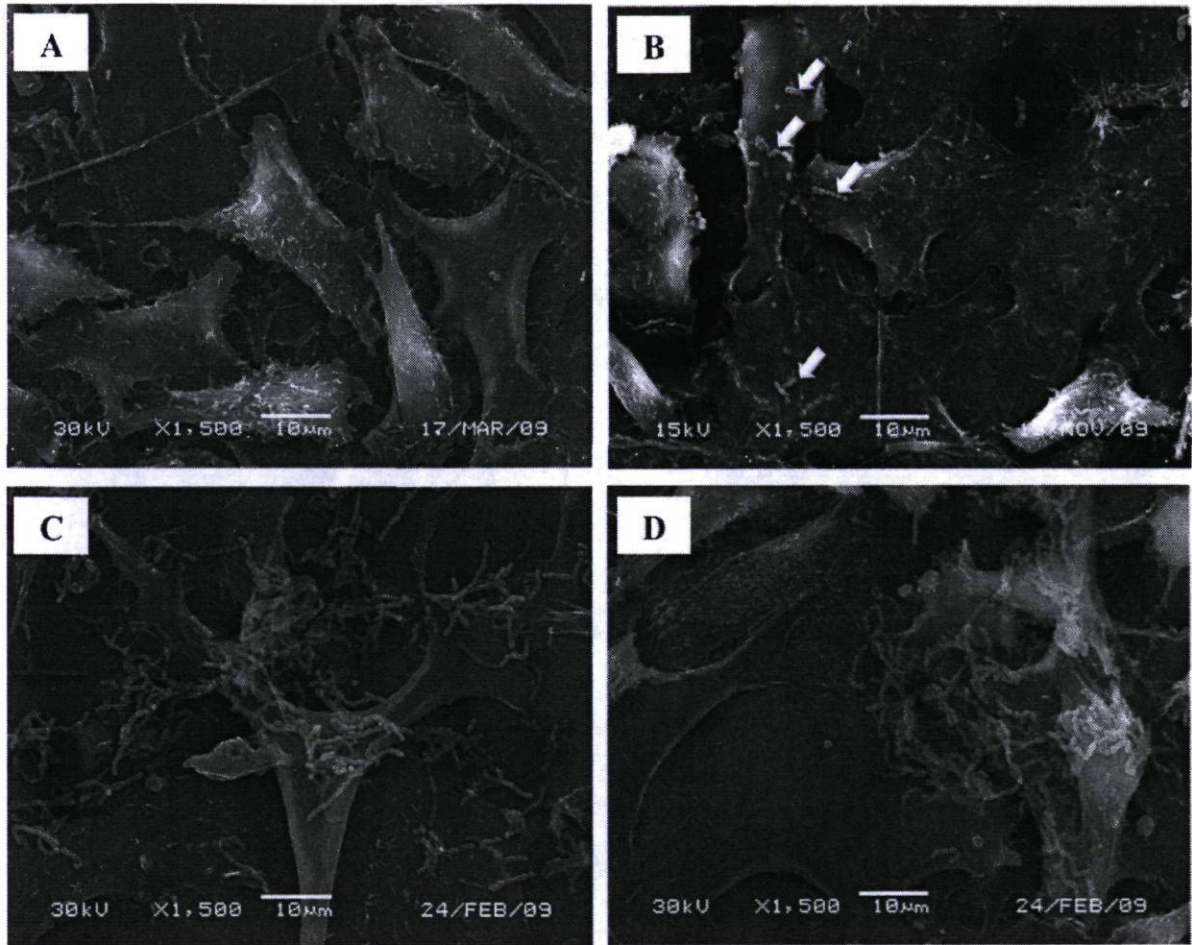


Figure 2-7: Scanning electron micrographs of human brain microvascular endothelial cells (HBMEC) infected with non-typeable (1078212, 1079277) and serotype 2 (S735) strains of *S. suis*. A, control HBMEC without bacteria; B, HBMEC + *S. suis* S735 (arrows indicate adhered bacteria); C, HBMEC + *S. suis* 1079277; D, HBMEC + *S. suis* 1078212. Magnification of 1 500X.

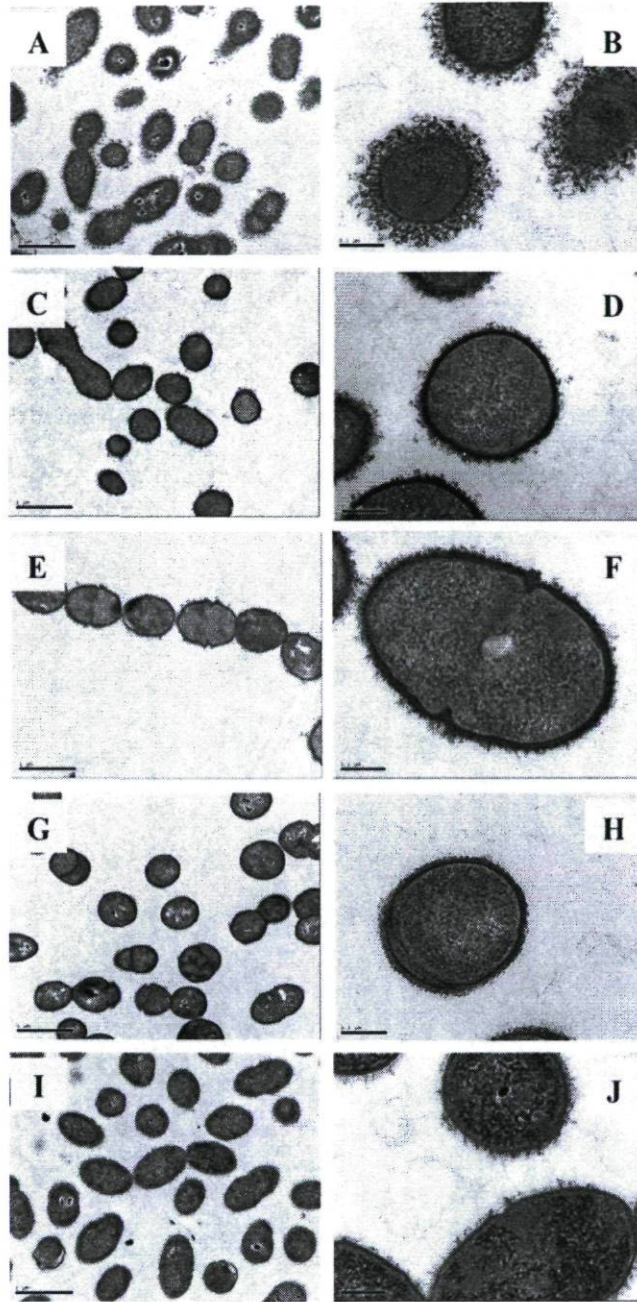


Figure 2-8: Visualization of *S. suis* capsule by transmission electron microscopy following ruthenium red staining. A and B, *S. suis* S735 (serotype 2); C and D, *S. suis* 1079277 (non-typeable); E and F, *S. suis* 1078212 (non-typeable); G and H, *S. suis* 1185293 (non-typeable); I and J, *S. suis* 1148795 (non-typeable). Magnification of 20 000X (A, C, E, G, I) and 80 000X (B, D, F, H, J).

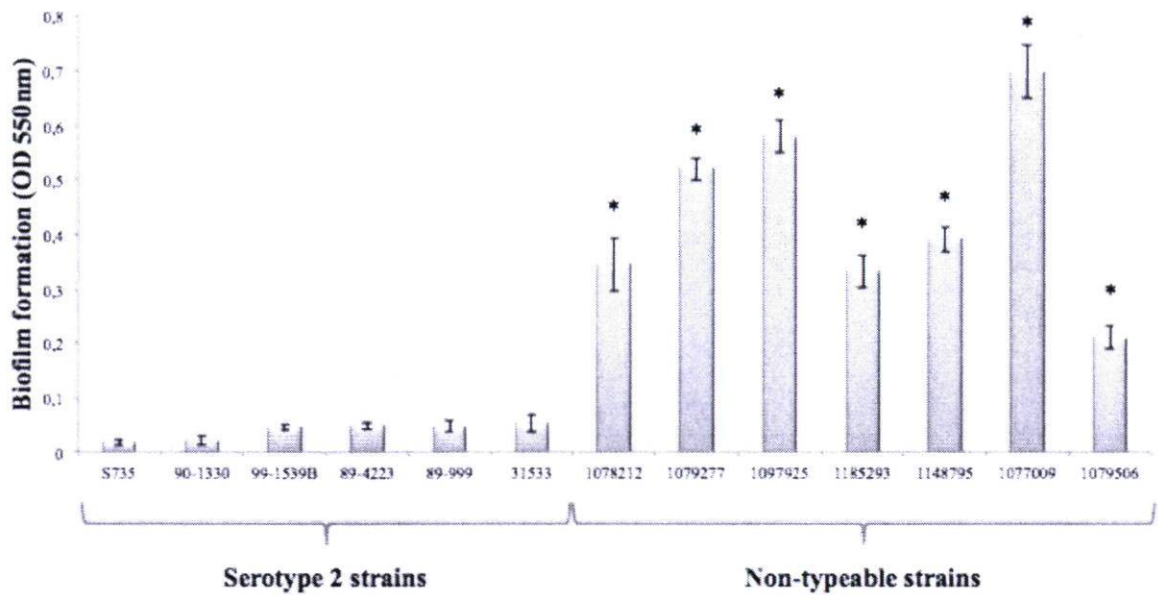


Figure 2-9: Biofilm formation by non-typeable (1079277, 1097925, 1078212, 1185293, 1148795, 1077009, 1079506) and serotype 2 (S735, 90-1330, 99-1539B, 89-4223, 89-999, 31533) strains of *S. suis*. Bacteria were grown in 96-well polystyrene microplate and biofilms were stained with crystal violet. The means \pm SD of three independent experiments are presented. *, significantly different from all serotype 2 strains at $P < 0.01$ using a Student's t-test.

Table 2-4: Strains of *S. suis* used in this study.

Strain	Serotype	Origin (isolation site)	Geographic origin
S735	2	Diseased pig (brain)	Europe
90-1330	2	Healthy carrier pig	Canada
99-1539B	2	Diseased pig (endocardium)	Canada
89-4223	2	Healthy carrier pig	Canada
89-999	2	Diseased pig (liver)	Canada
31533	2	Diseased pig (brain)	Europe
1078212	NT*	Diseased pig (pericardium)	Canada
1079277	NT	Diseased pig (lung)	Canada
1097925	NT	Diseased pig (brain)	Canada
1185293	NT	Diseased bovine (bovine milk)	Canada
1148795	NT	Diseased pig (kidney)	Canada
1077009	NT	Diseased pig (endocardium)	Canada
1079506	NT	Diseased pig (brain)	Canada

*NT: Non-typeable

Table 2-5: Autoaggregation, cell surface hydrophobicity, and adherence to protein-coated polystyrene surfaces of non-typeable (1079277, 1097925, 1078212, 1185293, 1148795, 1077009, 1079506) and serotype 2 (S735, 90-1330, 99-1539B, 89-4223, 89-999, 31533) strains of *S. suis*. Assays were run in triplicate and the means \pm SD of three independent experiments were calculated for % autoaggregation and % hydrophobicity.

Strain	% autoaggregation	% hydrophobicity	Adherence (OD 550 nm)			Proteolytic activities	
			Bovine serum albumin	Fibronectin	DPP IV	Subtilisin-like protease	
S735	2 \pm 0	4 \pm 2	0.003 \pm 0.005	0.003 \pm 0.004	+	+	
90-1330	4 \pm 0	17 \pm 6	0.009 \pm 0.005	0.003 \pm 0.012	+	-	
99-1539B	9 \pm 1	0 \pm 0	0.004 \pm 0.010	0.007 \pm 0.013	+	-	
89-4223	9 \pm 1	29 \pm 1	0.014 \pm 0.005	0.022 \pm 0.013	+	-	
89-999	7 \pm 1	20 \pm 6	0.003 \pm 0.004	0.010 \pm 0.006	+	-	
31533	12 \pm 4	5 \pm 2	0.015 \pm 0.002	0.026 \pm 0.009	+	-	
1078212	60 \pm 12*	87 \pm 2*	0.015 \pm 0.006	0.557 \pm 0.06*	+	+	
1079277	25 \pm 1*	87 \pm 2*	0.015 \pm 0.008	0.547 \pm 0.04*	+	+	
1097925	45 \pm 6*	80 \pm 6*	0.009 \pm 0.001	0.347 \pm 0.06*	+	+	
1185293	55 \pm 13*	93 \pm 2*	0.04 \pm 0.008	0.172 \pm 0.01*	+	+	
1148795	24 \pm 2*	52 \pm 7*	0.028 \pm 0.007	0.113 \pm 0.03*	+	+	
1077009	37 \pm 0*	69 \pm 4*	0.07 \pm 0.002	0.137 \pm 0.03*	+	-	
1079506	40 \pm 11*	68 \pm 6*	0.028 \pm 0.006	0.165 \pm 0.03*	+	-	

*, significantly different from all serotype 2 strains at $P < 0.01$ using a Student's t-test.

+, presence of a yellow color indicating degradation of substrate ; -, absence of a yellow color.

CHAPITRE 3: CARACTÉRISATIONS BIOCHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DE LA PSEUDO-SUBTILISINE DE *S. suis*

3.1 Article 4: The cell envelope subtilisin-like proteinase is a virulence determinant for *Streptococcus suis*

Article publié en 2010 dans la revue BioMed Central Microbiology, sous la référence 10:10:42.

Laetitia Bonifait¹, Maria de la Cruz Dominguez-Punaro², Katy Vaillancourt¹, Christian Bart¹, Josh Slater³, Michel Frenette¹, Marcelo Gottschalk², and Daniel Grenier^{1*}

¹Groupe de Recherche en Écologie Buccale, Faculté de Médecine Dentaire, Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada;

²Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada; and

³The Royal Veterinary College, Hatfield, United Kingdom

* Corresponding author. Mailing address: Groupe de Recherche en Écologie Buccale, Faculté de Médecine Dentaire, Université Laval, 2420 Rue de la Terrasse, Quebec City, Quebec, Canada, G1V OA6

Phone: (418) 656-7341. Fax: (418) 656-2861. E-mail: Daniel.Grenier@greb.ulaval.ca

3.1.1 Résumé

Introduction: *Streptococcus suis* est un important pathogène du porc et également un agent de zoonose responsable de septicémies, de méningites et d'endocardites chez l'homme. Il a récemment été suggéré que les protéases produites par *S. suis* (sérotypage 2) soient des facteurs de virulence potentiels pour la bactérie. Dans la présente étude, nous avons criblé une banque de mutants de *S. suis* créée par l'insertion du transposon Tn917 dans le but d'isoler un mutant déficient pour une protéase associée à la surface cellulaire. Nous avons caractérisé le gène et évalué le potentiel de la protéase comme facteur de virulence.

Résultats: Deux mutants (G6G et M3G) possédant une seule insertion du transposon Tn917 ont été isolés. Le gène affecté code pour une protéine (SSU0757) ayant un haut pourcentage d'identité avec la PrtS de *Streptococcus thermophilus* (95.9%) et, dans une moindre mesure, avec la CspA de *Streptococcus agalactiae* (49.5%), deux sérines protéases présentes à la surface des cellules. La protéine SSU0757 possède une masse moléculaire calculée de 169.6 kDa et contient la triade catalytique caractéristique de la famille des subtilisines protéases: motif I (Asp₂₀₀), motif II (His₂₃₉), et motif III (Ser₅₆₈). SSU0757 possède également à l'extrémité carboxy-terminale un motif d'ancrage à la paroi caractéristique des bactéries à Gram positifs (Leu-Pro-X-Thr-Gly), motif suivi par un domaine hydrophobe. Toutes les souches de *S. suis* testées, appartenant à différents sérotypes, possèdent le gène codant pour la protéine SSU0757. Les deux mutants dépourvus d'activité pseudo-subtilisine ont démontré des temps de génération plus longs et se sont avérés plus sensibles à l'élimination dans un modèle de sang complet comparativement à la souche sauvage. La virulence des mutants de *S. suis* G6G et M3G a été comparée à la souche sauvage dans un modèle de souris CD1. Des différences significatives dans le taux de mortalité ont été notées entre le groupe de souris P1/7 et les groupes de souris M3G et G6G (P <0.001).

Conclusion: En résumé, nous avons identifié un gène codant pour une pseudo-subtilisine présente à la surface cellulaire qui est largement distribuée chez *S. suis*. Nous avons également mis en évidence la participation de cette protéase dans la virulence de *S. suis*.

3.1.2 Abstract

Background: *Streptococcus suis* is a major swine pathogen and zoonotic agent that mainly causes septicemia, meningitis, and endocarditis. It has recently been suggested that proteinases produced by *S. suis* (serotype 2) are potential virulence determinants. In the present study, we screened a *S. suis* mutant library created by the insertion of Tn917 transposon in order to isolate a mutant deficient in a cell surface proteinase. We characterized the gene and assessed the proteinase for its potential as a virulence factor.

Results: Two mutants (G6G and M3G) possessing a single Tn917 insertion were isolated. The affected gene coded for a protein (SSU0757) that shared a high degree of identity with *Streptococcus thermophilus* PrtS (95.9%) and, to a lesser extent, with *Streptococcus agalactiae* CspA (49.5%), which are cell surface serine proteinases. The SSU0757 protein had a calculated molecular mass of 169.6 kDa and contained the catalytic triad characteristic of subtilisin family proteinases: motif I (Asp₂₀₀), motif II (His₂₃₉), and motif III (Ser₅₆₈). SSU0757 also had the Gram-positive cell wall anchoring motif (Leu-Pro-X-Thr-Gly) at the carboxy-terminus, which was followed by a hydrophobic domain. All the *S. suis* isolates tested, which belonged to different serotypes, possessed the gene encoding the SSU0757 protein. The two mutants devoid of subtilisin-like proteinase activity had longer generation times and were more susceptible to killing by whole blood than the wild-type parent strain P1/7. The virulence of the G6G and M3G mutants was compared to the wild-type strain in the CD1 mouse model. Significant differences in mortality rates were noted between the P1/7 group and the M3G and G6G groups ($P < 0.001$).

Conclusion: In summary, we identified a gene coding for a cell surface subtilisin-like serine proteinase that is widely distributed in *S. suis*. Evidences were brought for the involvement of this proteinase in *S. suis* virulence.

3.1.3 Background

The swine pathogen *Streptococcus suis* is transmitted via the respiratory route and colonizes the palatine tonsils and nasal cavities of pigs from where it can disseminate throughout the animal and cause infections [1], mainly septicemia, meningitis, and endocarditis, as well as arthritis [1]. Zoonotic infections occur mainly in individuals who work in close contact with pigs or pork by-products [2]. In fact, *S. suis* is considered one of the most important etiologic agents of adult meningitis in Asian countries [3]. While thirty-five serotypes (1 to 34 and 1/2) have been identified based on capsular antigens, serotype 2 is considered the most virulent and is the most commonly recovered from diseased pigs and humans [1]. Over the past ten years, numerous studies have been undertaken to identify putative virulence factors in *S. suis* [1, 4, 5]. Among these virulence factors, the polysaccharide capsule, which provides protection against phagocytosis [6], appears to be essential for the pathogenicity of *S. suis*. However, considering the multi-step pathogenesis of *S. suis* infections, it is likely that the virulence of this pathogen is determined by more than one factor [7].

Proteases, which are hydrolytic enzymes that catalyze the cleavage of peptide bonds, are critical virulence factors for numerous microbial pathogens [8]. These enzymes hydrolyze a variety of host proteins, including serum and tissue components, thus helping to neutralize the host immune defense system and causing tissue destruction and invasion [8]. Interestingly, these enzymes show great potential as vaccine antigens and are promising targets for the development of anti-bacterial drugs [9]. A previous study in our laboratory identified four proteolytic enzymes produced by *S. suis*, including one on the cell surface that degrades a chromogenic substrate highly specific for chymotrypsin-like proteases [10]. In the present study, we screened an *S. suis* P1/7 (serotype 2) mutant library created by the insertion of Tn917 transposon in order to isolate a mutant deficient in this activity. We characterized the gene and assessed the proteinase for its potential as a virulence factor.

3.1.4 Methods

Bacteria and mutant library

S. suis P1/7, a virulent serotype 2 European reference strain isolated from a pig with meningitis for which the genome has been sequenced by the *S. suis* Sequencing Group at the Sanger Institute [11], was used as the wild-type strain. Bacteria were routinely grown in Todd Hewitt broth (THB; BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MA, USA) at 37°C under aerobiosis. A mutant library was constructed in a previous study [12] using the pTV408 temperature-sensitive suicide vector to deliver the Tn917 transposon into *S. suis* P1/7 via electroporation. To maintain the selective pressure during the growth of the mutants, the culture medium was supplemented with 1 µg/ml of erythromycin. *Escherichia coli* MC1061 (hsdR2 hsdM⁺ hsdS⁺ araD139 Δ(ara-leu)7697 Δ(lac)X74 galE15 galK16 rpsL (StrR) mcrA mcrB1), which was used for plasmid rescue, was grown in LB medium containing 100 µg/ml of erythromycin.

Isolation of mutants deficient in proteinase activity

Mutants from the Tn917 library were individually grown overnight in THB and suspended in phosphate-buffered saline (PBS, 50 mM, pH 7.2) to an optical density of 1.0 at 660 nm (OD₆₆₀). Bacterial suspensions (100 µl) were added to the wells of 96-well microplates along with 20 µl of the chromogenic substrate N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNa (2 mg/ml in 50% dimethyl formamide) (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, CANADA). This substrate is highly specific for subtilisin-like [13] and chymotrypsin-like enzymes [14]. The reaction mixtures were incubated at 37°C for 4 h. The release of pNA was quantified by measuring the absorbance at 415 nm (A₄₁₅).

Demonstration of transposon insertion and stability of mutants

Chromosomal DNA was isolated from cells harvested from overnight bacterial cultures as previously reported [15], except that proteinase K (Sigma-Aldrich Canada Ltd.) was used instead of protease I. The DNA was digested with *Hind*III restriction endonuclease, Southern blotted, and hybridized using a digoxigenin (DIG)-labeled probe specific for the

erm gene in the Tn917 transposon as previously reported [12]. Hybridization was performed at 68°C, and the probe was detected using the NBT (*p*-nitroblue tetrazolium chloride)/BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) chromogen system. The probe was generated from pTRKL2T [16] by PCR using the *ermF* 5'-ACGAGTGAAAAAGTACTCAACC-3' and *ermR* 5'-ACCTCTGTTTGTAGGGAATTG-3' primers and the DIG-PCR labeling mixture. The stability of the Tn917-induced mutation was investigated by performing overnight serial passages (up to 35) of the mutants in erythromycin-free THB prior to measuring the hydrolysis of the chromogenic substrate N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*Na as described above.

Plasmid rescue and sequencing of the insertion site

The site of the transposon insertions in the *S. suis* P1/7 genome was determined by plasmid rescue [12]. The genomic DNA of the selected mutants was isolated and digested using *Hind*III, ligated, and transformed into chemically competent *E. coli* MC1061. Transformants were selected on LB agar containing erythromycin. Plasmid DNA was then extracted from the *E. coli* cells and was sequenced using the Tn917 (5'-AGAGAGATGTCACCGTCAAGT-3') primer to determine the DNA sequence contiguous to Tn917.

Characterization and comparative analysis of SSU0757

The theoretical pI and molecular mass of SSU0757 were determined using software available at www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html. The alignment and comparison of the amino acid sequences of the subtilisin-like serine proteinases was performed using BioEdit software.

Distribution of SSU0757 in *S. suis*

Selected *S. suis* strains were tested for the presence of the subtilisin-encoding gene (*SSU0757*): S428 (serotype 1), 31533 (serotype 2), 89-999 (serotype 2), S735 (serotype 2), 90-1330 (serotype 2), 65 (serotype 2), 89-4223 (serotype 2), 2651 (serotype 1/2), 4961

(serotype 3), Amy12C (serotype 5), 1078212 (untypeable), and 1079277 (untypeable). Except for strains 90-1330, 65 and 89-4223, which were isolated from healthy pigs, all other isolates were from diseased pigs. Cell lysates were prepared from bacterial colonies recovered from agar plates. The presence of the gene was determined by PCR using the SUB163 (5'-GTCAGCGAATCAGCCTCAGAAAGTCCCGTT-3') and SUB4436R (5'-CTTCATCTTTTTTGTTCAGTGGCAGTATTTG-3') primers.

Growth studies

The generation times of *S. suis* wild-type strain P1/7 and the proteinase-deficient mutants were determined by inoculating erythromycin-free THB with late-log phase cultures and monitoring growth at OD₆₆₀. Generation times were calculated from the growth curves.

Susceptibility to whole blood

Venous blood samples were collected from the antecubital vein of a human volunteer using the Vacutainer™ system and sterile endotoxin-free blood collection tubes containing 150 IU of sodium heparin (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Informed consent was obtained from the donor prior to the experiment. The protocol was approved by the Université Laval ethics committee. *S. suis* (wild-type parent strain and mutants) were cultivated to the early stationary growth phase at 37°C. The cells were harvested by centrifugation at 11,000 *g* for 10 min, suspended in RPMI-1640 medium to an OD₆₆₀ of 0.1, and diluted 1:100 in RPMI-1640 medium. Whole blood (1 ml) was mixed with pig serum anti-*S. suis* (300 µl) and *S. suis* cells (100 µl). Anti-*S. suis* serum was prepared in pigs by injecting whole bacterial cells as previously described [17]. The mixtures were incubated for 4 h at 37°C with occasional gentle shaking. Infected whole blood cultures were harvested at 0 and 4 h. The first time point (0 h) was considered as the 100% viability control. Infected whole blood samples were 10-fold serially diluted (10⁻¹ to 10⁻⁴) in PBS and plated on Todd-Hewitt agar plates. After a 24 h incubation at 37°C, the number of colony forming units (cfu) was determined. The experiments were carried out in duplicate.

Experimental infections in mice

Thirty-nine female six-week-old CD1 mice (Charles River Laboratories, Saint-Constant, QC, Canada) were acclimatized to a 12 h light/ dark cycle and were given rodent chow and water ad libitum. On the day of the experiment, the mice (11 per group) were infected by i.p. injection of 1 ml of either *S. suis* wild-type strain P1/7 or the Tn917 mutants deficient in proteinase activity at a concentration of 7×10^7 CFU/ml in THB. Six control mice were inoculated with the vehicle solution (sterile THB) alone. The CD1 mouse has proven to be an excellent model of *S. suis* infections that result in an early septic shock-like syndrome and a second late phase *S. suis* infection that induces meningitis and brain damage [18-20]. The septicemic phase of *S. suis* infections is characterized by depression, rough hair coat, swollen eyes, weakness, and death during the first 48 h post-infection. If animals survive this critical step of the disease, they may still develop central nervous system damage and meningitis, with the sudden appearance of nervous signs beginning 3-4 days post-infection, including hyperexcitation, episthotonus, opisthotonus, bending of the head toward one side, and walking in circles [18]. Clinical signs of infection and survival were recorded on a daily basis post-infection for 14 days as previously described [18]. Mice exhibiting extreme lethargy or neurological signs were considered moribund and were humanely euthanized. All experiments involving mice were conducted in accordance with the guidelines and policies of the Canadian Council on Animal Care and the principles set out in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and were approved by the Animal Welfare Committee of Université de Montréal. Overall survival rates for the various groups were calculated using Kaplan-Meier plots. Survival curves were compared using the log-rank test with the Holm-Sidak method used to analyze multiple curves. A $P < 0.05$ was considered statistically significant. All analyses were performed using the Sigma Plot System (v.11; Systat Software, San Jose, CA, USA).

3.1.5 Results

The *S. suis* mutant library created by insertion of Tn917 transposon (1,200 mutants) was screened for degradation of the chromogenic substrate N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNa. Three mutants (G6G, J9G, and M3G) were found to be devoid of activity ($A_{415} < 0.05$) compared to parental strain ($A_{415} = 0.85$). With the objective to show that only one transposon insertion was present in mutants, chromosomal DNA was analyzed by Southern blotting using a DIG-labeled probe specific for the *erm* gene in the Tn917 transposon. As shown in Figure 3-2, only one Tn917 insertion occurred in the G6G and M3G mutants. Since the J9G mutant had two insertions, we only used the G6G and M3G mutants for further experiments. The mutations were highly stable, with G6G and M3G still unable to degrade the chromogenic substrate after 35 serial transfers in liquid medium (erythromycin-free).

To identify which gene was inactivated in mutants, the Tn917 insertion sites in G6G and M3G were sequenced. The affected gene corresponded to a gene coding for the SSU0757 protein in the genome of *S. suis* P1/7 based on a comparison of the sequence with those of the *S. suis* Sequencing Group at Sanger Institute. In mutant G6G, the transposon inserted at position 2,657 while in mutant M3G, it inserted at position 3,132. The analysis of the chromosomal region contiguous to the Tn917-inactivated gene confirmed that SSU0757 is not part of an operon. This and the transcriptional orientations of the contiguous genes suggested that there were no transposon-induced effects (Figure 3-2). This gene had a 4,758-nucleotide ORF and a G+C content of 41.64%, which was very similar to that of the *S. suis* genome (38-42%) [21]. There were also a transposase upstream and a sugar kinase downstream from the gene (Figure 3-2). To further explore the distribution of this gene in *S. suis*, we performed PCR assays using internal primers for the gene coding for SSU0757 using chromosomal DNA isolated from 11 strains belonging to serotypes 1, 1/2, 2, 3, and 5. Two untypeable isolates were also included. As shown in Figure 3-3, the gene was detected in all the strains tested, suggesting that it is widely distributed.

An *in silico* analysis of the *SSU0757* gene product was performed to determine principal characteristics of the protein. This revealed that it corresponds to a 1,585-residue polypeptide with a predicted pI of 4.58 and a calculated molecular mass of 169.6 kDa. The protein contained the catalytic triad characteristic of subtilisin family proteinases: motif I (Asp₂₀₀), motif II (His₂₃₉), and motif III (Ser₅₆₈). It also contained the Gram-positive cell wall anchoring motif (Leu-Pro-X-Thr-Gly) at the carboxy-terminus at positions 1551-1555 followed by a hydrophobic domain as well as an amino-terminal signal sequence with a putative cleavage site between residues 35 and 36 (Figure 3-2).

The alignment and comparison of the amino acid sequences of *SSU0757* with known streptococcal subtilisin-like serine proteinases was performed using BioEdit software. The amino acid sequence of *SSU0757* had a degree of identity of 98.9% and 98.4% with those of strains 05ZYH33 and 98HAH33, respectively. A database search revealed that the amino acid sequence of *SSU0757* shared a high degree of identity (95.9%) with PrtS of *Streptococcus thermophilus*, which codes for a cell surface subtilisin-like proteinase (Table 3-1). As reported in Table 3-1, the *SSU0757* protein shared significant identity with other streptococcal subtilisin-like proteinases. After the PrtS of *S. thermophilus*, the second highest degree of identity (49.5%) was with the CspA of *Streptococcus agalactiae*, which also codes for a cell surface subtilisin-like proteinase [22].

The role of the subtilisin-like proteinase of *S. suis* in nutrition was investigated by comparing the growth of the wild-type strain in THB with that of the *Tn917* mutants. Table 3-2 lists the generation times for each strain. The two proteinase-deficient mutants had longer generation times than the wild-type strain. The impact of inactivating the proteinase on the survival of *S. suis* in human whole blood was also tested. As shown in Figure 3-4, the percent survival rate of the wild-type parent strain was 42.6 after a 4 h incubation in whole blood. The two mutants were much more sensitive, with a percent survival percent rate of 22.1 for G6G and 4.4 for M3G.

The virulence of the G6G and M3G mutants was compared to the wild-type strain in the CD1 mouse model. All the animals in the P1/7 group presented severe clinical signs associated with septicemia and septic shock, including rough hair coat, depression, and prostration during the first 72 h post-infection. Four mice died from septicemia in this group (36.4 %) (Table 3-3). From days 5-10, the rest of the mice infected with the P1/7 strain (63.6 %) (Table 3-3) developed clear signs of neurological and/or vestibular symptoms, including hyperexcitation, episthotonus, opisthotonus, lateral bending of the head, walking in circles, rolling, and spinning [18]. Mice with these clinical signs were sacrificed for ethical reasons. M3G and G6G mice presented only mild clinical signs of a *S. suis* infection during the first 48 h post-infection, which mainly consisted of rough hair coat. Mice from both groups returned to their normal behavior after this period. Surprisingly, from days 11-13 post-infection, three mice from the M3G group (27.3%) died (Table 3-3). At this late stage of the trial, these deaths might have been due to either sub-clinical meningitis or endocarditis [18]. No deaths were recorded in the G6G group (Table 3-3). It is worth noting that *S. suis* was recovered from all the mice, whatever the group, that died either of septicemia or meningitis (data not shown). Survival curves for the various groups were analyzed using Kaplan-Meier plots and compared using the log-rank test with the Holm-Sidak method for analyzing multiple curves. Significant differences in mortality rates were noted between the P1/7 group and the M3G and G6G groups ($P < 0.001$) (Figure 3-5). In contrast, there were no statistical differences in mortality rates between the M3G and G6G groups ($P > 0.05$) (Figure 3-5).

3.1.6 Discussion

Bacterial pathogens possess various surface proteins, most of which are virulence determinants involved in attachment, multiplication, and invasion of the host. In the present study, we identified a *S. suis* gene that codes for a cell surface subtilisin-like proteinase containing the cell wall sorting signal LPXTG that is responsible for covalently anchoring proteins to cell wall peptidoglycan. The sortase A previously identified in *S. suis* has been

reported to play an important role in anchoring LPXTG proteins to the cell wall [23] and may be involved in locating the subtilisin-like proteinase on the cell surface. A number of potential virulence factors previously characterized in *S. suis*, including the opacity factor [24], the virulence marker MRP [25], the surface antigen one [26], and a surface protein associated with invasion of porcine brain endothelial cells [20], contain the anchoring motif LPXTG.

The cell surface subtilisin-like proteinase of *S. suis* showed the highest identity with the PrtS of *S. thermophilus* (95.9%) and the CspA of *S. agalactiae* (49.5%). In the dairy lactic bacterium *S. thermophilus*, the PrtS subtilisin-like proteinase degrades casein into peptides, which are required for efficient growth [27, 28]. *S. agalactiae* is a major causal agent of mastitis in cattle [29] and is the principal cause of neonatal meningitis [30]. The CspA subtilisin-like proteinase of this pathogenic *streptococcus* is considered to be a critical virulence factor [22]. This proteinase has been shown to be involved in bacterial virulence in a neonatal rat sepsis model and in resistance to opsonophagocytic killing by human neutrophils in vitro [22]. More recently, the CspA of *S. agalactiae* has been shown to hydrolyze and inactivate CXC chemokines, many of which can recruit neutrophils to sites of infection [31].

Bacterial pathogenicity is a complex process that depends on the ability of the pathogen to multiply. The *S. suis* subtilisin-like proteinase appears to contribute to nutrient acquisition given that proteinase-deficient mutants had longer generation times than the parent strain in vitro. This is consistent with the study of Courtin *et al.* [28], who reported that the PrtS subtilisin-like proteinase of *S. thermophilus* is involved in nitrogen supply through casein hydrolysis. The mutants and the wild type strain were also compared for their ability to survive in human whole blood. We found that the parent strain was much more resistant to killing than the mutants. This suggests that the proteinase may degrade human serum proteins with bactericidal activity or opsonins involved in phagocytosis by immune cells. This is in agreement with the study of Harris *et al.* [22], who reported that the CspA

subtilisin-like proteinase of *S. agalactiae*, which shares a high degree of identity with *S. suis*, contributes to the resistance to phagocytosis by neutrophils.

Given its cell surface localization, the subtilisin-like proteinase of *S. suis* may interact with host cells and induce an inflammatory response which is a feature of meningitis. Indeed, the *S. suis* proteinase may activate protease-activated receptors (PAR), which are members of the G protein-coupled receptors also known as seven-transmembrane domain receptors [32]. These receptors are found on several cell types and play an important role in inflammatory processes. More specifically, PAR-2 is known to be activated by serine proteases and bacterial proteinases [33]. Since *S. suis* cells are known to induce the production of pro-inflammatory cytokines by endothelial cells [34] and macrophages [35], part of this activation may be caused by the cell surface subtilisin-like proteinase identified in this study. Studies are currently in progress in our laboratory to verify this hypothesis. In a previous study, we reported that the presence of fibrinogen during growth of *S. suis* modulates its capacity to form a biofilm [36]. Given the ability of bacterial subtilisin-like proteinases to degrade fibrinogen [22, 37, 38], it may be hypothesized that the proteinase of *S. suis* could cleave fibrinogen leading to generation of fibrin, which may favor biofilm formation.

The contribution of the subtilisin-like proteinase to virulence was investigated in a mouse model. We found that the proteinase-deficient Tn917 mutants were significantly less virulent in mice. This clearly suggests that the *S. suis* subtilisin-like proteinase is an virulence determinant. Ge *et al.* [39] recently constructed a dipeptidyl peptidase IV deficient-mutant of *S. suis* and provided evidence for the critical role of this enzyme in the virulence of *S. suis* in a mouse model. This cell surface enzyme cleaves X-Pro/Ala dipeptides from the N-terminus of proteins but also possesses binding domains for fibronectin [39]. Given the involvement of the cell surface subtilisin-like serine proteinase in *S. suis* virulence, studies are in progress to clone this proteinase and determine whether it may represent a promising candidate for a protein-based vaccine.

3.1.7 Conclusion

In summary, we identified a gene that codes for a cell surface subtilisin-like serine proteinase and that is widely distributed in *S. suis* strains. Evidences were brought for the involvement of this proteinase in *S. suis* virulence.

3.1.8 Author's contributions

KV and CB performed the molecular biology experiments. LB performed the growth study, determined the susceptibility to whole blood and helped to draft the manuscript. MCDP performed the animal study. JS constructed the Tn917 library. MG participated in the design of the study and helped to draft the manuscript. DG conceived the study and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

3.1.9 Acknowledgments

This study was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). We thank S. Lacouture, M.-P. Levasseur, and A. Turgeon for their technical assistance.

3.1.10 References

1. Higgins R, Gottschalk M: Streptococcal Diseases. In *Diseases of Swine*. 9th edition. Edited by Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ. Iowa: Iowa University Press, 2005:769-783.

2. Lun ZR, Wang QP, Chen XG, Li AX, Zhu XQ: *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. *Lancet Infect Dis* 2007, 7:201-209.
3. Wertheim HF, Nghia HD, Taylor W, Schultsz C: *Streptococcus suis*: an emerging human pathogen. *Clin Infect Dis* 2009, 48:617-625.
4. Gottschalk M, Segura M: The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet Microbiol* 2000, 76:259-272.
5. Segura M, Gottschalk M: Extracellular virulence factors of streptococci associated with animal diseases. *Front Biosci* 2004, 9:1157-1188.
6. Charland N, Harel J, Kobisch M, Lacasse S, Gottschalk M: *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology* 1998, 144:325-332.
7. Baums CG, Valentin-Weigand P: Surface-associated and secreted factors of *Streptococcus suis* in epidemiology, pathogenesis and vaccine development. *Anim Health Res Rev* 2009, 10:65-83.
8. Maeda H: Role of microbial proteases in pathogenesis. *Microbiol Immunol* 1996, 40:685-699.
9. Travis J, Potempa J: Bacterial proteinases as targets for the development of second-generation antibiotics. *Biochim Biophys Acta* 2000, 1477:35-50.
10. Jobin MC, Grenier D: Identification and characterization of four proteases produced by *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiol Lett* 2003, 220:113-119.
11. Holden MT, Hauser H, Sanders M, *et al*: Rapid evolution of virulence and drug resistance in the emerging zoonotic pathogen *Streptococcus suis*. *PloS One* 2009, 4:e6072.

12. Slater JD, Allen AG, May JP, Bolitho S, Lindsay H, Maskell DJ: Mutagenesis of *Streptococcus equi* and *Streptococcus suis* by transposon Tn917. *Vet Microbiol* 2003, 93:197-206.
13. Davis BG, Shang X, DeSantis G, Bott RR, Jones JB: The controlled introduction of multiple negative charge at single amino acid sites in subtilisin *Bacillus lentus*. *Bioorg Med Chem* 1999, 7:2293-2301.
14. DelMar EG, Largman C, Brodrick JW, Geokas MC: A sensitive new substrate for chymotrypsin. *Anal Biochem* 1979, 99:316-320.
15. Stuart JG, Zimmerer EJ, Maddux RL: Conjugation of antibiotic resistance in *Streptococcus suis*. *Vet Microbiol* 1992, 30:213-222.
16. Vaillancourt K, LeMay JD, Lamoureux M, Frenette M, Moineau S, Vadeboncoeur C: Characterization of a galactokinase-positive recombinant strain of *Streptococcus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol* 2004, 70:4596-4603.
17. Chabot-Roy G, Willson P, Segura M, Lacouture S, Gottschalk M: Phagocytosis and killing of *Streptococcus suis* by porcine neutrophils. *Microb Pathog* 2006, 41:21-32.
18. Domínguez-Punaro MC, Segura M, Plante M, Lacouture S, Rivest S, Gottschalk M: *Streptococcus suis* serotype 2, an important swine and human pathogen, induces strong systemic and cerebral inflammatory responses in a mouse model of infection. *J Immunol* 2007, 179:1842-1854.
19. Fittipaldi N, Sekizaki T, Takamatsu D, Domínguez-Punaro MC, Harel J, Bui NK, Vollmer W, Gottschalk M: Significant contribution of the *pgdA* gene to the virulence of *Streptococcus suis*. *Mol Microbiol* 2008, 70:1120-1135.

20. Vanier G, Slater JD, Domínguez-Punaro MC, Fittipaldi N, Rycroft AN, Segura M, Maskell DJ, Gottschalk M: New putative virulence factors of *Streptococcus suis* involved in invasion of porcine brain microvascular endothelial cells. *Microbial Pathog* 2009, 46:13-20.
21. Okwumabua O, Persaud JS, Reddy PG: Cloning and characterization of the gene encoding the glutamate dehydrogenase of *Streptococcus suis* serotype 2. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001, 8:251-257.
22. Harris TO, Shelver DW, Bohnsack JF, Rubens CE: A novel streptococcal surface protease promotes virulence, resistance to opsonophagocytosis, and cleavage of human fibrinogen. *J Clin Invest* 2003, 111:61-70.
23. Osaki M, Takamatsu D, Shimoji Y, Sekizaki T: Characterization of *Streptococcus suis* genes encoding proteins homologous to sortase of gram-positive bacteria. *J Bacteriol* 2002, 184:971-982.
24. Baums CG, Kaim U, Fulde M, Ramachandran G, Goethe R, Valentin-Weigand P: Identification of a novel virulence determinant with serum opacification activity in *Streptococcus suis*. *Infect Immun* 2006, 74:6154-6162.
25. Vecht U, Arends JP, Van der Molen EJ, van Leengoed LA: Differences in virulence between two strains of *Streptococcus suis* type II after experimentally induced infection of newborn germ-free pigs. *Am J Vet Res* 1989, 50:1037-1043.
26. Li Y, Martinez G, Gottschalk M, Lacouture S, Willson P, Dubreuil JD, Jacques M, Harel J: Identification of a surface protein of *Streptococcus suis* and evaluation of its immunogenic and protective capacity in pigs. *Infect Immun* 2006, 74:305-312.

27. Fernandez-Espla MD, Garault P, Monnet V, Rul F: *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Appl Environ Microbiol* 2000, 66:4772-4778.
28. Courtin P, Monnet V, Rul F: Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus/Lactobacillus bulgaricus* mixed culture in milk. *Microbiology* 2002, 148:3413-3421.
29. Keefe GP: *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *Can Vet J* 1997, 38:429-437.
30. Larsen JW, Sever JL: Group B *Streptococcus* and pregnancy: a review. *Am J Obstet Gynecol* 2008, 198:440-448.
31. Bryan JD, Shelver DW: *Streptococcus agalactiae* CspA is a serine protease that inactivates chemokines. *J Bacteriol* 2009, 191:1847-1854.
32. Ossovskaya VS, Bunnett NW: Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev* 2004, 84:579-621.
33. Holzhausen M, Spolidorio LC, Vergnolle N: Role of protease-activated receptor-2 in inflammation, and its possible implications as a putative mediator of periodontitis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005, 100 Suppl 1:177-180.
34. Vadeboncoeur N, Segura M, Al-Numani D, Vanier G, Gottschalk M: Pro-inflammatory cytokine and chemokine release by human brain microvascular endothelial cells stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003, 35:49-58.
35. Tanabe SI, Grenier D: Endothelial cell/macrophage cocultures as a model to study *Streptococcus suis*-induced inflammatory responses. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009, 55:100-106.

36. Bonifait L, Grignon L, Grenier D: Fibrinogen induces biofilm formation by *Streptococcus suis* and enhances its antibiotic resistance. *Appl Environ Microbiol* 2008, 74:4969-4972.
37. Bamford CV, Fenno JC, Jenkinson HF, Dymock D: The chymotrypsin-like protease complex of *Treponema denticola* ATCC 35405 mediates fibrinogen adherence and degradation. *Infect Immun* 2007, 75:4364-4372.
38. Karlsson C, Andersson ML, Collin M, Schmidtchen A, Bjorck L, Frick IM: SufA--a novel subtilisin-like serine proteinase of *Fingoldia magna*. *Microbiology* 2007, 153:4208-4218.
39. Ge J, Feng Y, Ji Hongfeng, Zhang H, Zheng F, Wang C, Yin Z, Pan X, Tang J: Inactivation of dipeptidyl peptidase IV attenuates the virulence of *Streptococcus suis* serotype 2 that cause streptococcal toxic shock syndrome. *Curr Microbiol* 2009, 59:248-255.

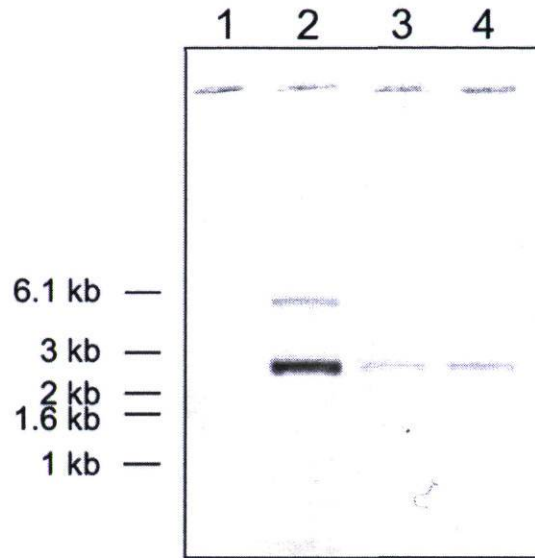


Figure 3-1: Southern blot of *S. suis* P1/7 and the Tn917 mutants. Chromosomal DNA was digested with *Hind*III restriction endonuclease and hybridized with a DIG-labeled probe specific for the *erm* gene. Lane 1, wild-type parent strain P1/7; lane 2, mutant J9G; lane 3, mutant M3G; lane 4, G6G.

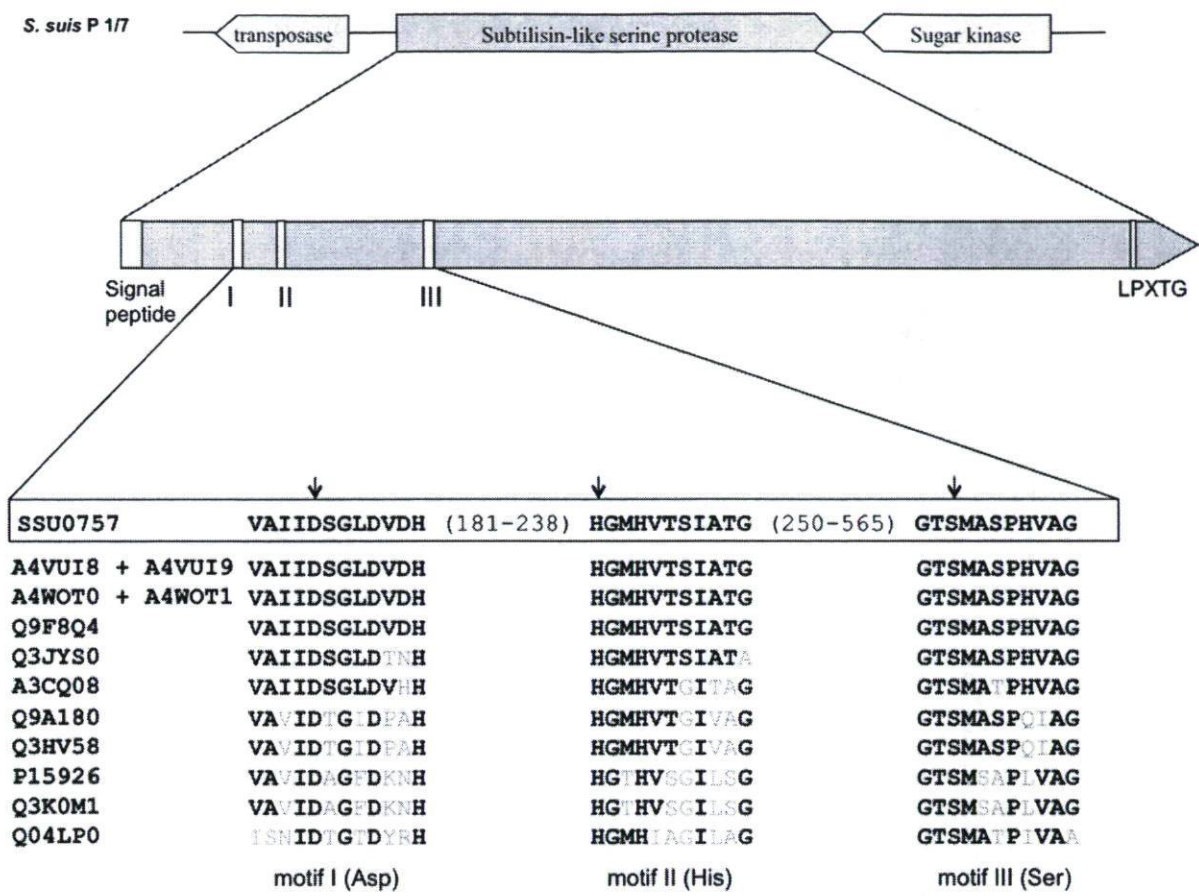


Figure 3-2: Alignment of the catalytic triad (Asp₂₀₀ - His₂₃₉ - Ser₅₆₈; indicated by arrows) of *S. suis* SSU057 and homologous streptococcal subtilisin-like proteinases. Each catalytic triad is identified by UniProtKB accession numbers: A4VUI8 + A4VUI9 correspond to *S. suis* 05ZYH33 (SSU05-0811 + SSU05-0812); A4WOT0 + A4WOT1 correspond to *S. suis* 98HAH33 (SSU98-0811 + SSU98-0812); Q9F8Q4 corresponds to *S. thermophilus* PrtS; Q3JYS0 corresponds to *S. agalactiae* CspA; A3CQ08 corresponds to *S. sanguinis* PrtS; Q9A180 corresponds to *S. pyogenes* PrtS; Q3HV58 corresponds to *S. pyogenes* ScpC; P15926 corresponds to *S. pyogenes* ScpA; Q3K0M1 corresponds to *S. agalactiae* ScpB; Q04LP0 corresponds to *S. pneumoniae* PrtA.

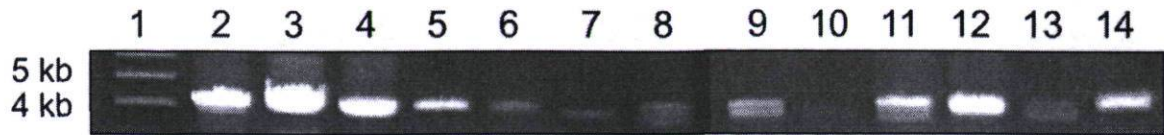


Figure 3-3: Distribution of the gene coding for the SSU0757 protein in various *S. suis* strains. Lane 1, DNA molecular weight markers; lane 2, S428 (serotype 1); lane 3, P1/7 (serotype 2); lane 4, 90-1330 (serotype 2); lane 5, S735 (serotype 2); lane 6, 65 (serotype 2); lane 7, 31533 (serotype 2); lane 8, 89-4223 (serotype 2); lane 9, 89-999 (serotype 2); lane 10, 2651 (serotype 1/2); lane 11, 4961 (serotype 3); lane 12, Amy12C (serotype 5); lane 13, 1078212 (untypeable); lane 14, 1079277 (untypeable).

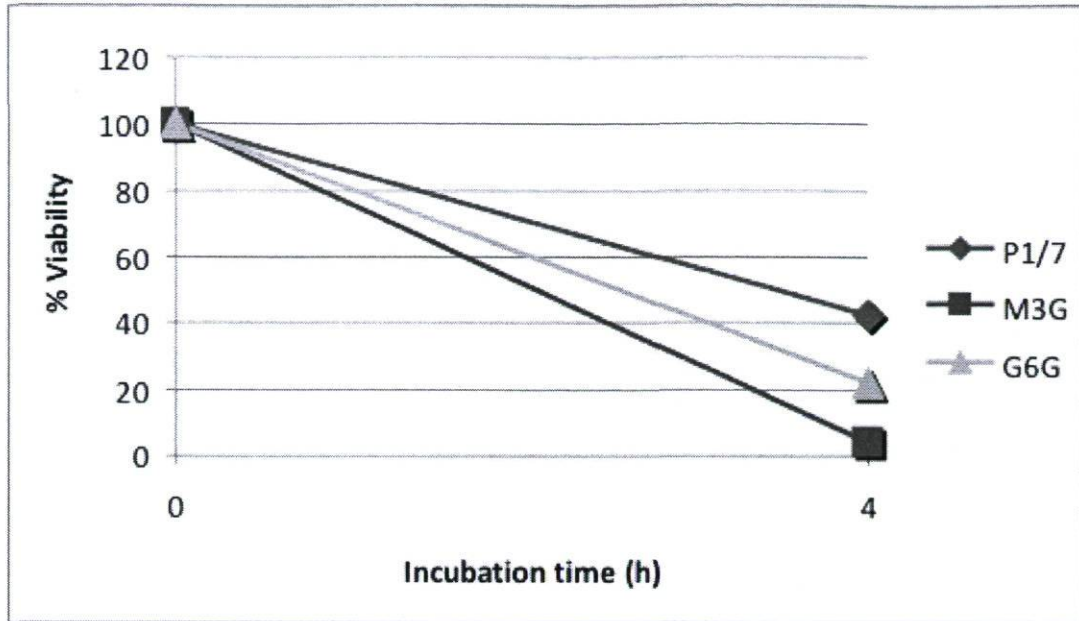


Figure 3-4: Survival of *S. suis* wild-type strain P1/7 and mutants M3G and G6G in human whole blood. Mixtures were incubated at 37°C for 4 h. A value of 100% was given to the colony forming units at time 0. Results are representative of two assays.

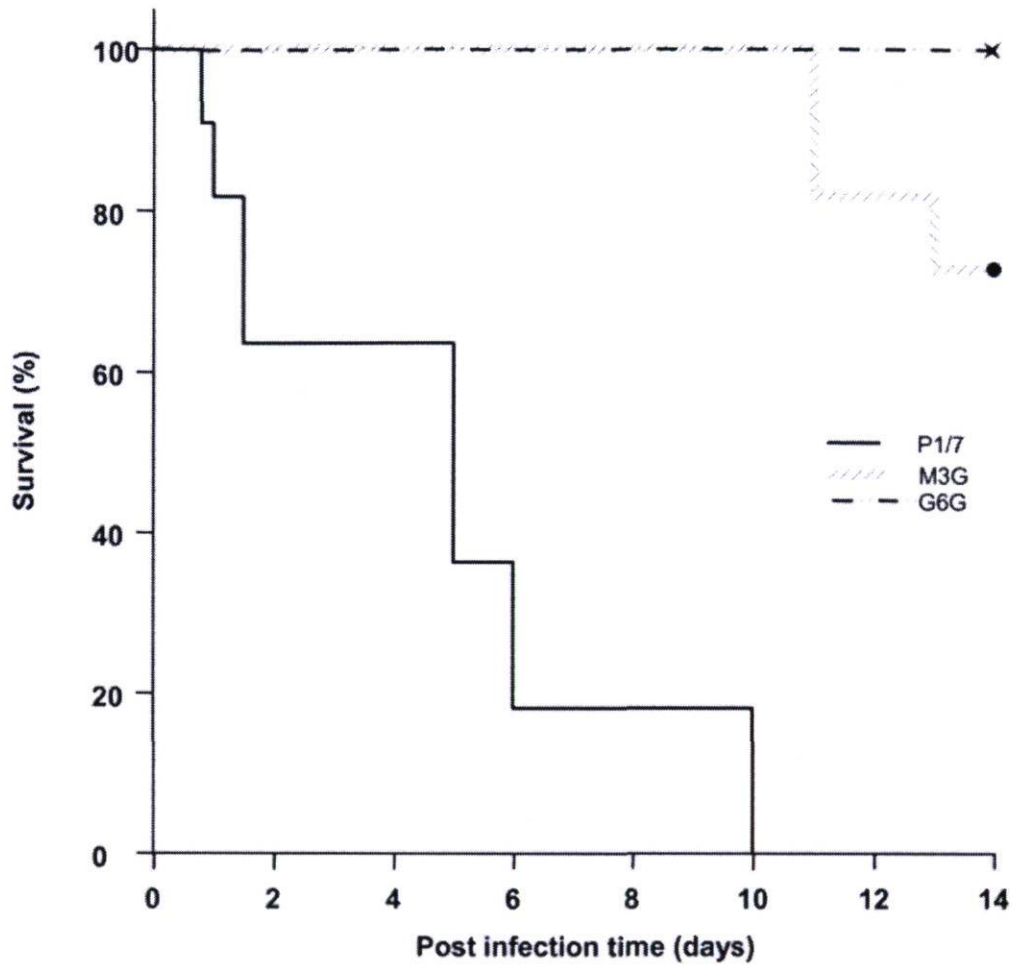


Figure 3-5: Survival of mice inoculated with the wild-type strain P1/7, M3G, or G6G. Six-week old CD1 mice were intraperitoneally inoculated with 7×10^7 cfu/ml and survival was recorded over a 14-day period. Data are expressed as the mean percentage of live animals in each group (n=11).

Table 3-1: Percentage identity of the amino acid (a.a.) sequences of *S. suis* P1/7 SSU0757 with proteinases from other streptococcal species.

Bacterial species	Accession no.	Predicted a.a. sequence % identity
<i>S. suis</i> uncharacterized protein	A4VUI8 + A4VUI9	98.9
<i>S. suis</i> uncharacterized protein	A4WOT0 + A4WOT1	98.4
<i>S. thermophilus</i> PrtS	Q9F8Q4	95.9
<i>S. agalactiae</i> CspA	Q3JYS0	49.5
<i>S. sanguinis</i> PrtS	A3CQ08	40.6
<i>S. pyogenes</i> PrtS	Q9A180	31.8
<i>S. pyogenes</i> ScpC	Q3HV58	31.8
<i>S. pyogenes</i> ScpA	P15926	24.0
<i>S. agalactiae</i> ScpB	Q3K0M1	23.6
<i>S. pneumoniae</i> PrtA	Q04LP0	16.2

Table 3-2: Generation times of *S. suis* P1/7 and the Tn917 mutants deficient in the cell surface subtilisin-like proteinase.

Strain	Generation time in minutes (mean \pm standard deviation)
P1/7	45.3 \pm 6.9
M3G	57.6 \pm 8.2
G6G	55.8 \pm 4.8

Table 3-3: Virulence in CD1 mice of *S. suis* wild-type strain P1/7 and mutants M3G and G6G.

Strain	Death (%)*		Total mortality (%)
	Septicemia	Meningitis	
P1/7	36.4	63.6	100
M3G	0	27.3	27.3
G6G	0	0	0

* Eleven mice were infected per group and measurements were performed over a 14-day period post-infection. Percent of animals that died due to an infection or that were sacrificed for ethical reasons.

3.2 Article 5: Purification and characterization of the subtilisin-like protease of *Streptococcus suis* that contributes to its virulence

Article publié en 2010 dans la revue *Veterinary Microbiology*, sous la référence 148(2-4):333-40.

Laetitia Bonifait^{1,3}, Katy Vaillancourt¹, Marcelo Gottschalk^{2,3}, Michel Frenette¹, and Daniel Grenier^{1,3*}

¹Groupe de Recherche en Écologie Buccale (GREB), Faculté de médecine dentaire, Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada;

²Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP), Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada; and

³Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT)

Short title: *S. suis* subtilisin-like protease

* Corresponding author. Mailing address: Groupe de Recherche en Écologie Buccale, Faculté de médecine dentaire, Université Laval, 2420 Rue de la Terrasse, Quebec City, Quebec, Canada, G1V 0A6

Phone: (418) 656-7341. Fax: (418) 656-2861. E-mail: Daniel.Grenier@greb.ulaval.ca

3.2.1 Résumé

Streptococcus suis est un important pathogène porcin responsable d'infections sévères comme les méningites, endocardites et septicémies. *S. suis* est également reconnu comme un agent de zoonose qui exprime plusieurs facteurs de virulence. La pseudo-subtilisine protéase (SspA) récemment identifiée chez *S. suis* joue un rôle important dans la pathogénicité de cette bactérie chez les modèles animaux. L'objectif de cette étude était de cloner, purifier et caractériser la SspA de *S. suis* P1/7 (sérotipe 2). Le gène SSU0757 codant pour la SspA a été amplifié et un fragment d'ADN de 4798 pb a été obtenu. Il a été cloné dans le plasmide d'expression pBAD/HisB puis inséré dans *Escherichia coli* afin de surexprimer la protéine. La protéase recombinante a été purifiée par chromatographie et a montré un poids moléculaire de 170 kDa par SDS-PAGE. Son activité s'est avérée optimale à pH 7 et à des températures entre 25°C et 37°C. Elle a montré une haute spécificité pour le substrat chromogénique succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNa, et les inhibiteurs spécifiques des sérines protéases ont inhibé son activité. En plus de dégrader la gélatine, la protéase a montré une capacité à cliver la chaîne A α du fibrinogène ce qui prévient sa transformation en fibrine par la thrombine. La pseudo-subtilisine recombinante a aussi démontré une toxicité envers les cellules épithéliales porcines. Enfin, les sérums de porcs infectés par *S. suis* ont réagi en présence de la SspA recombinante, indiquant qu'elle est produite au cours des infections. En conclusion, la SspA de *S. suis* partage de nombreuses similitudes avec les pseudo-subtilisines produites par d'autres streptocoques pathogènes et pourrait contribuer au processus pathogénique des infections à *S. suis*.

3.2.2 Abstract

Streptococcus suis is a major swine pathogen that is responsible for severe infections such as meningitis, endocarditis, and septicemia. *S. suis* is also recognized as a zoonotic agent and expresses several virulence factors. The recently identified subtilisin-like protease (SspA) of *S. suis* plays an important role in the pathogenicity of this bacterium in animal models. The objective of the present study was to clone, purify, and characterize the SspA of serotype 2 *S. suis* P1/7. The *SSU0757* gene encoding SspA was amplified and a 4,798-bp DNA fragment was obtained. It was cloned into the expression plasmid pBAD/HisB and then inserted into *Escherichia coli* to overproduce the protein. The recombinant protease was purified by chromatography procedures and showed a molecular weight of 170 kDa by SDS-PAGE. Its activity was optimal at pH 7 and at temperatures ranging from 25°C to 37°C. It had a high specificity for the chromogenic substrate succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNa while specific inhibitors of serine proteases inhibited its activity. In addition to degrading gelatin, the protease hydrolyzed the A α chain of fibrinogen, which prevented fibrin formation by thrombin. The recombinant subtilisin-like protease also showed toxicity towards porcine epithelial cells. Lastly, sera from pigs infected with *S. suis* reacted with the recombinant SspA, indicating that it is produced during infections. In conclusion, the SspA of *S. suis* shared similarities with Ssps produced by other pathogenic streptococci and may contribute to the pathogenic process of *S. suis* infections.

3.2.3 Introduction

Streptococcus suis is a common pathogen in pigs that causes meningitis, septicemia, pneumonia, and arthritis (Wertheim, *et al.*, 2009). It occasionally affects humans in close contact with sick or carrier pigs (Wertheim, *et al.*, 2009). Although thirty-five serotypes have been described, serotype 2 is most commonly associated with diseases in pigs and humans (Staats, *et al.*, 1997).

The pathogenesis of *S. suis* infections is not fully understood. The presence of a sialic acid-rich capsule is classically considered as a critical virulence determinant for *S. suis* (Smith, *et al.*, 1999). Proteolytic enzymes play an important role in nutrient acquisition, disruption of the host defense, and tissue destruction by a number of pathogens, making them key virulence factors (Ingmer & Brondsted, 2009). Production of proteases by *S. suis* has been initially reported by Jobin and Grenier (Jobin & Grenier, 2003). The dipeptidyl peptidase IV has been cloned and shown to be a 85-kDa cell-associated serine protease (Jobin, *et al.*, 2005). A surface-associated subtilisin-like protease (SspA) has recently been identified in *S. suis* (Hu, *et al.*, 2009, Bonifait, *et al.*, 2010). Based on the gene sequence, the protease has a calculated molecular mass of 169.6 kDa and contains the catalytic triad typical of subtilisin family proteases: motif I (Asp₂₀₀), motif II (His₂₃₉), and motif III (Ser₅₆₈) (Bonifait, *et al.*, 2010). The protease possesses the Gram-positive cell wall anchoring motif (Leu-Pro-X-Thr-Gly) at the carboxy-terminus, which is followed by a hydrophobic domain (Bonifait, *et al.*, 2010). Gene-inactivated mutants have been used to show that SspA plays a role as a virulence factor since the absence of SspA activity is associated with significantly decreased pathogenicity of *S. suis* in mouse and pig models (Hu, *et al.*, 2009, Bonifait, *et al.*, 2010). Since very little is known about the biochemical and biological properties of this protease, the aim of the present study was to clone, purify and characterize the SspA of serotype 2 *S. suis* P1/7.

3.2.4 Materials and methods

Strains and growth conditions

The strains and plasmids used in this study are listed in Table 3-4. *S. suis* P1/7 (serotype 2) was grown at 37°C in Todd Hewitt broth (THB; BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MA, USA). *Escherichia coli* Top10 was grown in Luria-Bertani medium, while *E. coli* LMG194 was grown in RM medium (adjusted to pH 7.4 with NaOH) containing (per liter) casamino acids (20 g), glucose (2 g), MgCl₂ (0.046 g), Na₂HPO₄ (6 g), KH₂PO₄ (3 g), NaCl (0.5 g), and NH₄Cl (1 g). When necessary, 100 µg/ml of ampicillin and 20 µg/ml of tetracycline were added. *E. coli* cultures were incubated with aeration at 37°C.

DNA purification

Chromosomal DNA was isolated from *S. suis* P1/7 as described by Bonifait *et al.* (Bonifait, *et al.*, 2010). Unless otherwise indicated, DNA manipulations were performed in accordance with standard procedures (Ausubel, *et al.*, 1997). *E. coli* Top10 cells were transformed as described by the supplier using One Shot Top 10-competent cells (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). *E. coli* LMG194 cells were made competent and transformed with plasmid DNA by chemical transformation (Sambrook, *et al.*, 1999). DNA fragments used for sequencing and subcloning were purified using Qiagen purification kits (Qiagen, Mississauga, ON, Canada).

Gene cloning

S. suis P1/7 *SSU0757*, the gene coding for SspA (Bonifait, *et al.*, 2010), was PCR amplified using the forward primer SUB48-X (5'-TAGGAGGAAACTCGAGGAAAAAGAAAGAAA-3'), which contained an engineered XhoI site (underlined), and the reverse primer SUB4816R-S (5'-TTTTCGAAGAGTATGACTATATTTTCTTAG-3'), which contained an engineered SfuI site (underlined). Primer SUB48-X covered positions -14 to 16 relative to the adenine of the ATG initiation codon of *SSU0757*, and primer SUB4816R-S covered positions 4,755 to 4,784. The PCR was performed using a DNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer,

Montreal, QC, Canada) according to the Takara LA Taq reaction protocol of Takara Bio Inc. (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan). After a 1-min incubation at 94°C, the reaction was carried out for 30 cycles with the following temperature-time profile: 94°C for 30 sec, 50°C for 1 min, and 72°C for 5 min. At the end of the amplification process, the samples were incubated at 72°C for 10 min. An amplified 4,798-bp DNA fragment was obtained. After being digested with XhoI and SfuI, the amplicon was cloned into the expression plasmid pBAD/HisB to yield plasmid pSUB56, which was transformed into *E. coli* TOP10. The nucleotide sequence of the DNA fragment cloned into pSUB56 was confirmed by sequencing both DNA strands using the dideoxy chain termination method of Sanger *et al.* (Sanger, *et al.*, 1977). DNA sequencing was carried out by the DNA sequencing service at Université Laval using an ABI Prism 3130XL apparatus (Apparatus Inc., Indianapolis, IN, USA). The plasmid pSUB56 was then used to transform *E. coli* LMG194.

Protein overproduction

E. coli LMG194 [pSUB56] cultures were induced at mid-log phase (optical density of 0.4-0.7 at 600 nm) after growth at 30°C in RM medium supplemented with 100 µg/ml of ampicillin and 20 µg/ml of tetracycline. Inductions were carried out with 0.02% L-arabinose for 16 h. The cells were then harvested by centrifugation at 4°C for 10 min. The cells were resuspended in 25 ml of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 200 mM NaCl. The cell suspension was sonicated (4 x 30 s) on ice with a Sonifier Cell Disruptor W-350 (Heat Systems Ultrasonics, Newtown, CT, USA) using the 50% duty cycle and the pulse cycle mode with the intensity set at 5. The cell-free extract was obtained by centrifugation at 22,000 x g. The cellular extract was then dialyzed using a 50-kDa molecular weight cut-off membrane in 4 liters of 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, and filter-sterilized (0.22 µm).

Protein purification

The cellular extract was applied to a MonoQ 5/50 GL ion exchange column (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC, Canada) connected to an FPLC LKB Controller LCC-500 Plus (Amersham Pharmacia Biotech). The proteins were eluted at 1 ml/min at

room temperature using 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, with a 0 to 500 mM KCl gradient. Fractions were collected and analyzed for SspA activity using a chromogenic assay (see below). Positive fractions were pooled and concentrated at 4°C by ultrafiltration through a NanoSep 30-kDa membrane (Pall, Exton, PA, USA). The concentrated fraction was separated on a Superdex 200 10/300 GL size exclusion column (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrated with 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, and connected to an FPLC LKB Controller LCC-500 Plus. Proteins were eluted at room temperature in the same buffer at 0.5 ml/min. The fractions (0.5 ml) were collected and analyzed for subtilisin-like activity using a chromogenic substrate (see below) and for purity by sodium dodecyl sulfate-10% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Coomassie blue staining. Fractions containing the pure SspA were pooled and stored at -80°C in 10% glycerol.

Bioinformatic analysis of sequence data

Computer-assisted DNA and protein sequence data analyses were performed using the BioEdit software.

Subtilisin-like protease assay

SspA activity was measured using the chromogenic substrate succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide (*p*Na) (2 mg/ml in 50% dimethyl formamide) (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada). One hundred microliters of enzyme prepared in 50 mM Tris-HCl, pH 8, containing 5 mM CaCl₂ were added to 20 µl of substrate, and the mixture was incubated at 37°C for 2 h. The amount of *p*-nitroaniline released was measured by monitoring the absorbance at 415 nm.

Hydrolysis of synthetic peptides

Various synthetic *p*Na-labeled peptides were tested for their susceptibility to the protease: Ala-Ala-Pro-*p*Na, succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*Na, Ala-Pro-*p*Na, Ala-*p*Na, Arg-Pro-*p*Na, Asp-*p*Na, benzoyl-DL-Arg-*p*Na, benzoyl-Pro-Phe-Arg-*p*Na, Glu-Ala-*p*Na, Glu-Gly-*p*Na, Gly-Arg-*p*Na, Gly-Phe-*p*Na, Gly-Pro-*p*Na, Lys-Ala-*p*Na, tosyl-Gly-Pro-Arg-*p*Na, tosyl-Gly-Pro-Lys-*p*Na, Met-*p*Na, succinyl-Ala-Pro-Leu-Phe-*p*Na, succinyl-Phe-*p*Na, and Val-Leu-

Lys-*p*Na. Assay conditions were as described above.

Determination of optimal pH

The activity of the recombinant protease was measured at pH values ranging from 3 to 11 using N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*Na as the substrate. The following 50 mM buffers containing 5 mM CaCl₂ were used: citrate (pH 3-5), Tris-HCl (pH 6-8), and carbonate (pH 9-11).

Determination of optimal temperature and heat stability

The effect of incubation temperature (25, 30, 37, and 45°C) on the degradation of N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*Na by the recombinant protease was evaluated. To determine the effect of heat treatments, the protease preparation was incubated at different temperatures (25, 37, 45, 55, 65, and 80°C) for 30 min prior to measuring its activity. Protease stability at 4, 25, and 37°C (18 h) was also determined.

Effect of protease inhibitors

To identify the class to which the SspA belongs, the effects of the following protease inhibitors were tested: 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF), tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone (TPCK), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), iodoacetamide, trans-epoxysuccinyl-L-leucyl-amido (4-guanidino) butane (E-64), and pepstatin A. Inhibitors were added to the assay mixtures at the optimal concentration suggested by the manufacturer (Table 3-5). All inhibitors were from Sigma-Aldrich Canada Ltd. The degradation of N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*Na was measured following a 2 h incubation as described above.

Gelatin zymography

The recombinant protease was subjected to SDS-PAGE using a 10% polyacrylamide gel containing 0.1% porcine gelatin (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). After electrophoresis, the gel was washed twice with 2.5% Triton X-100 in H₂O and incubated at 37°C overnight in a developing buffer (0.1 M glycine-NaOH, pH 8.3). The gel was stained

for 1 h with Coomassie blue and destained until clear bands became visible.

Degradation of fibrinogen

The capacity of the recombinant protease to cleave fibrinogen was investigated. Human fibrinogen (1 mg/ml) in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8, (5 μ l) was mixed with 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8, containing 10 mM CaCl₂ (5 μ l) and the recombinant protease (5 μ l; 3.3 mg/ml). The mixtures were incubated at 37°C for up to 5 h, and the reaction was terminated by heating at 100°C for 5 min. Fibrinogen degradation was analyzed by SDS-10% PAGE and staining with Coomassie blue.

Fibrin formation

The ability of the SspA to induce fibrin formation from fibrinogen was measured by spectrophotometry. Briefly, 30 μ g of the recombinant protease was incubated with 100 μ l of fibrinogen at 1 mg/ml in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8. In some assays, 0.4 unit of thrombin (Biomed, Mississauga, ON, Canada) was added. After an incubation at 37°C for 1 h, the optical density at 450 nm was determined.

Cytotoxic effect

The cytotoxicity activity of the recombinant subtilisin-like protease was tested on two different cell types: the human brain microvascular endothelial cell (HBMEC) line and the porcine epithelial NPTr cell line (Stins, *et al.*, 1997, Ferrari, *et al.*, 2003). HBMEC were grown in Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI; HyClone, Logan, UT, USA) supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS), 10% Nu-serum IV supplement (BD Biosciences, Bedford, MA, USA), and 50 μ g/ml of penicillin–streptomycin. NPTr were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco), supplemented with supplemented with 10% heat-inactivated FBS and 50 μ g/ml of penicillin–streptomycin. Cultures were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Cell monolayers were treated (48 h) with recombinant subtilisin-like protease at concentrations ranging from 33 μ g/ml to 1.03 μ g/ml. Cell viability was then evaluated with an MTT (3-[4,5-diethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) test performed according to the

manufacturer's protocol (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Immunoreactivity of the recombinant subtilisin-like protease with pig sera

Sera from convalescent 4-week-old piglets that were infected intravenously with 10^7 CFU of a log-phase culture of *S. suis* B735 (serotype 2), 1591 (serotype 2), 31533 (serotype 2) strains were prepared according to the protocol of Esgleas *et al.* (Esgleas, *et al.*, 2009). Animals originated from a farm considered free of *S. suis* serotype 2 infections. Sera from non infected animals were used as negative controls. All animal experiments were conducted according to the guidelines and protocols set by the Canadian Council on Animal Care and approved by the Université de Montréal committee on animal care. The recombinant protease was migrated on a 10% polyacrylamide gel under reducing and denaturing conditions and electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane in the presence of 10 mM *N*-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid buffer, pH 11, and 10% methanol. Five-millimeter-wide nitrocellulose strips were prepared and used for the immunoblot analysis. They were incubated for 1 h at room temperature in blocking buffer (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.5, (TBS) containing 5% skimmed milk). The membranes were washed twice with TBS containing 0.05% Tween 20 (TTBS) and then immersed in pig sera (diluted 1:500 in TTBS containing 2% skimmed milk). After 2 h, with slight agitation, the strips were washed and then incubated for 1 h at room temperature with goat anti-pig-IgG (diluted 1:30,000). The strips were washed and incubated in carbonate buffer (100 mM NaHCO₃, pH 9.8, supplemented with 1 mM MgCl₂, pH 9.8) containing NBT (Nitro-blue tetrazolium chloride; 75 mg/ml) and BICP (5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt; 50 mg/ml) until bands appeared. The reaction was stopped by immersing the strips in tap water.

3.2.5 Results

To characterize the SspA of *S. suis*, the *SSUO757* gene was amplified from serotype 2 *S. suis* P1/7 chromosome and cloned into pBAD/HisB to generate plasmid pSUB56. This

plasmid was transformed into *E. coli* Top10 cells and transformants with the capacity to cleave the chromogenic substrate succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*Na were isolated. One of them was selected to overproduce the protease. Approximately 3.33 mg of recombinant protein were purified from one liter of culture by chromatography. As shown in Figure 3-6, the recombinant protease had a molecular mass of approximately 170 kDa.

The optimum pH for protease activity was 7 (Figure 3-7A). Protease activity decreased significantly below pH 6 and above pH 9. The optimum temperature for protease activity was in the range of 25-37°C (Figure 3-7B). The effect of various heat treatments (30 min) is shown in Figure 3-7. Heating the recombinant protease at 45°C resulted in a 20% reduction of activity while heating at 65°C resulted in a 65% reduction. Heating the protease at 100°C resulted in a total loss of activity. The protease was relatively unstable when incubated at 37°C for 18 h (80% reduction) (Figure 3-7D).

The effects of selective protease inhibitors on the ability of the recombinant enzyme to cleave the chromogenic substrate succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*Na are shown in Table 3-5. The activity was markedly inhibited by the serine protease inhibitors AEBSF and TPCK. Metallo-, cysteine-, and aspartic protease inhibitors had no effect.

The degradation of additional chromogenic peptides (listed in Materials and Methods) by the recombinant enzyme was tested. None of the substrates, including those specific to trypsin-like (benzoyl-DL-Arg-*p*Na) and elastase-like (succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*Na) proteases were cleaved. The gelatin-degrading activity of the recombinant SspA was analyzed by zymography. As shown in Figure 3-8A, a clear band was observed at approximately 170 kDa, indicating that the gelatin was degraded by the recombinant SspA.

The capacity of the SspA to degrade natural proteins was further investigated using fibrinogen. As shown in Figure 3-8B, the protease was active against the A α -chain of the fibrinogen. Degradation occurred rapidly since a marked decrease of the A α -chain band was observed after 5 min of incubation. We also looked at whether the SspA could convert

fibrinogen into fibrin through the above proteolytic cleavage. As reported in Figure 3-9, there was no increase in A_{450} when the protease was incubated with fibrinogen thus indicating the absence of fibrin formation. We then tested the effect of the SspA protease on thrombin-mediated fibrin formation from fibrinogen. As shown in Figure 3-9, in the absence of SspA protease, thrombin induced fibrin formation. The SspA protease dose-dependently prevented the formation of fibrin by thrombin.

The MTT test was used to investigate whether recombinant SspA protease has toxic effects on epithelial and endothelial cells. The results revealed that NPTr epithelial cells viability was not significantly affected following incubation with the *S. suis* subtilisin-like protease, while a significant decrease in viability was observed for the endothelial cells (Figure 3-10). In the presence of 33 $\mu\text{g/ml}$ of protease, the cell viability was reduced by approximately 30%. Decrease in cell viability was statistically significant up to a dose of 4.125 $\mu\text{g/ml}$ subtilisin-like protease.

To investigate whether the SspA of *S. suis* is an important antigen during infection, we tested its reactivity with sera from *S. suis*-infected pigs. As shown in Figure 3-11, all three sera from diseased pigs reacted strongly with the 170 kDa protease while a serum from a healthy pig did not react.

3.2.6 Discussion

Proteases are produced by a variety of microbial pathogens and contribute to virulence through the perturbation of host defense systems and tissue destruction (Maeda, 1996, Ingmer & Brondsted, 2009). Two research groups, including ours, recently reported that *S. suis* mutants deficient in SspA activity are significantly less virulent than the parent strain in animal models (mouse, pig), indicating that SspA contributes to the pathogenicity of this bacterial species (Hu, *et al.*, 2009, Bonifait, *et al.*, 2010). The *SSU0757* gene encodes the SspA, which possesses the Gram-positive cell wall anchoring motif (Leu-Pro-X-Thr-Gly)

at the carboxy-terminus and the catalytic triad characteristic of subtilisin family proteinases: motif I (Asp₂₀₀), motif II (His₂₃₉), and motif III (Ser₅₆₈) (Bonifait, *et al.*, 2010). The gene was identified in all 5 serotypes and 2 untypeables strains tested (Bonifait, *et al.*, 2010). In the present study, we cloned, purified, and characterized the recombinant SspA protease produced by serotype 2 *S. suis* P1/7.

The purified recombinant SspA migrated on SDS-PAGE gels as a single band with a molecular weight of approximately 170 kDa, which confirms the theoretically estimated molecular weight of the SspA of *S. suis*. This is in agreement with previous reports indicating that the molecular weight of subtilisin-like proteases produced by streptococci are in the range of 130-240 kDa (Chen & Cleary, 1990, Bethe, *et al.*, 2001). The optimal conditions for activity of the protease were pH 7 and between 25-37°C. This corresponded to the optimal conditions of the majority of subtilisins described, particularly in streptococci (Fernandez-Espla, *et al.*, 2000). Among the various chromogenic peptides tested, the recombinant SspA was only active against succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*Na, an indication of the high specificity of the protease. Only the serine protease inhibitors were effective in blocking the activity of SspA. This is in agreement with the fact that the subtilisin-like protease family belongs to the serine protease class. Recently Zhang *et al.* (Zhang, *et al.*, 2010) revealed the presence in *S. suis* of a gene homologous to an IgA1 protease with a predicted molecular mass of 154 kDa. This protein was recombinantly expressed in *E. coli* and was found to cleave IgA1 to generate Fc fragments. Sequence analysis between genes coding for the IgA1 protease and the SspA revealed a low percentage of homology (data not shown).

Many reports have been published showing that subtilisin-like proteases produced by pathogenic streptococci are able to degrade natural proteins (Harris, *et al.*, 2003, Edwards, *et al.*, 2005, Hidalgo-Grass, *et al.*, 2006, Karlsson, *et al.*, 2007, Zinkernagel, *et al.*, 2008). In the present study, the recombinant SspA degraded gelatin and fibrinogen. Fibrinogen is a 340-kDa protein composed of three non-identical polypeptide chains (A α , B β and γ) (Mosesson, 2005). Fibrinogen is better known for its role as a binding molecule for platelet

aggregation and as the precursor of insoluble fibrin clots at sites of vessel injury in hemostasis (Mosesson, 2005). Fibrinogen is converted to fibrin through the proteolytic action of thrombin with the release of fibrinopeptides from the A α and B β chains (Pereira, *et al.*, 2002). In the present study, we showed that the SspA of *S. suis* was able to degrade fibrinogen, more specifically the A α chain. This property has also been reported for other subtilisin-like proteases, including those produced by *Treponema denticola* and *Finnegoldia magna* (Bamford, *et al.*, 2007, Karlsson, *et al.*, 2009). Unlike the subtilisin C5a peptidase homologue produced by *S. pneumoniae*, which can convert fibrinogen into fibrin (Harris, *et al.*, 2003), the recombinant SspA produced by *S. suis* cannot mediate fibrin formation. We also showed that the thrombin is unable to form fibrin from fibrinogen in the presence of the recombinant SspA. This has also been reported by Karlsson *et al.*, who recently showed that the subtilisin-like SufA of *F. magna* is able to efficiently cleave fibrinogen and prevent the formation of fibrin networks (Karlsson, *et al.*, 2009). The inability to form fibrin in the presence of the SspA protease may contribute to the role of this protease in the virulence of *S. suis*. Indeed, the SspA of may facilitate the entry of *S. suis* into the blood stream and thus promote septicemia, meningitis, and endocarditis in porcine and humans.

Proteases may exert toxicity towards mammalian cells. Our data revealed that the viability of epithelial cells (NPT_r) was unaffected in the presence of recombinant SspA. In contrast, the recombinant subtilisin-like protease exerted cytotoxic effects on endothelial cells (HBMEC). This may contribute to the ability of *S. suis* to cross the blood brain barrier during the pathogenic process of meningitis.

The detection in the sera of infected pigs of antibodies directed against the recombinant SspA suggested that the protease is expressed *in vivo* and is recognized by the porcine immune system. This provides additional support for a major pathogenic role of this protease as previously demonstrated using SspA-deficient mutants in animal models (Hu, *et al.*, 2009, Bonifait, *et al.*, 2010). Given the evidence suggesting that the SspA of *S. suis* is a major immunogenic factor, it may be a promising candidate for a protein-based vaccine.

In summary, we showed that the 170-kDa SspA of *S. suis* has biochemical properties similar to subtilisins produced by other microorganisms, specifically pathogenic streptococci. It possesses high protein cleavage specificity, but can degrade the A α chain of fibrinogen and, consequently, inhibit thrombin-mediated fibrin formation. It also stimulates the production of antibodies in response to *S. suis* infections in pigs and therefore additional studies should investigate whether it represent a promising candidate for a protein-based vaccine.

3.2.7 Acknowledgments

This study was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). We thank Annie Marquis for her technical assistance.

3.2.8 References

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., 1997, Current protocols in molecular biology. Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, N.Y.
- Bamford, C.V., Fenno, J.C., Jenkinson, H.F., Dymock, D., 2007, The chymotrypsin-like protease complex of *Treponema denticola* ATCC 35405 mediates fibrinogen adherence and degradation. *Infect Immun* 75, 4364-4372.
- Bethe, G., Nau, R., Wellmer, A., Hakenbeck, R., Reinert, R.R., Heinz, H.P., Zysk, G., 2001, The cell wall-associated serine protease PrtA: a highly conserved virulence factor of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* 205, 99-104.
- Bonifait, L., de la Cruz Dominguez-Punaro, M., Vaillancourt, K., Bart, C., Slater, J., Frenette, M., Gottschalk, M., Grenier, D., 2010, The cell envelope subtilisin-like proteinase is a virulence determinant for *Streptococcus suis*. *BMC Microbiol* 10, 42.

- Chen, C.C., Cleary, P.P., 1990, Complete nucleotide sequence of the streptococcal C5a peptidase gene of *Streptococcus pyogenes*. J Biol Chem 265, 3161-3167.
- Edwards, R.J., Taylor, G.W., Ferguson, M., Murray, S., Rendell, N., Wrigley, A., Bai, Z., Boyle, J., Finney, S.J., Jones, A., Russell, H.H., Turner, C., Cohen, J., Faulkner, L., Sriskandan, S., 2005, Specific C-terminal cleavage and inactivation of interleukin-8 by invasive disease isolates of *Streptococcus pyogenes*. J Infect Dis 192, 783-790.
- Esgleas, M., Dominguez-Punaro Mde, L., Li, Y., Harel, J., Dubreuil, J.D., Gottschalk, M., 2009, Immunization with SsEno fails to protect mice against challenge with *Streptococcus suis* serotype 2. FEMS Microbiol Lett 294, 82-88.
- Fernandez-Espla, M.D., Garault, P., Monnet, V., Rul, F., 2000, *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. Appl Environ Microbiol 66, 4772-4778.
- Ferrari, M., Scalvini, A., Losio, M.N., Corradi, A., Soncini, M., Bignotti, E., Milanesi, E., Ajmone-Marsan, P., Barlati, S., Bellotti, D., Tonelli, M., 2003, Establishment and characterization of two new pig cell lines for use in virological diagnostic laboratories. J Virol Methods 107, 205-212.
- Harris, T.O., Shelver, D.W., Bohnsack, J.F., Rubens, C.E., 2003, A novel streptococcal surface protease promotes virulence, resistance to opsonophagocytosis, and cleavage of human fibrinogen. J Clin Invest 111, 61-70.
- Hidalgo-Grass, C., Mishalian, I., Dan-Goor, M., Belotserkovsky, I., Eran, Y., Nizet, V., Peled, A., Hanski, E., 2006, A streptococcal protease that degrades CXC chemokines and impairs bacterial clearance from infected tissues. EMBO J 25, 4628-4637.
- Hu, Q., Liu, P., Yu, Z., Zhao, G., Li, J., Teng, L., Zhou, M., Bei, W., Chen, H., Jin, M., 2009, Identification of a cell wall-associated subtilisin-like serine protease involved in the pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. Microb Pathog.
- Ingmer, H., Brondsted, L., 2009, Proteases in bacterial pathogenesis. Res Microbiol 160, 704-710.
- Jobin, M.C., Grenier, D., 2003, Identification and characterization of four proteases produced by *Streptococcus suis*. FEMS Microbiol Lett 220, 113-119.

- Jobin, M.C., Martinez, G., Motard, J., Gottschalk, M., Grenier, D., 2005, Cloning, purification, and enzymatic properties of dipeptidyl peptidase IV from the swine pathogen *Streptococcus suis*. *J Bacteriol* 187, 795-799.
- Karlsson, C., Andersson, M.L., Collin, M., Schmidtchen, A., Bjorck, L., Frick, I.M., 2007, SufA--a novel subtilisin-like serine proteinase of *Fingoldia magna*. *Microbiology* 153, 4208-4218.
- Karlsson, C., Morgelin, M., Collin, M., Lood, R., Andersson, M.L., Schmidtchen, A., Bjorck, L., Frick, I.M., 2009, SufA - a bacterial enzyme that cleaves fibrinogen and blocks fibrin network formation. *Microbiology* 155, 238-248.
- Maeda, H., 1996, Role of microbial proteases in pathogenesis. *Microbiol Immunol* 40, 685-699.
- Mosesson, M.W., 2005, Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost* 3, 1894-1904.
- Pereira, M., Rybarczyk, B.J., Odrliin, T.M., Hocking, D.C., Sottile, J., Simpson-Haidaris, P.J., 2002, The incorporation of fibrinogen into extracellular matrix is dependent on active assembly of a fibronectin matrix. *J Cell Sci* 115, 609-617.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1999, *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. . Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Smith, H.E., Damman, M., van der Velde, J., Wagenaar, F., Wisselink, H.J., Stockhofe-Zurwieden, N., Smits, M.A., 1999, Identification and characterization of the cps locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. *Infect Immun* 67, 1750-1756.
- Staats, J.J., Feder, I., Okwumabua, O., Chengappa, M.M., 1997, *Streptococcus suis*: past and present. *Vet Res Commun* 21, 381-407.
- Stins, M.F., Prasadarao, N.V., Zhou, J., Arditi, M., Kim, K.S., 1997, Bovine brain microvascular endothelial cells transfected with SV40-large T antigen: development of an immortalized cell line to study pathophysiology of CNS disease. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 33, 243-247.

- Wertheim, H.F., Nghia, H.D., Taylor, W., Schultsz, C., 2009, *Streptococcus suis*: an emerging human pathogen. Clin Infect Dis 48, 617-625.
- Zhang, A., Mu, X., Chen, B., Liu, C., Han, L., Chen, H., Jin, M., Identification and characterization of IgA1 protease from *Streptococcus suis*. Vet Microbiol 140, 171-175.
- Zinkernagel, A.S., Timmer, A.M., Pence, M.A., Locke, J.B., Buchanan, J.T., Turner, C.E., Mishalian, I., Sriskandan, S., Hanski, E., Nizet, V., 2008, The IL-8 protease SpyCEP/ScpC of group A *Streptococcus* promotes resistance to neutrophil killing. Cell Host Microbe 4, 170-178.

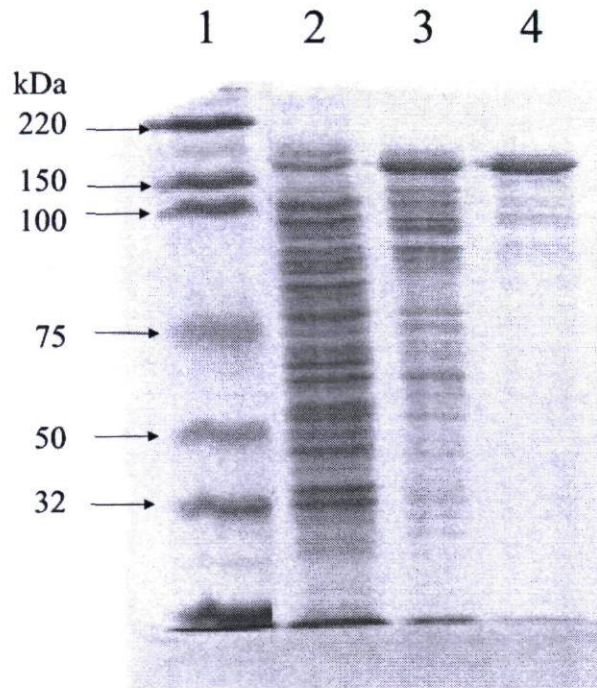


Figure 3-6: SDS-PAGE analysis with Coomassie blue staining of the recombinant subtilisin-like protease (SspA) of *S. suis*. Lane 1, molecular weight markers; Lane 2, *E. coli* cell lysate from an induced culture; Lane 3, partially purified protease following ion exchange chromatography; Lane 4, purified protease (3 μ g).

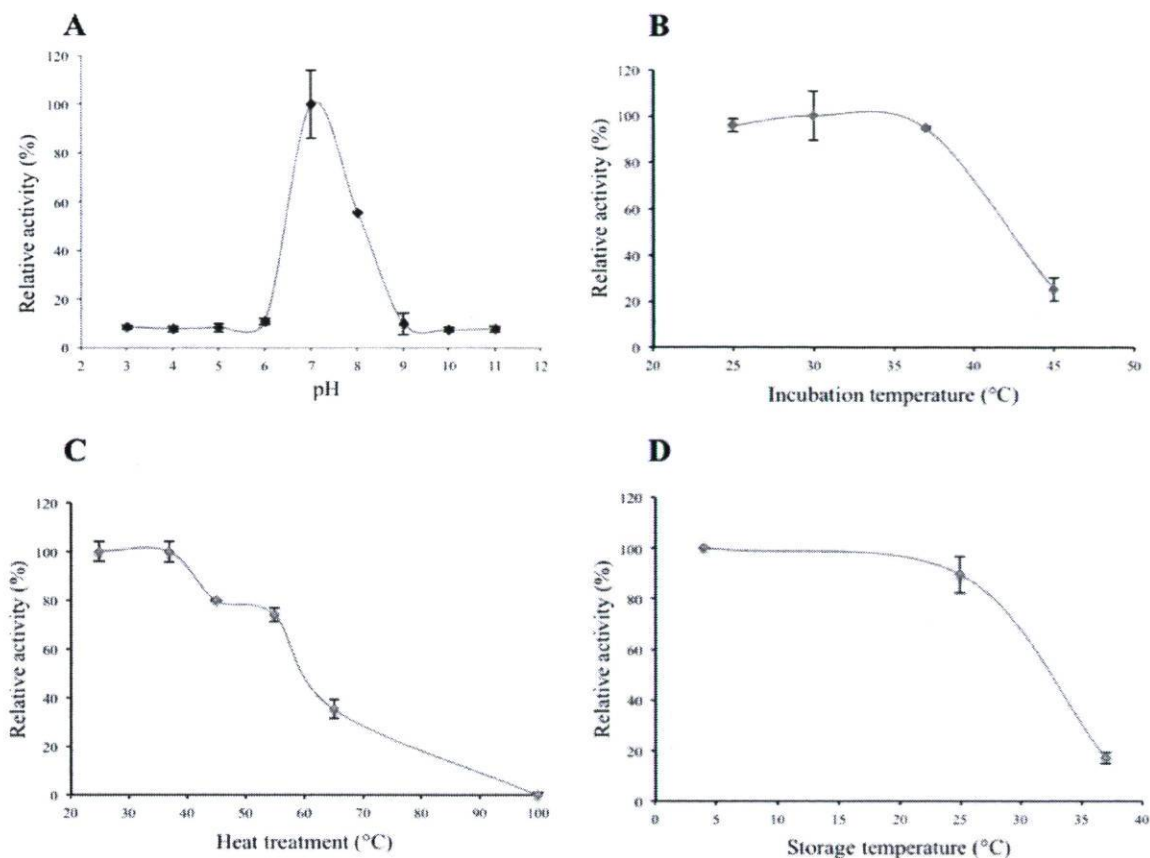


Figure 3-7: Effects of treatments or conditions on the activity of the recombinant subtilisin-like protease (SspA) of *S. suis* measured using the chromogenic substrate N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNa. Panel A: pH values ranging from 3 to 11; Panel B: Incubation at temperatures ranging from 25 to 45°C. Panel C: Heat treatments (30 min) at temperatures ranging from 25 to 80°C. (Panel D): Stability at different temperatures (4, 25, and 37°C for 18 h).

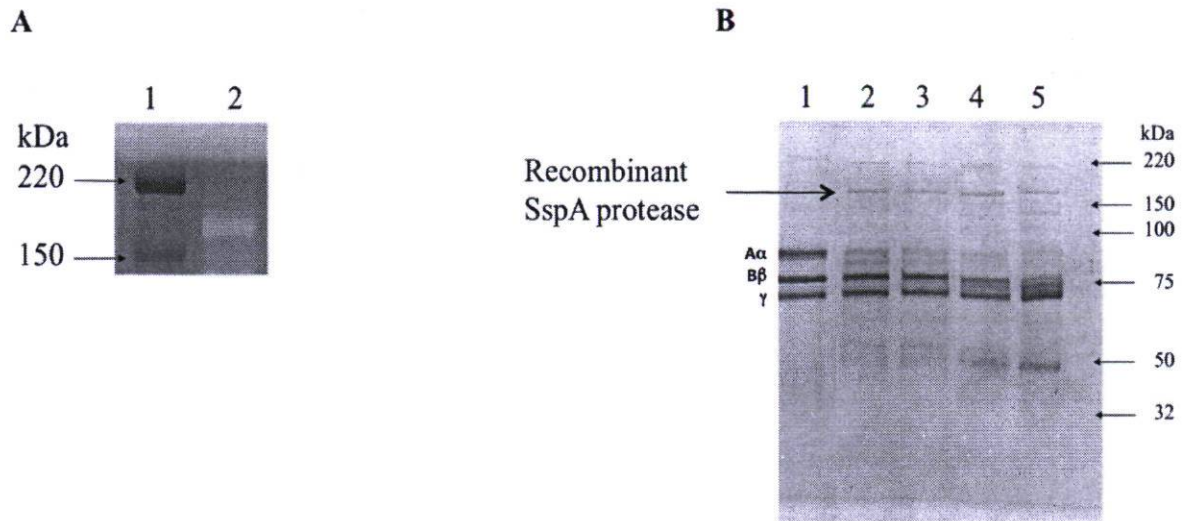


Figure 3-8: Degradation of gelatin and human fibrinogen by the recombinant subtilisin-like protease (SspA) of *S. suis*. Panel A: Gelatin degradation determined by zymography. Lane 1, molecular weight marker; lane 2, recombinant SspA protease. Panel B: Fibrinogen degradation determined by SDS-PAGE and Coomassie blue staining. Lane 1, fibrinogen; Lane 2, protease + fibrinogen for 5 min; Lane 3, protease + fibrinogen for 15 min; Lane 4, protease + fibrinogen for 1 h; Lane 5, protease + fibrinogen for 5 h.

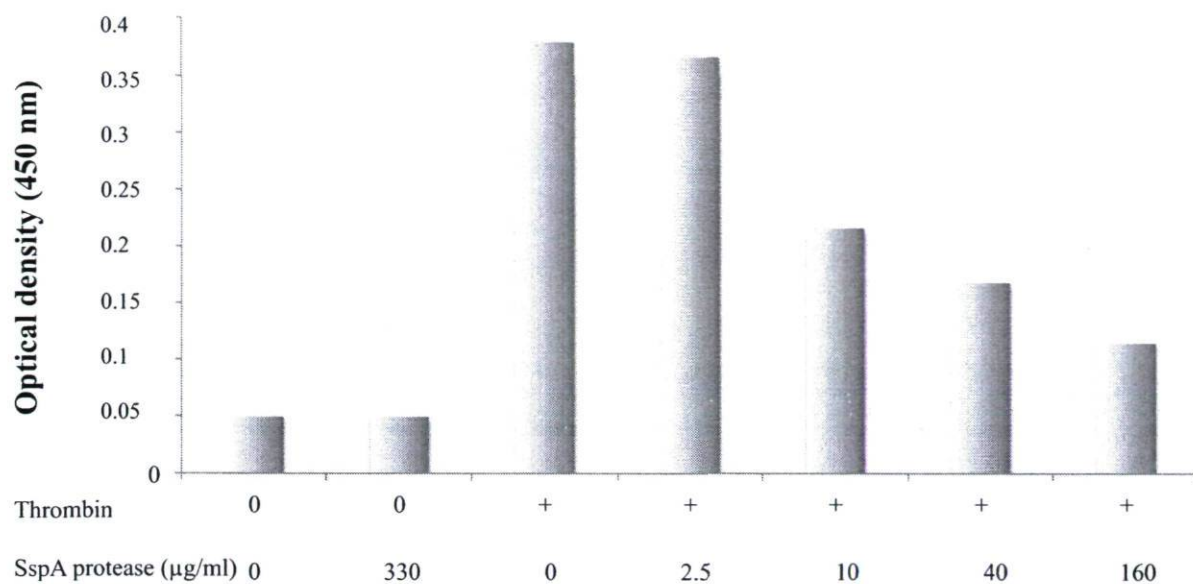


Figure 3-9: Effect of the recombinant subtilisin-like protease (SspA) of *S. suis* on fibrin formation from fibrinogen and on thrombin-mediated fibrin formation from fibrinogen. Fibrin formation from fibrinogen was determined by monitoring A_{450} following incubation at 37°C for 1 h.

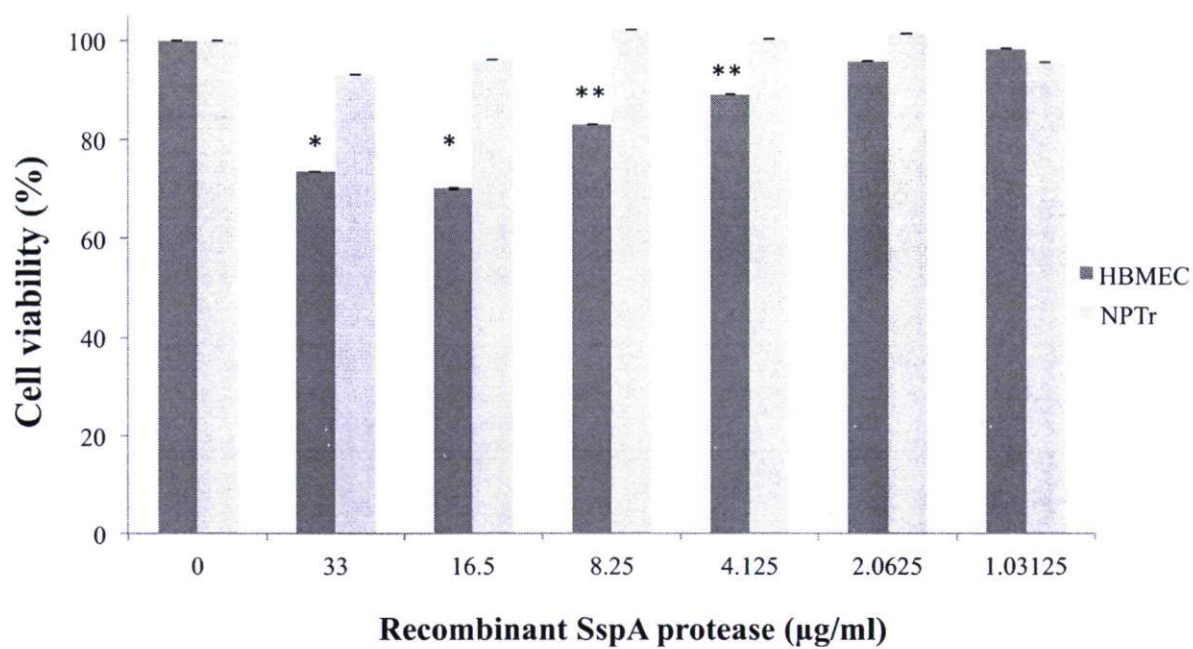


Figure 3-10: Effect of the recombinant subtilisin-like protease (SspA) of *S. suis* on viability of HBMEC and NPTr cells following a 48 h treatment. Cell viability was then evaluated with an MTT (3-[4,5-diethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Asterisks indicate a significant difference between control and stimulated cells (*P < 0.01 ; ** P < 0.05).

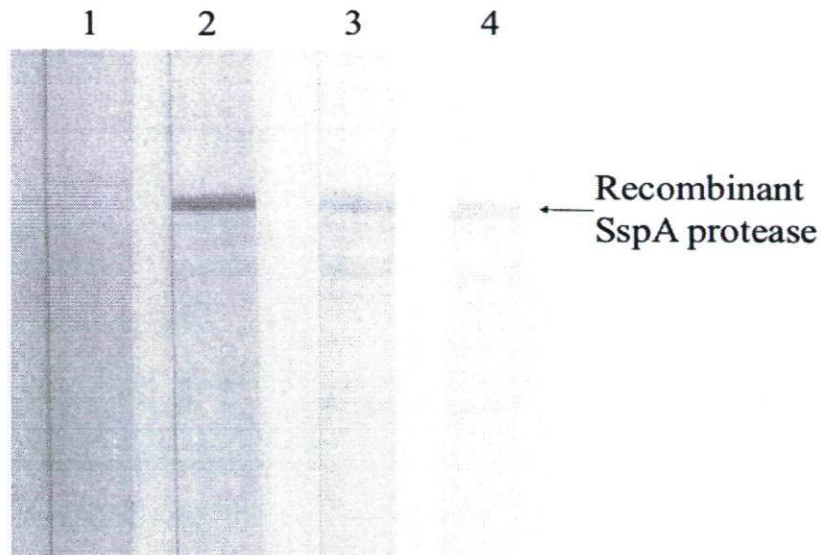


Figure 3-11: Identification of the subtilisin-like protease (SspA) of *S. suis* by porcine sera, as determined by SDS-PAGE and Western immunoblotting. Lane 1, serum of normal pig; Lane 2, serum from a pig infected with *S. suis* B735; Lane 3, serum from a pig infected with *S. suis* 1591; Lane 4, serum from a pig infected with *S. suis* 31533.

Table 3-4: Strains and plasmids used in the study.

Strain or plasmid	Relevant genotype or characteristics ^a	Source or reference
Strain		
<i>S. suis</i> P1/7	Wild type	M. Gottschalk
<i>E. coli</i> Top10	F ⁻ , <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\phi 80lacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(ara-leu7697)$, <i>galU</i> , <i>rpsL</i> , <i>endA1</i> , <i>mupG</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> LMG194	F ⁻ , $\Delta lacX74$, <i>galE</i> , <i>thi</i> , <i>rpsL</i> , $\Delta phoA$, (<i>pvuII</i>), $\Delta ara714$, <i>leu::Tn10</i> (Tet ^r)	Invitrogen
Plasmid		
pBAD/HisB	Expression vector, Amp ^r	Invitrogen
pSUB56	Contains the <i>SSU057</i> gene of <i>S. suis</i> P1/7 cloned into pBAD/HisB	This work

^a Amp^r, ampicillin resistance ; Tet^r, tetracycline resistance.

Table 3-5: Effect of protease inhibitors on degradation of the chromogenic substrate N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNa by the recombinant subtilisin-like protease (SspA) of *S. suis*.

Inhibitor	Specificity	Concentration (mM)	Inhibition (%)
Control	-	-	0
AEBSF	Serine protease	10	75 ± 1.5
TPCK	Serine protease	10	66 ± 1
EDTA	Metalloprotease	10	2 ± 0.5
Iodoacetamide	Cysteine protease	10	No inhibition
E-64	Cysteine protease	0.1	No inhibition
Pepstatin A	Aspartic protease	0.1	No inhibition

3.3 Article 6: The SspA subtilisin-like protease of *Streptococcus suis* triggers a pro-inflammatory response in macrophages through a non-proteolytic mechanism

Article publié en 2011 dans la revue BioMed Central Microbiology, sous la reference 1;11(1):47.

Laetitia Bonifait^{1,2} and Daniel Grenier^{1,2*}

¹Groupe de Recherche en Écologie Buccale (GREB), Faculté de médecine dentaire, Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada;

²Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT), Quebec, Canada

Short title: *S. suis* SspA induces cytokine response

* Corresponding author. Mailing address: Groupe de Recherche en Écologie Buccale, Faculté de médecine dentaire, Université Laval, 2420 Rue de la Terrasse, Quebec City, Quebec, Canada, G1V 0A6

Phone: (418) 656-7341. Fax: (418) 656-2861. E-mail: Daniel.Grenier@greb.ulaval.ca

3.3.1 Résumé

INTRODUCTION: *Streptococcus suis* est un important pathogène du porc, responsable de méningites, septicémies, arthrites et endocardites. Dans un modèle animal murin, la pseudo-subtilisine (SspA) de *S. suis*, une protéase de surface s'est révélée être un important facteur de virulence pour *S. suis*. Dans cette étude, nous avons émis l'hypothèse que la pseudo-subtilisine SspA de *S. suis* pouvait moduler la sécrétion de cytokines par les macrophages contribuant ainsi au processus pathogénique de la méningite.

RESULTATS: Les macrophages U937 différenciés à l'aide du phorbol 12-myristate 13-acétate ont été stimulés avec la protéine recombinante SspA, puis la sécrétion de cytokines a été mesurée par dosage ELISA. Nos résultats ont révélé que la SspA recombinante est en mesure d'induire de manière dose-dépendante la sécrétion d'IL-1 β , IL-6, TNF- α , CXCL8 et CCL5 par les macrophages. La protéase inactivée par la chaleur était encore capable d'induire la sécrétion de cytokines suggérant un mécanisme non-protéolytique de l'activation des macrophages. En utilisant des inhibiteurs spécifiques de kinases, il a pu être mis en évidence que la sécrétion de cytokines par les macrophages stimulés avec la SspA recombinante impliquait la voie de transduction des MAP-kinases (mitogen-activated protein-kinase). Bien que la stimulation des macrophages avec de faibles concentrations de SspA recombinante ait été associée à la sécrétion de grandes quantités de CCL5, l'utilisation de la SspA recombinante à une concentration élevée a conduit à la détection de faibles quantités de CCL5. Cela s'est avéré être la conséquence d'une dégradation protéolytique du CCL5 par la SspA. La capacité de la SspA à induire la sécrétion de cytokines par les macrophages a été confirmée en utilisant un mutant de *S. suis* déficient dans l'expression de la SspA.

CONCLUSION: En conclusion, cette étude a identifié un nouveau mécanisme par lequel la protéase SspA de *S. suis* peut favoriser l'inflammation du système nerveux central et ainsi contribuer à la méningite.

3.3.2 Abstract

BACKGROUND: *Streptococcus suis* is a major swine pathogen worldwide that causes meningitis, septicemia, arthritis, and endocarditis. Using animal models, a surface-associated subtilisin-like protease (SspA) has recently been shown to be an important virulence factor for *S. suis*. In this study, we hypothesized that the *S. suis* SspA subtilisin-like protease may modulate cytokine secretion by macrophages thus contributing to the pathogenic process of meningitis.

RESULTS: Phorbol 12-myristate 13-acetate-differentiated U937 macrophages were stimulated with recombinant SspA prior to monitor cytokine secretion by ELISA. Our results indicated that the recombinant SspA was able to dose-dependently induce IL-1 β , IL-6, TNF- α , CXCL8 and CCL5 secretion in macrophages. The heat-inactivated protease was still able to induce cytokine secretion suggesting a non-proteolytic mechanism of macrophage activation. Using specific kinase inhibitors, evidence were brought that cytokine secretion by macrophages stimulated with the recombinant SspA involves the mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. While stimulation of macrophages with low concentrations of recombinant SspA was associated to secretion of high amounts of CCL5, the use of recombinant SspA at a high concentration resulted in low amounts of CCL5 detected in the conditioned medium. This was found to be associated with a proteolytic degradation of CCL5 by SspA. The ability of SspA to induce cytokine secretion in macrophages was confirmed using a mutant of *S. suis* deficient in SspA expression.

CONCLUSION: In conclusion, this study identified a new mechanism by which the *S. suis* SspA may promote central nervous system inflammation associated with meningitis.

3.3.3 Background

Streptococcus suis is a major swine pathogen worldwide that causes meningitis, septicemia, arthritis, and endocarditis [1]. *S. suis* infections in humans remain sporadic and affect mainly individuals in close contact with sick or carrier pigs or pig-derived products, typically pig farmers, veterinary personnel, abattoir workers, and butchers [2]. However, the important outbreak that occurred in China in 1998 and 2005 modified the world perspective regarding the threat of *S. suis* for humans [3, 4]. *S. suis* is transmitted via the respiratory route and colonizes the palatine tonsils of pigs. While 35 serotypes (1 to 34 and 1/2) have been identified, serotype 2 is considered the most frequently associated with pathology [5], although other serotypes are also the source of many infections [6-8].

Various potential virulence factors produced by *S. suis* have been identified, including a sialic acid-rich capsule [9], an hemolysin (suilysin) [10], adhesins [11, 12], and proteolytic enzymes [13, 14]. Our laboratory recently reported on the cloning of a 170 kDa subtilisin-like protease (SspA) found on the cell surface of *S. suis* [15]. This protease was found to possess a high protein cleavage specificity and can degrade the A α chain of fibrinogen thus preventing thrombin-mediated fibrin formation [15]. Using animal models and deficient-mutants, the surface-associated SspA was found to play a key role as virulence factor for *S. suis* [16, 17]. However, the exact contribution of the SspA in the pathogenic process of *S. suis* infections has not been clearly defined.

To cause meningitis, *S. suis* must first cross the mucosal barrier, enter the bloodstream, resist to host defense mechanisms in the intravascular space, invade the blood-brain barrier, and then replicate in the subarachnoidal space [18]. Once the bacteria reach the blood-brain barrier, the secretion of proinflammatory cytokines, by host cells may contribute to increasing the permeability of this barrier [18-20]. A number of studies have reported that *S. suis* can induce the secretion of high amounts of proinflammatory cytokines by host cells, including monocytes/macrophages [19-21]. This excessive production of proinflammatory cytokines has been suggested to play a key role in pathogenesis of both

systemic and central nervous system infections and to contribute to the pathogenic processes of meningitis [22, 23]. The aim of this study was to investigate the capacity of the *S. suis* SspA subtilisin-like protease to modulate cytokine secretion by macrophages.

3.3.4 Methods

Strains and growth conditions

S. suis P1/7 (serotype 2) as well as a SspA deficient mutant (G6G) were used in this study. Mutant G6G was selected from a mutant library constructed using the pTV408 temperature-sensitive suicide vector to deliver the Tn917 transposon into *S. suis* P1/7 via electroporation [16]. This mutant is unable to degrade the chromogenic substrate (N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNa; Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, CANADA) specific for subtilisin-like proteases and showed a single Tn917 insertion into the gene coding for the SSU0757 protein in the genome of *S. suis* P1/7 [16]. Bacteria were grown at 37°C in Todd Hewitt broth (THB; BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MA, USA).

Preparation of recombinant SspA of *S. suis*

The subtilisin-like protease SspA of *S. suis* was cloned, purified, and characterized in a previous study [15]. Briefly, the *SSU0757* gene encoding the SspA was amplified and a 4,798-bp DNA fragment was obtained. It was cloned into the expression plasmid pBAD/HisB and then inserted into *Escherichia coli* to overproduce the protein. The recombinant protease was purified by chromatography procedures and showed a molecular weight of 170 kDa. Using a chromogenic *Limulus* amoebocyte lysate assay (Associates of Cape Cod, Inc., East Falmouth, MA), the SspA preparation was found to contain less than 5 ng endotoxin/ml.

Cultivation of monocytes and preparation of macrophage-like cells

The monoclastic leukemia cell line U937 (ATCC CRL-1593.2; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) was cultivated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere in RPMI-

1640 medium (HyClone Laboratories, Logan, UT, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; RPMI-FBS) and 100 µg/ml penicillin–streptomycin. Monocytes (2×10^5 cells/ml) were incubated in RPMI-FBS containing 10 ng/ml of phorbol 12-myristic 13-acetate (PMA) for 48 h to induce differentiation into adherent macrophage-like cells [24]. Following the PMA treatment, the medium was replaced with fresh medium and differentiated macrophages were incubated for an additional 24 h prior to use. Adherent macrophages were suspended in RPMI-FBS and centrifuged at 200 x g for 5 min. The cells were washed, suspended at a density of 1×10^6 cells/ml in RPMI supplemented with 1% heat-inactivated FBS and seeded in a 96 well-plate (1×10^6 cells/well/0.2 ml) at 37°C in 5% CO₂ atmosphere for 2 h prior to treatments.

Treatment of macrophages

PMA-differentiated U937 macrophages were treated with recombinant SspA at concentrations ranging from 0.00033 to 33 µg/ml. Stimulation was also performed using the recombinant SspA treated at 100°C for 30 min to inactivate the catalytic activity or in the presence of polymyxin B (1 µg/ml) to exclude any contribution of contaminating LPS in macrophage stimulation. As a control, pancreatic trypsin (Sigma-Aldrich Canada Ltd.) was used in the same range of concentrations (0.00033 to 33 µg/ml). Lastly, PMA-differentiated U937 macrophages were also stimulated with *S. suis* P1/7 and G6G cells at a multiplicity of infection (MOI) of 100. All treatments were carried out for 18 h in a 5% CO₂ atmosphere.

Determination of macrophage viability

Following treatments with either the recombinant SspA or bacterial cells, cell viability was evaluated with an MTT (3-[4,5-diethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) test performed according to the manufacturer's protocol (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Determination of cytokine secretion

Commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (R&D Systems,

Minneapolis, MN, USA) were used to quantify IL-1 β , IL-6, TNF- α , CCL5, and CXCL8 concentrations in the cell-free culture supernatants according to the manufacturer's protocols. The absorbance at 450 nm was read using a microplate reader with the wavelength correction set at 550 nm. The rated sensitivities of the commercial ELISA kits were 3.9 pg/ml for IL-1 β , 9.3 pg/ml for IL-6, 15.6 pg/ml for TNF- α and CCL5, and 31.2 pg/ml for CXCL8.

Determination of cytokine degradation

Degradation of IL-6, CXCL8, and CCL5 by the recombinant SspA was assessed by ELISA. Briefly, recombinant cytokines (300 pg/ml of IL-6, 250 pg/ml of CXCL8, or 500 pg/ml of CCL5,) were incubated with the recombinant SspA at concentrations ranging from 0.26 to 16.5 μ g/ml for 4 h. Following incubation, residual cytokines were quantified by ELISA as described above.

Effect of kinase inhibitors on cytokine secretion

Specific kinase inhibitors (Calbiochem, Mississauga, ON, Canada) used at the optimal concentration recommended by the manufacturer (0.0625 μ M) were added to macrophages 2 h prior to being treated with the recombinant SspA (0.33 μ g/ml) for 18 h. The inhibitors SB203580 [p38 mitogen-activated kinase (p38MAPK) inhibitor], UO126 [mitogen-activated extracellular kinase 1, 2 (MEK 1, 2) inhibitor] and JNK inhibitor II [c-JUN N-terminal kinase (JNK) inhibitor], were evaluated for their effect on IL-6, CXCL8, and CCL5 secretion by macrophages.

Statistical analysis

All treatments and cytokine determination were performed in triplicate and the means \pm standard derivations were calculated. Differences were analyzed for statistical significance using the Student's t-test and were considered significant at $P < 0.01$.

3.3.5 Results

Prior to determine the capacity of the recombinant SspA of *S. suis* to induce an inflammatory response in PMA-differentiated U937 macrophages, its effect on cell viability was evaluated. The MTT test revealed that macrophage viability was not significantly reduced (less than 20%) by a treatment with the recombinant SspA at a concentration of up to 33 µg/ml. As reported in Figure 3-12 A-C, a significant dose-dependent secretion of all three pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α was observed following stimulation of macrophages with the recombinant SspA. More specifically, treatment of macrophages with SspA at 0.33 µg/ml resulted in a 2-fold, 55-fold and 7-fold increase of IL-1 β , IL-6 and TNF- α levels, respectively. In addition, there was a significant dose-dependent increase of CXCL8 and CCL5 secretion by macrophages stimulated with the recombinant SspA. The levels of CXCL8 (Figure 3-12) increased by 17-fold while that of CCL5 (Figure 3-12 E) increased by 15-fold when the recombinant SspA was used at 0.33 µg/ml (Figure 3-12 D-E). In contrast, when the macrophages were stimulated with pancreatic trypsin instead of recombinant SspA, no increase in cytokine secretion was observed (Figure 1). When macrophages were stimulated with the recombinant SspA at the highest concentration (33 µg/ml), a very low amount of CCL5, which correspond to that of non-stimulated macrophages was detected. This decrease in cytokine production was also observed for IL-6 but to a much lesser extent (Figure 3-12 B).

The effect of stimulating macrophages with heat-inactivated recombinant SspA or with active SspA in the presence of polymyxin (LPS neutralizing molecule) on the secretion of IL-6, CXCL8 and CCL5, the three cytokines produced in higher amounts by macrophages, was then tested. As reported in Table 3-4, the secretion of IL-6 and CXCL8 was significantly increased after stimulation of macrophages with the active recombinant SspA (33 µg/ml) while only a slight increase was observed in the case of CCL5. The amounts of IL-6 and CXCL8 produced by macrophages were not markedly different when the recombinant SspA of *S. suis* was inactivated by heat treatment (30 min at 100°C). However, stimulation of macrophages with the heat-inactivated SspA was associated with a

significantly higher amount of CCL5 in the conditioned culture medium compared to the treatment with the active recombinant SspA (72409 ± 848 versus 2370 ± 61 pg/ml). Lastly, the presence of polymyxin B during stimulation of macrophages with the recombinant SspA protease had no significant effect on the levels of cytokine produced. The efficacy of polymyxin B ($1 \mu\text{g/ml}$) in neutralizing the inflammatory activity of *Escherichia coli* LPS was demonstrated in preliminary assays.

To further support the inflammatory property of the recombinant SspA, we compared the SspA-deficient mutant G6G and the parental strain for their capacity to induce of IL-1 β , TNF- α , IL-6, CXCL8 and CCL5 secretion in macrophages. The MTT test revealed that macrophage viability was not significantly reduced (less than 10%) by a treatment with cells of *S. suis* P1/7 or G6G at MOI of 100. As reported in Table 3-5, the amounts of IL-1 β , TNF- α and IL-6 secreted by macrophages were significantly lower for the SspA-deficient mutant compared to the parental strain. More specifically, IL-1 β , TNF- α and IL-6 production were decreased by 26%, 43% and 41%, respectively. In contrast, the amounts of CCL5 and to a lesser extent CXCL8 were significantly higher when macrophages were stimulated with SspA-deficient mutant (G6G) compared to the parental strain.

Lastly we investigated the capacity of the SspA protease to degrade CCL5, IL-6 and CXCL8, the three cytokines produced in higher amounts by macrophages stimulated with the recombinant SspA. Recombinant cytokines were incubated with the SspA protease at concentrations ranging from 0.26 to 16.5 $\mu\text{g/ml}$ and after 4 h, residual cytokines were determined by ELISA (Figure 3-13). There was a significant decrease in amounts of CCL5 in presence of SspA, even at low concentrations ($0.26 \mu\text{g/ml}$). Moreover, a decrease of approximately 20% was also noticed for IL-6 treated with SspA at 16.5 $\mu\text{g/ml}$. In contrast, there was no decrease for CXCL8 following incubation with SspA.

Thereafter, in order to identify the mechanism by which the recombinant SspA may activate macrophages, the effect of selected kinase inhibitors on the secretion of IL-6, CXCL8 and CCL5 by macrophages was investigated. As reported in Figure 3-14, a

complete inhibition of CCL5 and CXCL8 secretion was observed in the presence of SB203580, an inhibitor specific to p38 mitogen-activated kinase (p38 MAPK). The secretion of IL-6 by this kinase inhibitor was decreased by 28% while it was decreased by 85% with the JNK inhibitor.

3.3.6 Discussion

S. suis is a swine pathogen responsible for several infections including meningitis, endocarditis and septicemiae, and is also an important agent for zoonosis [1]. Recently, a subtilisin-like protease, named SspA, was identified as a virulence factor in *S. suis*. This was based on the fact that SspA deficient mutants were significantly less pathogenic in animal models [16, 17]. In the present study, we sought to determine the capacity of *S. suis* SspA to induce an inflammatory response in U937 macrophages.

We showed that recombinant SspA induced the secretion of IL-1 β , TNF- α , IL-6, CXCL8 and CCL5 by macrophages. This significant cytokine secretion may be of utmost importance in *S. suis*-induced meningitis. Indeed, Lopes-Cortes *et al.*, demonstrated that IL-1 β and TNF- α are present in the cerebrospinal fluid and that high levels of these cytokines correlate with the neurological complications [25]. More specifically, IL1- β can enhance the permeability of the blood–brain barrier [26]. Moreover, high levels in local body fluids and in serum of IL-6 and TNF- α are associated with a fatal outcome [27]. Moller *et al.*, also reported that the cerebrospinal fluid of patients suffering from bacterial meningitis contains much higher levels of chemokines, including CXCL8 [28].

To ensure that cytokine secretion by SspA-stimulated macrophages did not result from LPS contaminants, polymyxin B, an LPS-reacting molecule [29], was included during stimulation. Results showed that polymyxin B, did not inhibit cytokine secretion thus suggesting that this stimulation is induced by the recombinant SspA protease only. This

ability of the recombinant SspA to induced cytokine secretion in macrophages was found to be highly specific since it was not observed with the pancreatic trypsin used as a control.

Proteases can induce the secretion of inflammatory mediators in mammalian cells by two ways: action on proteinase-activated receptors (PARs) or through a non-proteolytic mechanism, involving the mitogen-activated protein kinases (MAPK) [30, 31]. Several proteases have been identified as signaling molecules that specifically regulate members of PARs, a family of seven transmembrane domains G-protein-coupled receptors [32, 33]. This family includes four members: PAR-1, PAR-3 and PAR-4 are receptors for thrombin, trypsin or cathepsin G, while PAR-2 is resistant to thrombin, but can be activated by trypsin, mast cell tryptase [30, 34-36]. Since the heat-inactivated SspA still possessed the capacity to induce cytokine secretion in macrophages, the involvement of PARs could be ruled out. We thus investigated whether the SspA may induce cytokine secretion through activation of MAP kinases. More specifically, there are three major groups of MAPK in mammalian cells: the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK), the p38 MAPK and the c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) [31]. Our results obtained by including kinase inhibitor during stimulation of macrophages with the recombinant SspA suggested that the production of CCL5 and CXCL8 was regulated by p38 MAPK while the production of IL-6 was mostly regulated by JNK. MAPK are known as key regulators for the synthesis of numerous cytokines, chemokines, and other inflammatory mediators [31]. Previous studies also suggested a similar involvement of the MAPK regulatory pathway in inflammatory responses induced by *S. suis* [37-39]. In agreement with our observations, the cysteine proteinases of *Porphyromonas gingivalis* was also reported to use the MAPK transduction pathway to induce cytokine secretion in macrophages [40] and fibroblasts [41].

Our data showed that the amounts of CCL5 in the conditioned medium of macrophages stimulated with the heat-inactivated recombinant SspA was higher compared to that detected following stimulation with the active SspA. This suggests that SspA may degrade this cytokine. Using ELISA, we clearly showed the capacity of the recombinant SspA to degrade dose-dependently CCL5. Since CCL5 possesses chemotactic activity for immune

cells, its inactivation by the SspA may allow *S. suis* to avoid and delay neutrophil attraction and activation. Cytokine degradation by proteases is a phenomenon well described in group A streptococci. Sumbly *et al.*, reported the ability of *Streptococcus pyogenes* SpyCEP to reduce neutrophil activity through cleavage and inactivation of the human chemokine granulocyte chemotactic protein 2 (GCP-2) [42]. In addition, the protease of *S. pyogenes* was reported to cleave CXCL8 [42, 43]. Moreover, Bryan *et al.*, showed that *Streptococcus agalactiae* CspA, inactivates the CXC chemokines GRO-alpha, GRO-beta, GRO-gamma, neutrophil-activating peptide 2 (NAP-2), and GCP-2 [44]. Lastly, the subtilisin-like protease SufA of *Finnegoldia magna*, that shares many properties with the SspA of *S. suis*, has been shown to degrade the chemokine MIG/ CXCL9 [45]. Degradation of CXCL8 by *S. suis* has been previously reported [46]. The protease involved in the cleavage of CXCL8 was different from the cell wall-anchored SspA since it was found to be secreted by *S. suis* [46].

The ability of SspA to induce cytokine secretion in macrophages was confirmed using a mutant of *S. suis* deficient in SspA expression. The secretion of IL-1 β , TNF- α , and IL-6 was significantly less important when macrophages were stimulated with cells of SspA mutant compared to the stimulation with the parental strain. This strongly supports the contribution of SspA in *S. suis* induced inflammatory response in macrophages. On the other hand, CCL5 secretion was found to be higher following stimulation with the SspA-deficient mutant compared to the parental strain. This result supports the capacity of the recombinant SspA protease to degrade CCL5. The fact that no decrease in CXCL8 secretion was observed following stimulation of macrophages with the SspA-deficient mutant suggests that other cell surface components of *S. suis*, such as the cell wall [46], are likely to play a more important role in CXCL8 secretion than the SspA protease.

3.3.7 Conclusions

In conclusion, this study brought evidence that the subtilisin-like protease SspA of *S. suis* may modulate the inflammation state associated with meningitis. It may either induce the secretion of important pro-inflammatory cytokines or, when present at high concentration, cause the degradation of selected cytokines, such as CCL5 and IL-6.

3.3.8 Authors' contribution

LB performed all the experimental work and prepared the first draft of the manuscript. DG conceived the study design and prepared the final version of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

3.3.9 Acknowledgments

This study was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). We wish to thank K. Vaillancourt for her technical assistance and M. Gottschalk for helpful discussions.

3.3.10 References

1. Higgins R, Gottschalk M: Diseases of swine. *Streptococcal diseases* 2006:769-783.
2. Huang YT, Teng LJ, Ho SW, Hsueh PR: *Streptococcus suis* infection. *J Microbiol Immunol Infect* 2005, 38(5):306-313.
3. Wertheim HF, Nghia HD, Taylor W, Schultsz C: *Streptococcus suis*: an emerging human pathogen. *Clin Infect Dis* 2009, 48(5):617-625.

4. Gottschalk M, Xu J, Lecours MP, Grenier D, Fittipaldi N, Segura M: *Streptococcus suis* Infections in Humans: What is the prognosis for Western countries ? (Part I). Clinical Microbiology Newsletter 2010, 32(12):89-96.
5. Gottschalk M, Kobisch M, Berthelot-Herault F: L'infection à *Streptococcus suis* chez le porc: revue générale. Journées Rech Porcine en France 2001, 33:269-276.
6. Zhang C, Ning Y, Zhang Z, Song L, Qiu H, Gao H: In vitro antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* strains isolated from clinically healthy sows in China. Vet Microbiol 2008, 131(3-4):386-392.
7. Tian Y, Aarestrup FM, Lu CP: Characterization of *Streptococcus suis* serotype 7 isolates from diseased pigs in Denmark. Vet Microbiol 2004, 103(1-2):55-62.
8. Costa AT, Lobato FC, Abreu VL, Assis RA, Reis R, Uzal FA: Serotyping and evaluation of the virulence in mice of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2005, 47(2):113-115.
9. Smith HE, Damman M, van der Velde J, Wagenaar F, Wisselink HJ, Stockhofe-Zurwieden N, Smits MA: Identification and characterization of the cps locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. Infect Immun 1999, 67(4):1750-1756.
10. Jacobs AA, Loeffen PL, van den Berg AJ, Storm PK: Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*. Infect Immun 1994, 62(5):1742-1748.
11. de Greeff A, Buys H, Verhaar R, Dijkstra J, van Alphen L, Smith HE: Contribution of fibronectin-binding protein to pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. Infect Immun 2002, 70(3):1319-1325.
12. Esgleas M, Li Y, Hancock MA, Harel J, Dubreuil JD, Gottschalk M: Isolation and characterization of alpha-enolase, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus suis*. Microbiology 2008, 154(Pt 9):2668-2679.
13. Jobin MC, Grenier D: Identification and characterization of four proteases produced by *Streptococcus suis*. FEMS Microbiol Lett 2003, 220(1):113-119.

14. Jobin MC, Martinez G, Motard J, Gottschalk M, Grenier D: Cloning, purification, and enzymatic properties of dipeptidyl peptidase IV from the swine pathogen *Streptococcus suis*. *J Bacteriol* 2005, 187(2):795-799.
15. Bonifait L, Vaillancourt K, Gottschalk M, Frenette M, Grenier D: Purification and characterization of the subtilisin-like protease of *Streptococcus suis* that contributes to its virulence. *Vet Microbiol* 2010.
16. Bonifait L, de la Cruz Dominguez-Punaro M, Vaillancourt K, Bart C, Slater J, Frenette M, Gottschalk M, Grenier D: The cell envelope subtilisin-like proteinase is a virulence determinant for *Streptococcus suis*. *BMC Microbiol* 2010, 10:42.
17. Hu Q, Liu P, Yu Z, Zhao G, Li J, Teng L, Zhou M, Bei W, Chen H, Jin M: Identification of a cell wall-associated subtilisin-like serine protease involved in the pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. *Microb Pathog* 2009, 48(3-4):103-109.
18. Gottschalk M, Segura M: The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet Microbiol* 2000, 76(3):259-272.
19. Segura M, Vadeboncoeur N, Gottschalk M: CD14-dependent and -independent cytokine and chemokine production by human THP-1 monocytes stimulated by *Streptococcus suis* capsular type 2. *Clin Exp Immunol* 2002, 127(2):243-254.
20. Vadeboncoeur N, Segura M, Al-Numani D, Vanier G, Gottschalk M: Pro-inflammatory cytokine and chemokine release by human brain microvascular endothelial cells stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003, 35(1):49-58.
21. Tanabe S, Grenier D: Endothelial cell/macrophage cocultures as a model to study *Streptococcus suis*-induced inflammatory responses. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009, 55(1):100-106.
22. Dominguez-Punaro MC, Segura M, Plante MM, Lacouture S, Rivest S, Gottschalk M: *Streptococcus suis* serotype 2, an important swine and human pathogen, induces strong systemic and cerebral inflammatory responses in a mouse model of infection. *J Immunol* 2007, 179(3):1842-1854.

23. Van Furth A, Roord J, Van Furth R: Roles of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in pathophysiology of bacterial meningitis and effect of adjunctive therapy. *Infect Immun* 1996, 64(12):4883-4890.
24. Rovera G, Santoli D, Damsky C: Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with a phorbol diester. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979, 76(6):2779-2783.
25. Lopez-Cortes LF, Cruz-Ruiz M, Gomez-Mateos J, Jimenez-Hernandez D, Palomino J, Jimenez E: Measurement of levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta in the CSF of patients with meningitis of different etiologies: utility in the differential diagnosis. *Clin Infect Dis* 1993, 16(4):534-539.
26. Quagliariello VJ, Wispelwey B, Long WJ, Jr., Scheld WM: Recombinant human interleukin-1 induces meningitis and blood-brain barrier injury in the rat. Characterization and comparison with tumor necrosis factor. *J Clin Invest* 1991, 87(4):1360-1366.
27. Helfgott DC, Tatter SB, Santhanam U, Clarick RH, Bhardwaj N, May LT, Sehgal PB: Multiple forms of IFN-beta 2/IL-6 in serum and body fluids during acute bacterial infection. *J Immunol* 1989, 142(3):948-953.
28. Moller AS, Bjerre A, Brusletto B, Joo GB, Brandtzaeg P, Kierulf P: Chemokine patterns in meningococcal disease. *J Infect Dis* 2005, 191(5):768-775.
29. Morrison DC, Jacobs DM: Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides. *Immunochemistry* 1976, 13(10):813-818.
30. Dery O, Corvera CU, Steinhoff M, Bunnett NW: Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am J Physiol* 1998, 274(6 Pt 1):C1429-1452.
31. Dong C, Davis RJ, Flavell RA: MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 2002, 20:55-72.
32. Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R: Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 2001, 53(2):245-282.
33. Hollenberg MD, Compton SJ: International Union of Pharmacology. XXVIII. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 2002, 54(2):203-217.

34. Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, Gilbert T, Davie EW, Foster DC: Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95(12):6642-6646.
35. Steinhoff M, Buddenkotte J, Shpacovitch V, Rattenholl A, Moormann C, Vergnolle N, Luger TA, Hollenberg MD: Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr Rev* 2005, 26(1):1-43.
36. Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR: Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 1991, 64(6):1057-1068.
37. de Greeff A, Benga L, Wichgers Schreur PJ, Valentin-Weigand P, Rebel JM, Smith HE: Involvement of NF-kappaB and MAP-kinases in the transcriptional response of alveolar macrophages to *Streptococcus suis*. *Vet Microbiol* 2010, 141(1-2):59-67.
38. Jenner RG, Young RA: Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling. *Nat Rev Microbiol* 2005, 3(4):281-294.
39. Segura M, Vanier G, Al-Numani D, Lacouture S, Olivier M, Gottschalk M: Proinflammatory cytokine and chemokine modulation by *Streptococcus suis* in a whole-blood culture system. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006, 47(1):92-106.
40. Grenier D, Tanabe S: *Porphyromonas gingivalis* gingipains trigger a proinflammatory response in human monocyte derived macrophages through the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Toxins* 2010, 2:341-352.
41. Matsushita K, Imamura T, Tomikawa M, Tancharoen S, Tatsuyama S, Maruyama I: DX-9065a inhibits proinflammatory events induced by gingipains and factor Xa. *J Periodontal Res* 2006, 41(2):148-156.
42. Sumbly P, Zhang S, Whitney AR, Falugi F, Grandi G, Graviss EA, Deleo FR, Musser JM: A chemokine-degrading extracellular protease made by group A *Streptococcus* alters pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. *Infect Immun* 2008, 76(3):978-985.
43. Hidalgo-Grass C, Mishalian I, Dan-Goor M, Belotserkovsky I, Eran Y, Nizet V, Peled A, Hanski E: A streptococcal protease that degrades CXC chemokines and impairs bacterial clearance from infected tissues. *EMBO J* 2006, 25(19):4628-4637.

44. Bryan JD, Shelver DW: *Streptococcus agalactiae* CspA is a serine protease that inactivates chemokines. J Bacteriol 2009, 191(6):1847-1854.
45. Karlsson C, Eliasson M, Olin AI, Morgelin M, Karlsson A, Malmsten M, Egesten A, Frick IM: SufA of the opportunistic pathogen *Fingoldia magna* modulates actions of the antibacterial chemokine MIG/CXCL9, promoting bacterial survival during epithelial inflammation. J Biol Chem 2009, 284(43):29499-29508.
46. Vanier G, Segura M, Lecours MP, Grenier D, Gottschalk M: Porcine brain microvascular endothelial cell-derived interleukin-8 is first induced and then degraded by *Streptococcus suis*. Microb Pathog 2009, 46(3):135-143.

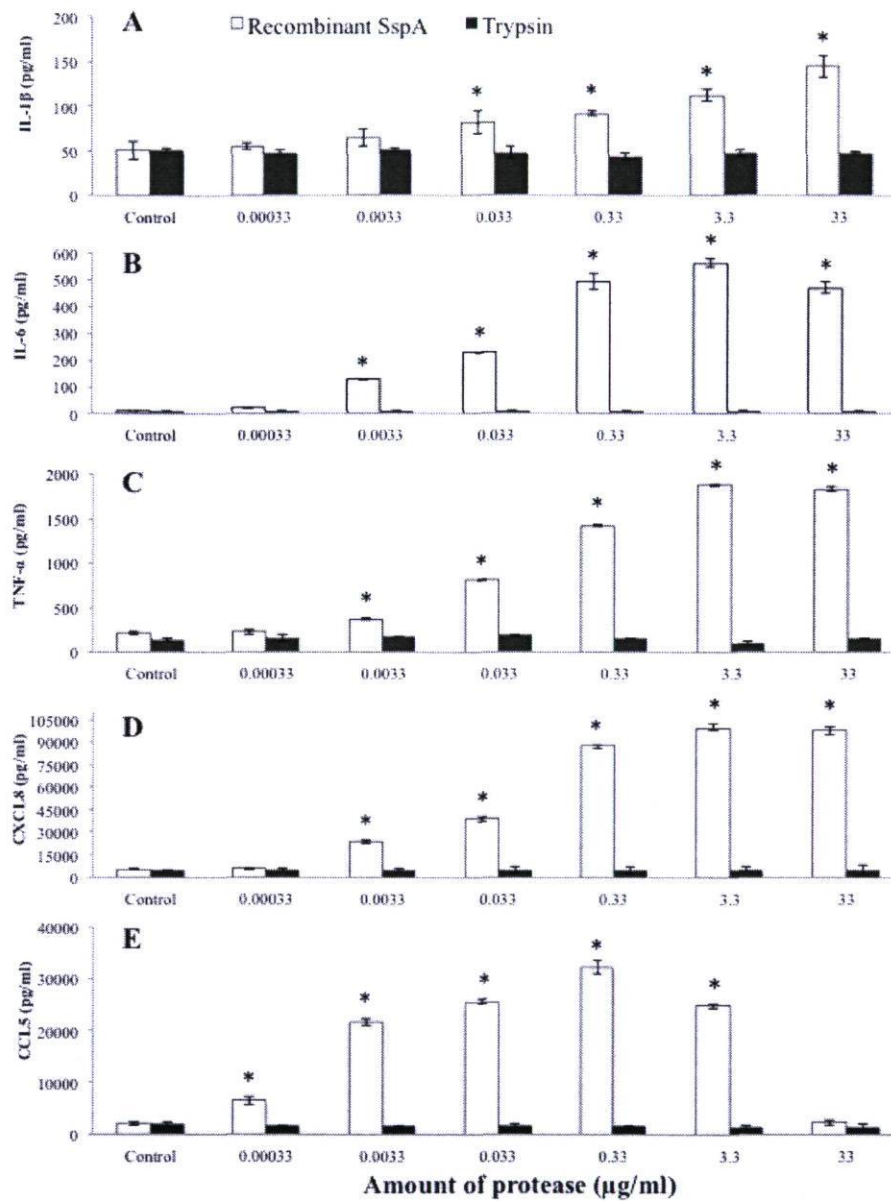


Figure 3-12: Cytokine secretion by PMA-differentiated U937 macrophages stimulated with the recombinant SspA of *S. suis* or with pancreatic trypsin. Following stimulation (18 h) with various amounts of proteases, the secretion of IL-1 β (panel A), IL-6 (panel B), TNF- α (panel C), CXCL8 (panel D) and CCL5 (panel E) was assessed by ELISA. The data are the means \pm SD of triplicate assays from three separate experiments. Asterisks indicate a significant difference in comparison with the non-stimulated macrophages at $P < 0.01$.

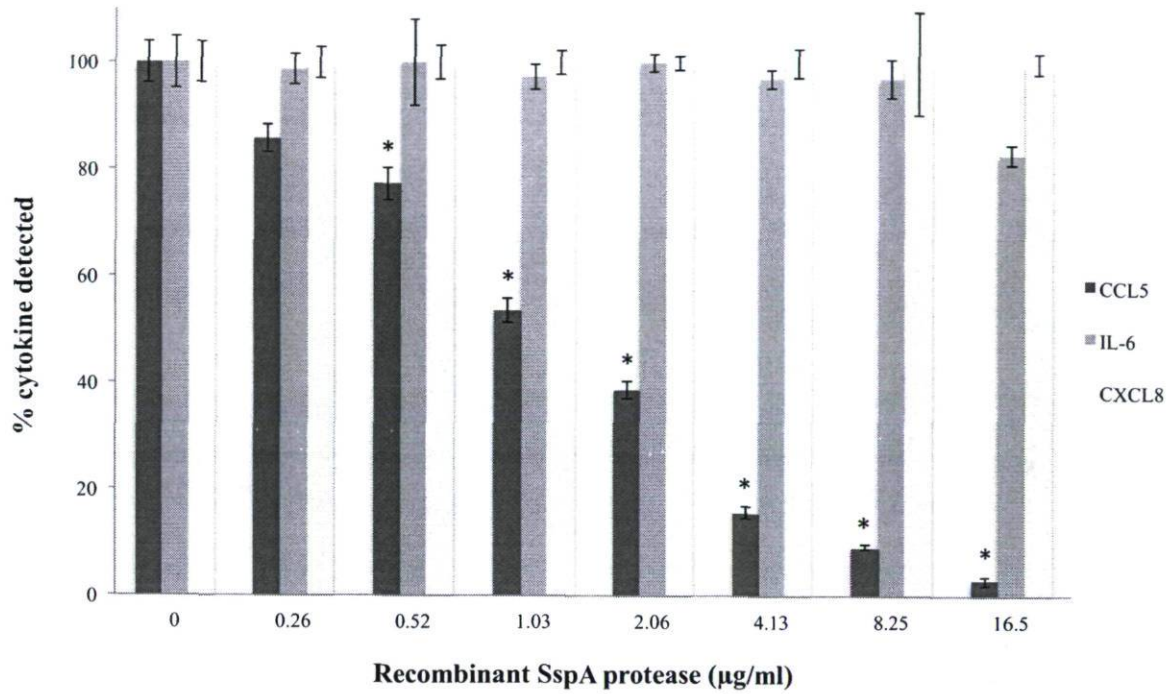


Figure 3-13: CCL5, IL-6 and CXCL8 degradation by the recombinant SspA of *S. suis*. A value of 100% was assigned to the amounts of cytokines detected in the absence of SspA. The data are means \pm SD of triplicate assays from three separate experiments. Asterisks indicate a significant difference in comparison with the control (no SspA) at $P < 0.01$.

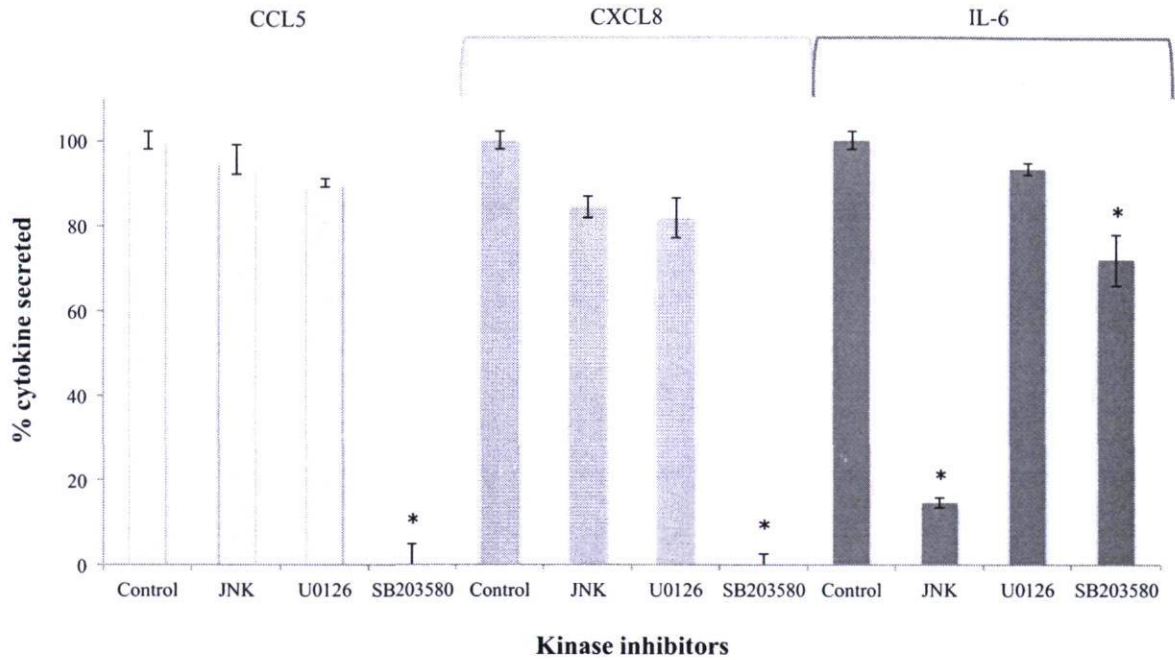


Figure 3-14: Effect of kinase inhibitors on the secretion of CCL5, CXCL8 and IL-6 by PMA-differentiated U937 macrophages stimulated with the recombinant SspA (33 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of *S. suis*. A value of 100% was assigned to the amounts of cytokines detected in the absence of kinase inhibitors. The data are the means \pm SD of triplicate assays from three separate experiments. Asterisks indicate a significant difference in comparison with the control (no inhibitor) at $P < 0.01$. The JNK inhibitor is specific for c-JUN N-terminal kinase (JNK) inhibitor, U0126 is specific for mitogen-activated extracellular kinase 1, 2 (MEK 1, 2) inhibitor, and SB203580 is specific for p38 mitogen-activated kinase (p38 MAPK) inhibitor.

Table 3-6: Effect of heat treatment or the presence of polymyxin B on cytokine secretion by PMA-differentiated U937 macrophages stimulated with the recombinant SspA (33 µg/ml) of *S. suis*.

Conditions	Amount secreted (pg/ml)		
	CCL5	IL-6	CXCL8
Control (no stimulation)	2081 ± 14	100 ± 1	3170 ± 9
Recombinant SspA of <i>S. suis</i>	2370 ± 61*	1922 ± 31*	108557 ± 620*
Heat-inactivated recombinant SspA of <i>S. suis</i>	72409 ± 848*	2111 ± 71*	102287 ± 1062*
Recombinant SspA of <i>S. suis</i> + polymyxin B	2081 ± 32	2099 ± 254*	107446 ± 590*

The data are the means ± SD of triplicate assays for three separate experiments. Asterisks indicate a significant difference in comparison with the unstimulated control at P < 0.01.

Table 3-7: Cytokine secretion by PMA-differentiated U937 macrophages following stimulation with *S. suis* P1/7 and its SspA deficient mutant G6G.

Strain	Amount secreted (pg/ml)				
	IL-1 β	TNF- α	IL-6	CXCL8	CCL5
Control	51 \pm 3	217 \pm 2	10 \pm 1	5245 \pm 432	2116 \pm 4
<i>S. suis</i> P1/7	161 \pm 8	1800 \pm 11	1160 \pm 21	611000 \pm 756	13355 \pm 564
<i>S. suis</i> G6G	120 \pm 3*	1030 \pm 14*	690 \pm 6*	653000 \pm 634*	15664 \pm 34*

The data are the means \pm SD of triplicate assays for three separate experiments. Asterisks indicate a significant difference in cytokine secretion by macrophages stimulated with the SspA deficient mutant (G6G) in comparison with the parental strain at $P < 0.01$.

CHAPITRE 4: MISE AU POINT D'UN NOUVEAU MODÈLE D'ÉTUDE DE LA VIRULENCE DE *S. suis*

4.1 Article 7: An amoeba host model to evaluate *Streptococcus suis* virulence

Article accepté pour publication en 2011 dans la revue Applied Environmental Microbiology.

Laetitia Bonifait^{1,2,#}, Steve J. Charette^{3,4,5,#}, Geneviève Filion^{3,4}, Marcelo Gottschalk^{2,6} and Daniel Grenier^{1,2*}

¹Groupe de Recherche en Écologie Buccale (GREB), Faculté de Médecine Dentaire, Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada;

²Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT), Quebec City, Quebec, Canada;

³Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes (IBIS), Quebec City, Quebec, Canada;

⁴Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec (IUCPQ), Hôpital Laval, Quebec City, Quebec, Canada;

⁵Département de Biochimie, de Microbiologie et de Bio-Informatique, Faculté des Sciences et de Génie, Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada;

⁶Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP), Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Ste-Hyacinthe, Quebec, Canada.

#: These authors contributed equally to this work.

Short title: Amoeba host model for *S. suis* virulence

* Corresponding author. Mailing address: Groupe de Recherche en Écologie Buccale, Faculté de médecine dentaire, Université Laval, 2420 Rue de la Terrasse, Quebec City, Quebec, Canada, G1V 0A6. Phone: (418) 656-7341. Fax: (418) 656-2861. E-mail: Daniel.Grenier@greb.ulaval.ca

4.1.1 Résumé

Streptococcus suis, une bactérie à Gram positif, est un important pathogène du porc à l'origine de nombreuses infections telles les méningites, septicémies et endocardites. Cette étude a permis de démontrer la validité de *Dictyostelium discoideum* comme hôte modèle pour évaluer la virulence de *S. suis* et ouvre de nouvelles possibilités pour l'étude de ce pathogène.

4.1.2 Abstract

The Gram-positive bacterium *Streptococcus suis* is a major swine pathogen worldwide that causes meningitis, septicemia, and endocarditis. In this study, we demonstrated that the amoeba *Dictyostelium discoideum* can be a relevant system to study the virulence of *S. suis*.

4.1.3 Introduction, results, discussion, conclusion

Streptococcus suis is a major swine pathogen mainly associated with meningitis, pneumonia and endocarditis (14). This Gram-positive bacterium can also affect humans in close contact with sick or carrier pigs or with their derived products (13, 17). Thirty-five serotypes of *S. suis* have been described, but serotype 2 is most commonly associated with diseases in pigs and humans (20, 21). Many potential virulence factors have been described in *S. suis* (2). Among them, the capsule allows the bacterium to escape killing by both macrophages and neutrophils (7, 8, 11, 19), while the subtilisin-like protease (SspA) degrades host proteins and induces secretion of inflammatory mediators (3, 5, 6, 15).

Dictyostelium discoideum is a soil-living amoeba, which uses especially bacteria as food source (1, 9). In the last decade, *D. discoideum* has been used as an alternative host model to study various aspects of host-pathogen interactions and to characterize bacterial virulence mechanisms, mainly of Gram-negative pathogenic bacteria (9). More specifically, the virulence plaque assay using this amoeba offers a simple readout of bacterial virulence based on the capacity of *D. discoideum* to multiply and form plaques on lawns of nonpathogenic bacteria but not on pathogenic bacteria when appropriate conditions are used (12). The use of laboratory animals to study the virulence of *S. suis* implies many logistic and ethical limitations that are mainly absent when using a non-mammalian model such as *D. discoideum*. In the present study, we investigated whether the amoebae *D. discoideum* can be used as a relevant host model to study the virulence of the Gram-positive bacterium *S. suis*. In this purpose, we first adapted the model of *D. discoideum* for *S. suis*, and then compared the behavior of the amoeba using wild type strains and mutants defective for virulence factors known to be essential for the pathogenicity of *S. suis* in an animal model.

The reference strain *S. suis* P1/7 (serotype 2) as well as its two SspA deficient mutants (M3G and G6G) were used in this study. Mutants M3G and G6G were obtained from a mutant library constructed by insertion of a Tn917 transposon into *S. suis* P1/7 (3, 18). The

reference strain *S. suis* S735 (serotype 2) as well as its two capsule deficient mutants (BD101 and 2A) were also used in this study. Mutant BD101 was constructed by deletion of the *aro* promoter (11), while mutant 2A was constructed by insertion of the *Tn916* transposon into *S. suis* S735 (8). The decreased virulence of these four mutants was previously demonstrated in animal models (4, 8, 11). A non-typeable strain of *S. suis* (1078212), which has been shown to be naturally devoid of capsule (4), was also included in this study. All bacteria were grown at 37°C in Todd Hewitt broth (THB; BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MA, USA).

In a first attempt, the virulence plaque assay using *D. discoideum* was performed with the two virulent wild-type strains of *S. suis* (S735 and P1/7), the capsule deficient mutant BD101, and the SspA deficient mutant M3G. *D. discoideum* DH1-10 was grown in a petri dish at 21°C in HL5 liquid medium (14.3 g/l peptone [Oxoid, Nepean, Ontario, Canada], 7.15 g/l yeast extract [EMD, Gibbstown, NJ, USA], 18 g/l maltose, 3.6 mM Na₂HPO₄, and 3.6 mM KH₂PO₄) containing 15 µg/ml tetracycline (10). Amoebae were harvested by centrifugation (5 min x 1500 g), washed, and resuspended in tetracycline -free HL5 medium at a concentration of 100 cells per 5 µl. Thereafter, bacteria were harvested by scraping the surface of two petri plates with confluent lawns of growth (overnight) and suspended in 2 ml of HL5 medium without antibiotic. The bacterial suspensions (100 µl, OD_{660nm} ≈ 5) were then applied onto wells of 24-well plates containing HL5 agar medium (2 ml/well). Once dried, bacterial lawns were spotted with 5 µl containing 100 cells of *D. discoideum*. Plates were incubated at 23°C for 2 days and then examined visually for plaque formation. As shown in figure 4-1, *D. discoideum* was able to grow and to form plaques only on lawns of *S. suis* mutants. This result supported that wild type strains of *S. suis* have a virulent behavior against *D. discoideum*, as also observed in animal models.

In a second step, the virulence of the wild type strain S735 and its two capsule deficient mutants (2A and BD101), the wild type strain P1/7 and its two SspA deficient mutants (M3G and G6G), as well as the non-typeable isolate (1078212) was characterized quantitatively by using serial dilutions of *D. discoideum* from 3000 to 10 cells per 5 µl. As

reported in table 4-1, *S. suis* S735 did not allow the growth of amoebae even if 3000 cells were deposited on the bacterial lawn. On the other hand, *D. discoideum* at a concentration in the range of 10 to 300 cells/well were sufficient to form clear plaques on lawns of mutants BD101 and 2A. Since *D. discoideum* was able to produce plaques on lawns of mutants that do not express a capsular material, it suggests that these mutants are avirulent. These results are in agreement with previous studies that used an animal model to demonstrate that the capsule is an important virulence factor for *S. suis* (8, 11). On lawns of the two SspA deficient mutants (M3G and G6G), *D. discoideum* was able to form clear plaques even when only 10 or 30 amoebae were applied onto lawns (table 4-1). In contrast, the parental strain of these mutants, *S. suis* P1/7, was much more resistant since in three assays out of four, 3000 amoebae were not enough to form plaques (table 4-1). This supports our previous report indicating the critical role of the SspA protease in the virulence of *S. suis* in a mouse

The capsule of *S. suis* may be necessary to allow the resistance of bacteria to phagocytosis while the SspA may be important in another step during the disease process. This study suggests that the capsule and the SspA subtilisin-like protease are both required to ensure the virulence of *S. suis* in the *D. discoideum* model. However, this has to be confirmed using mutants derived from the same parental strain. Transmission electron microscopy coupled with ruthenium red staining confirmed that *S. suis* S735 expresses a dense capsule (figure 4-2A) while the mutants 2A and BD101 showed markedly less capsular material on their surface (figure 4-2B and 4-2C). Interestingly the non-typeable isolate 1078212, which displayed an attenuated virulence in the *D. discoideum* model (table 4-1), did not show any capsular material (figure 4-2D). As shown in Figure 4-2E and 4-2G, the parent strain P1/7 and the two SspA mutants possessed a capsule although some variation in thickness may be observed. In addition, table 4-1 reports the SspA activity of all *S. suis* strains measured using the chromogenic substrate succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNa (6). With the exception of mutants M3G and G6G, the other strains of *S. suis* possessed cell-associated SspA activity. Interestingly, Li *et al.* demonstrated the upregulation of the gene encoding the SspA subtilisin-like protease during the course of infection (16).

The quantitative virulence assay developed for *S. suis* in the present study can give an idea of the relative virulence of each strain tested (wild-type or mutant). The loss of virulence of the analyzed mutants against *D. discoideum* is analogous to the one previously observed with animal models. It supports the usefulness of this system as a novel tool for the analysis of virulence determinants of *S. suis* especially by its technical and ethical advantages. Thus, the *D. discoideum* virulence assay by its simplicity may help to identify new virulence genes of *S. suis*. To the best of our knowledge, the present work is the first comprehensive study on the use of *D. discoideum* as an alternative model to assess the virulence of many reference strains and associated mutants of a pathogenic Gram-positive bacterial species using the virulence plaque assay.

4.1.4 Acknowledgements

We wish to thank Louis Grignon, Valérie Paquet and Richard Janvier for their technical assistance. This study was funded by Discovery grants to DG and SJC from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). SJC is a research scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

4.1.5 References

1. Annesley, S. J., and P. R. Fisher. 2009. *Dictyostelium discoideum*--a model for many reasons. *Mol. Cell. Biochem.* 329:73-91.
2. Baums, C. G., and P. Valentin-Weigand. 2009. Surface-associated and secreted factors of *Streptococcus suis* in epidemiology, pathogenesis and vaccine development. *Anim. Health. Res. Rev.* 10:65-83.
3. Bonifait, L., M. de la Cruz Dominguez-Punaro, K. Vaillancourt, C. Bart, J. Slater, M. Frenette, M. Gottschalk, and D. Grenier. 2010. The cell envelope subtilisin-like proteinase is a virulence determinant for *Streptococcus suis*. *BMC Microbiol.* 10:42.

4. Bonifait, L., M. Gottschalk, and D. Grenier. 2010. Cell surface characteristics of nontypeable isolates of *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 311:160-166.
5. Bonifait, L., and D. Grenier. 2011. The SspA subtilisin-like protease of *Streptococcus suis* triggers a pro-inflammatory response in macrophages through a non-proteolytic mechanism. *BMC Microbiol.* 11:47.
6. Bonifait, L., K. Vaillancourt, M. Gottschalk, M. Frenette, and D. Grenier. 2010. Purification and characterization of the subtilisin-like protease of *Streptococcus suis* that contributes to its virulence. *Vet. Microbiol.*:In press.
7. Chabot-Roy, G., P. Willson, M. Segura, S. Lacouture, and M. Gottschalk. 2006. Phagocytosis and killing of *Streptococcus suis* by porcine neutrophils. *Microb. Pathog.* 41:21-32.
8. Charland, N., J. Harel, M. Kobisch, S. Lacasse, and M. Gottschalk. 1998. *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology* 144 (Pt 2):325-332.
9. Clarke, M. 2010. Recent insights into host-pathogen interactions from *Dictyostelium*. *Cell. Microbiol.* 12:283-291.
10. Cornillon, S., E. Pech, M. Benghezal, K. Ravanel, E. Gaynor, F. Letourneur, F. Bruckert, and P. Cosson. 2000. Phg1p is a nine-transmembrane protein superfamily member involved in *Dictyostelium* adhesion and phagocytosis. *J. Biol. Chem.* 275:34287-34292.
11. Fittipaldi, N., J. Harel, B. D'Amours, S. Lacouture, M. Kobisch, and M. Gottschalk. 2007. Potential use of an unencapsulated and aromatic amino acid-auxotrophic *Streptococcus suis* mutant as a live attenuated vaccine in swine. *Vaccine* 25:3524-3535.
12. Froquet, R., E. Lelong, A. Marchetti, and P. Cosson. 2009. *Dictyostelium discoideum*: a model host to measure bacterial virulence. *Nat. Protoc.* 4:25-30.
13. Gottschalk, M., J. Xu, C. Calzas, and M. Segura. 2010. *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? *Future Microbiol.* 5:371-391.
14. Higgins, R., and M. Gottschalk. 2006. Streptococcal diseases. *Diseases of swine*, 9th ed. Ames, IA: Blackwell Publishing, Ames Iowa:769-783.

15. Hu, Q., P. Liu, Z. Yu, G. Zhao, J. Li, L. Teng, M. Zhou, W. Bei, H. Chen, and M. Jin. 2010. Identification of a cell wall-associated subtilisin-like serine protease involved in the pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. *Microb. Pathog.* 48:103-109.
16. Li, W., L. Liu, D. Qiu, H. Chen, and R. Zhou. 2010. Identification of *Streptococcus suis* serotype 2 genes preferentially expressed in the natural host. *Int. J. Med. Microbiol.* 300:482-488.
17. Lun, Z. R., Q. P. Wang, X. G. Chen, A. X. Li, and X. Q. Zhu. 2007. *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. *Lancet. Infect. Dis.* 7:201-209.
18. Slater, J. D., A. G. Allen, J. P. May, S. Bolitho, H. Lindsay, and D. J. Maskell. 2003. Mutagenesis of *Streptococcus equi* and *Streptococcus suis* by transposon Tn917. *Vet. Microbiol.* 93:197-206.
19. Smith, H. E., M. Damman, J. van der Velde, F. Wagenaar, H. J. Wisselink, N. Stockhofe-Zurwieden, and M. A. Smits. 1999. Identification and characterization of the *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. *Infect. Immun.* 67:1750-1756.
20. Staats, J. J., I. Feder, O. Okwumabua, and M. M. Chengappa. 1997. *Streptococcus suis*: past and present. *Vet. Res. Commun.* 21:381-407.
21. Wei, Z., R. Li, A. Zhang, H. He, Y. Hua, J. Xia, X. Cai, H. Chen, and M. Jin. 2009. Characterization of *Streptococcus suis* isolates from the diseased pigs in China between 2003 and 2007. *Vet. Microbiol.* 137:196-201.



Figure 4-1: Assessment of *S. suis* virulence using the *D. discoideum* model. Lawns of *S. suis* S735 and its capsule deficient mutant BD101, as well as *S. suis* P1/7 and its SspA deficient mutant M3G were prepared. Drops (5 μ l) of *D. discoideum* containing 100 cells were then applied. The ability of *D. discoideum* cells to create plaques (white wholes) in the bacterial lawns (black) was recorded visually after 2 days of incubation at 23°C.

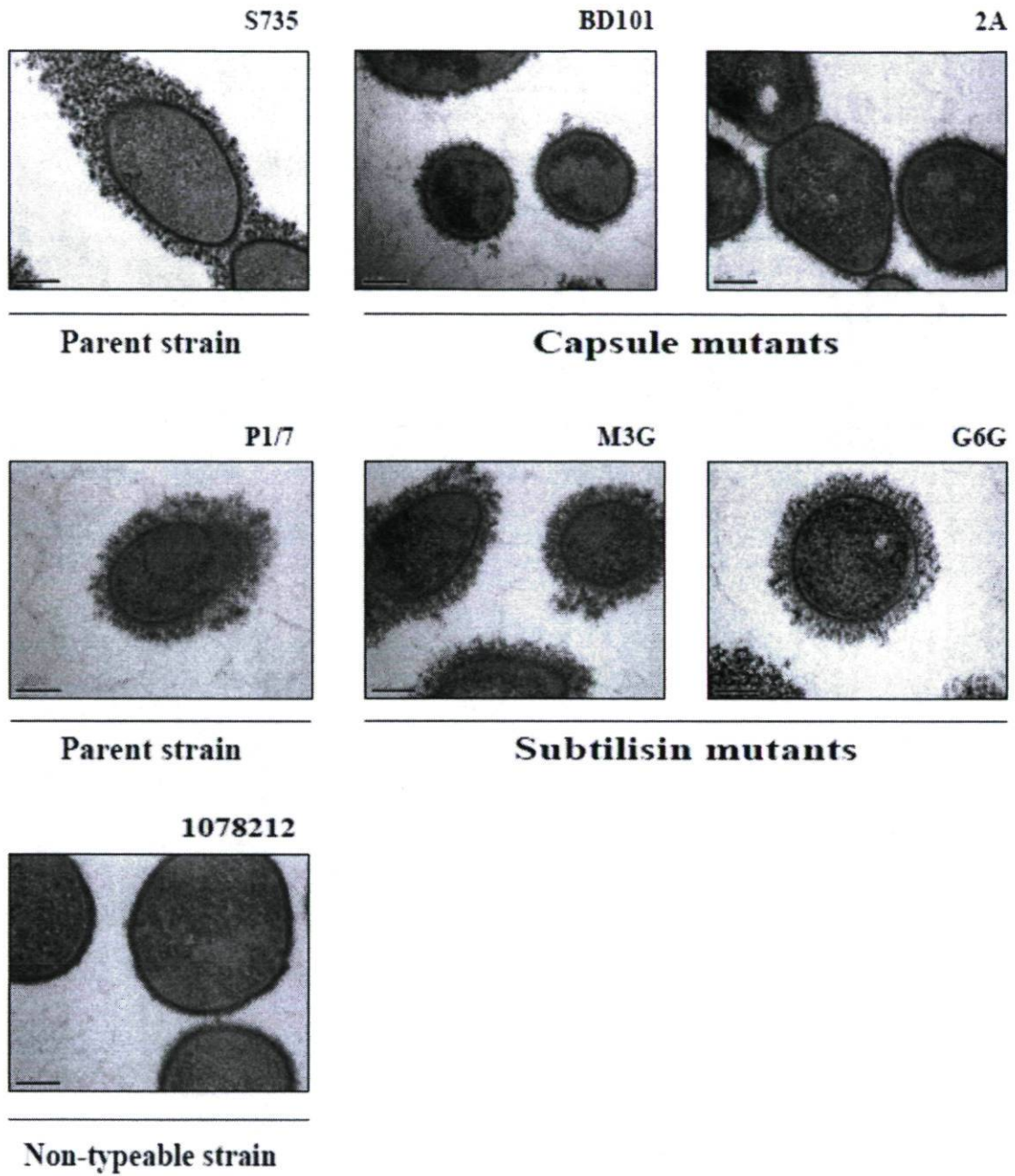


Figure 4-2: Visualization of *S. suis* capsule by transmission electron microscopy following ruthenium red staining. Magnification of 80 000X.

Table 4-1: Susceptibility of *S. suis* to *D. discoideum* predation. The ability of *D. discoideum* to grow on a bacterial lawn was assessed by plating different amounts of amoebae. The numbers presented in this table represent the minimal amounts of *D. discoideum* required to induce plaque formation on the bacterial lawns. The data of four independent experiments are presented.

Strain	Capsule	SspA protease	Virulence assay			
			Experiment	Experiment	Experiment	Experiment
			1	2	3	4
S735	+	+	>3000	>3000	>3000	>3000
BD101	-	+	30	10	100	30
2A	-	+	30	30	300	300
P1/7	+	+	300	>3000	>3000	>3000
M3G	+	-	30	10	30	30
G6G	+	-	30	10	30	30
1078212	-	+	10	10	1000	30

CHAPITRE 5: DISCUSSION

S. suis est un important pathogène du porc qui est retrouvé à travers le monde et notamment en Amérique du Nord, en Europe et en Asie. Il est responsable de méningites, endocardites et septicémies chez le porc et constitue également un important agent de zoonose pour les personnes en contact étroit avec les porcs ou leurs produits dérivés (Gottschalk & Segura, 2000, Gottschalk, *et al.*, 2010). *S. suis*, qui inclue 35 sérotypes (1 à 34 et 1/2) (Messier, *et al.*, 2008), colonise les amygdales et est transmis par les voies respiratoires (MacInnes & Desrosiers, 1999). Tous les sérotypes ne sont pas responsables de maladies graves et la virulence des souches peut varier selon un même sérotype. Quoique le sérotype 2 est le plus souvent associé aux infections (Higgins & Gottschalk, 2005), d'autres sérotypes peuvent également être la cause d'infections chez le porc (Tian, *et al.*, 2004, Costa, *et al.*, 2005, Wei, *et al.*, 2009). L'existence de souches de *S. suis* non-sérotypables a déjà été rapportée (Marois, *et al.*, 2007, Wei, *et al.*, 2009). Au Canada, entre 12 et 20% des souches isolées à partir de porcs malades sont dites non-sérotypables (Higgins & Gottschalk, 2001). Bien que la pathogénèse des infections à *S. suis* reste encore mal définie, de nombreux facteurs de virulence potentiels (environ une vingtaine) ont été décrits chez ce pathogène. Parmi ces facteurs de virulence, mentionnons les protéines MRP et EF, la suilysine, diverses adhésines, la capsule et les protéases (Gottschalk & Segura, 2000).

La formation de biofilm par des microorganismes pathogènes est un mécanisme qui leur permet de devenir des colonisateurs persistants, de résister à l'élimination par le système immunitaire de l'hôte, d'accroître leur résistance aux antibiotiques ainsi que d'échanger plus facilement de l'information génétique (Donlan & Costerton, 2002). La capacité de former un biofilm est considérée comme un phénotype associé à la virulence tant chez les bactéries à Gram négatifs (Hall-Stoodley, *et al.*, 2004) que chez les bactéries à Gram positifs (Cucarella, *et al.*, 2004). Un des objectifs de cette thèse était de caractériser la formation du biofilm chez *S. suis*.

La formation du biofilm est influencée par divers paramètres environnementaux, comme par exemple la composition et la disponibilité d'éléments nutritifs qui peuvent moduler la production de polysaccharides extracellulaires (Stanley & Lazazzera, 2004). *In vitro*, la capacité de *S. suis* à former un biofilm s'est avérée dépendante de la présence de fibrinogène. Ce phénomène a été démontré pour la totalité des souches sérotypables de *S. suis* testées (comprenant différents sérotypes). Lors d'une infection par *S. suis* chez l'animal, les bactéries sont appelées à transiter par les vaisseaux sanguins et donc à se retrouver au contact du fibrinogène. Le fibrinogène est une glycoprotéine importante du plasma sanguin et joue un rôle clé dans la coagulation et l'homéostasie. Lors d'une lésion vasculaire, la coagulation est initiée par le clivage du fibrinogène en fibrine par la thrombine (Weisel, 2005). Le fibrinogène est une glycoprotéine dimérique de 340 kDa constituée de deux sous-unités identiques, chacune composée de 3 chaînes polypeptidiques différentes désignées A α , B β , et γ reliées entre elles par 29 ponts disulfures (chaîne A α ~80 kDa, B β ~60 kDa et γ ~55 kDa) (Mosesson, 2005). Son importance dans la capacité d'adhérence des bactéries, incluant *S. aureus*, à une surface vivante ou inerte a déjà été démontrée par Shenkman et coll. (Shenkman, *et al.*, 2000).

Notre étude a démontré que tous les fibrinogènes testés, humains, porcins et bovins, étaient capables d'induire la formation d'un biofilm de manière dose-dépendante chez *S. suis*. Cette capacité de formation du biofilm par *S. suis* en présence de fibrinogène n'était pas liée à un effet sur la croissance mais bien à la présence du fibrinogène lui-même. De plus, seule cette protéine s'est avérée capable d'initier la formation du biofilm et aucun effet n'a été observé en présence d'autres protéines de mammifères comme les γ -globulines, le plasminogène, l'albumine, la transferrine et la mucine. Notre étude fut la première à mettre en évidence la relation entre la formation du biofilm et la présence de fibrinogène. Depuis, cette relation a été rapportée chez d'autres bactéries telles *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*S. bovis* biotype I) (Vollmer, *et al.*, 2010) et *Aerococcus urinae* (Shannon, *et al.*, 2010), deux agents pathogènes connus pour être responsables d'endocardites infectieuses (Christensen, *et al.*, 1995). Outre le fibrinogène, d'autres protéines de mammifères ont déjà été rapportées comme favorisant la formation de biofilms bactériens.

L'héparine permet la formation d'un biofilm chez *S. aureus* (Shanks, *et al.*, 2005), alors que la mucine induit la formation d'un biofilm plus important chez *Pseudomonas aeruginosa* (Landry, *et al.*, 2006). Un apport en protéine peut également contribuer à une augmentation du phénomène d'adhérence qui représente la première étape essentielle à la formation d'un biofilm. Par exemple, *Pasteurella multocida*, une bactérie responsable d'endocardites, méningites et pneumonies chez l'homme, nécessite la présence de fibronectine afin d'adhérer aux cellules de l'hôte (Dabo, *et al.*, 2005).

La capacité de *S. suis* à former un biofilm en présence de fibrinogène semble impliquer son pouvoir de lier le fibrinogène. Cette fixation du fibrinogène à la surface des bactéries leur permet de se lier entre elles puisque *S. suis* n'est pas capable de convertir le fibrinogène en fibrine. La liaison du fibrinogène par les streptocoques (streptocoques du groupe B: *S. agalactiae*; *S. pyogenes*) joue également un rôle important dans leur capacité d'adhérence aux surfaces de l'hôte (Tenenbaum, *et al.*, 2005, Rivera, *et al.*, 2007, Rangunathan & Ponnuraj, 2011) et leur résistance face au système immunitaire, notamment en empêchant la phagocytose des souches (Courtney, *et al.*, 2006, Rivera, *et al.*, 2007, Baiano, *et al.*, 2008, Li & Courtney, 2011). De Greeff *et coll.* ont démontré, en utilisant un mutant de *S. suis* inapte à produire des protéines liant le fibrinogène (FBPS) et en le comparant avec une souche sauvage, que cette propriété contribuait à la virulence de *S. suis* dans un modèle de porcelets (De Greeff, *et al.*, 2002). Ce récepteur de 64 kDa impliqué dans la liaison du fibrinogène à *S. suis* lui permet également de fixer la fibronectine (De Greeff, *et al.*, 2002). La présence chez *S. aureus* d'un « facteur d'agglutination » de type A (ClfA), une protéine de surface de liaison au fibrinogène, a fait l'objet de plusieurs études. Ce facteur a souvent été considéré comme un facteur de virulence dans l'arthrite septique, en permettant aux bactéries de résister à la phagocytose (McDevitt, *et al.*, 1997, Palmqvist, *et al.*, 2004, Loughman, *et al.*, 2005, Higgins, *et al.*, 2006). Plus récemment, Josefsson *et coll.* ont insisté fortement sur le fait que l'activité de liaison du fibrinogène de la protéine ClfA était cruciale pour la capacité de *S. aureus* à provoquer les manifestations de cette maladie (Josefsson, *et al.*, 2008). La présence d'une lipoprotéine liant le fibrinogène a également été

démontrée chez *Haemophilus ducreyi* comme jouant un rôle clé dans la virulence chez l'homme en lui permettant de résister à la phagocytose (Bauer, *et al.*, 2009).

Notre étude a également permis de mettre en évidence un deuxième phénomène intéressant chez *S. suis*. En effet, des mutants de *S. suis* déficients pour l'expression de la capsule de même que des souches dites non-sérotypables, également dépourvues de capsule, sont capables de former un épais biofilm sans l'apport de fibrinogène. Le mutant BD101 a été construit par délétion du promoteur de l'opéron *aro*, ce qui résulte dans l'inactivation de l'expression des gènes *aroA*, *aroK*, *pheA* et *orf10* (Fittipaldi, *et al.*, 2007). L'explication de la perte de l'expression de la capsule est reliée à la perte de l'expression de l'*orf10*. Ce gène appartient à la famille des régulateurs de transcription, LytR-cspA-psr, qui agissent comme des régulateurs positifs dans l'expression de la capsule chez d'autres espèces de streptocoques dont *S. pneumoniae* et *S. thermophilus* (Cieslewicz, *et al.*, 2001). Les souches dites non-sérotypables sont des souches dont le sérotype n'a pu être déterminé par les méthodes classiques de sérotypage (Gottschalk, *et al.*, 2001). Cette capacité de formation du biofilm pour le mutant BD101 et les souches non-sérotypables est en accord avec d'autres études rapportant le fait que la capsule puisse inhiber la capacité d'adhérence de *S. suis* aux cellules épithéliales (Benga, *et al.*, 2004) et endothéliales (Vanier, *et al.*, 2004). De manière intéressante, les capsules produites par *Neisseria meningitidis* (Yi, *et al.*, 2004) et *E. coli* (Schembri, *et al.*, 2004) ont aussi été rapportées comme prévenant la formation d'un biofilm. Il a été proposé que la capsule puisse cacher et empêcher la fonction des adhésines bactériennes (Schembri, *et al.*, 2004). Par conséquent, l'inhibition de l'adhérence des bactéries aux cellules endothéliales et de la formation du biofilm par la capsule chez *S. suis* est possiblement liée au fait que la capsule masque des adhésines et autres protéines de surface les rendant ainsi non fonctionnelles.

L'absence de la capsule chez le mutant BD101 de *S. suis* et les souches non-sérotypables a pu être associée à des propriétés de surfaces différentes qui se traduisent par une augmentation importante du pourcentage d'hydrophobicité et des propriétés d'adhérence des souches. La capsule hydrophile pourrait en plus de cacher des adhésines de surface,

masquer des structures plus hydrophobes ou des éléments importants dans la formation du biofilm par *S. suis*. L'importance des interactions hydrophobes dans la formation d'un biofilm a été confirmée par Yi et coll. chez *N. meningitidis*, qui ont rapporté une corrélation directe entre la formation du biofilm et l'hydrophobicité de la surface cellulaire (Yi, *et al.*, 2004). Cette corrélation a aussi été mise en évidence par Kouidhi et coll. chez *S. aureus* (Kouidhi, *et al.*, 2010). Enfin, il a également été rapporté que *Listeria monocytogenes* nécessite des interactions hydrophobes pour son adhérence initiale menant à la formation d'un biofilm (Takahashi, *et al.*, 2010).

Dans notre étude, les souches non-sérotypables de *S. suis* ont démontré une capacité d'adhésion aux cellules endothéliales plus importante que les souches de sérotype 2. Ces observations sont en accord avec ceux de Benga et coll. qui ont suggéré que la capsule de *S. suis* pouvait cacher des adhésines ou des récepteurs impliqués dans l'adhérence des souches aux cellules épithéliales (Benga, *et al.*, 2004). Par conséquent, il serait intéressant d'examiner si les gènes impliqués dans la production de la capsule chez *S. suis* sont absents ou tout simplement non-exprimés chez ces souches non-sérotypables. Les souches non-sérotypables de *S. suis* ont également démontré une adhérence plus importante à des protéines de l'hôte comme la fibronectine. La capacité de liaison à la fibronectine par *S. suis* avait déjà été démontrée par De Greeff et coll. (De Greeff, *et al.*, 2002) puis par Esgleas et coll. lors de leur mise en évidence d'une α -enolase, présente à la surface des cellules (Esgleas, *et al.*, 2008).

La sécrétion de cytokines comme le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6 et le CXCL8 par les macrophages a été déterminée après stimulation par des cellules entières de *S. suis* S735 (sérotype 2) et son mutant BD101 déficient pour l'expression de la capsule. Dans le cas de quatre cytokines, la stimulation des macrophages avec la souche parentale a induit une augmentation de la sécrétion de manière dose dépendante. Toutefois, pour toutes les cytokines testées, la réponse induite par la stimulation avec le mutant BD101 était significativement plus élevée. Les macrophages ont également été stimulés en présence d'une préparation de la paroi cellulaire de *S. suis* et les résultats se sont avérés comparables

à ceux du mutant BD101 excepté pour l'IL-6. Par conséquent, ces données suggèrent que l'absence de capsule expose des composants qui induisent la production de médiateurs de l'inflammation par les macrophages. Ces résultats sont en accord avec ceux de Graveline et coll. qui ont montré qu'un mutant de *S. suis* non encapsulé (B218, construit similairement au mutant BD101) induisait des niveaux significativement plus élevés de TNF- α et d'IL-1 β dans la lignée de cellules monocytaires humaines THP-1 (Graveline, *et al.*, 2007).

Bien que le rôle exact de la formation d'un biofilm dans les infections à *S. suis* ne soit pas encore clairement défini, il est possible d'établir un lien avec la capacité de formation du biofilm chez d'autres organismes pathogènes impliqués dans de nombreuses infections, incluant la pneumonie, la méningite et les endocardites (Clutterbuck, *et al.*, 2007). Une telle propriété peut permettre à *S. suis* de devenir un colonisateur persistant, de résister à l'élimination par le système immunitaire de l'hôte et les antibiotiques, et d'échanger du matériel génétique (Donlan & Costerton, 2002) (figure 5-1). Cette résistance aux antibiotiques associée au biofilm a été démontrée pour toutes les souches de *S. suis* nécessitant ou non la présence de fibrinogène pour la formation du biofilm. La concentration minimale bactéricide de la pénicilline G nécessaire pour éliminer les bactéries sous forme de biofilm était significativement plus élevée (jusqu'à 60 fois) que celle requise pour éliminer les mêmes souches sous leur forme planctonique.

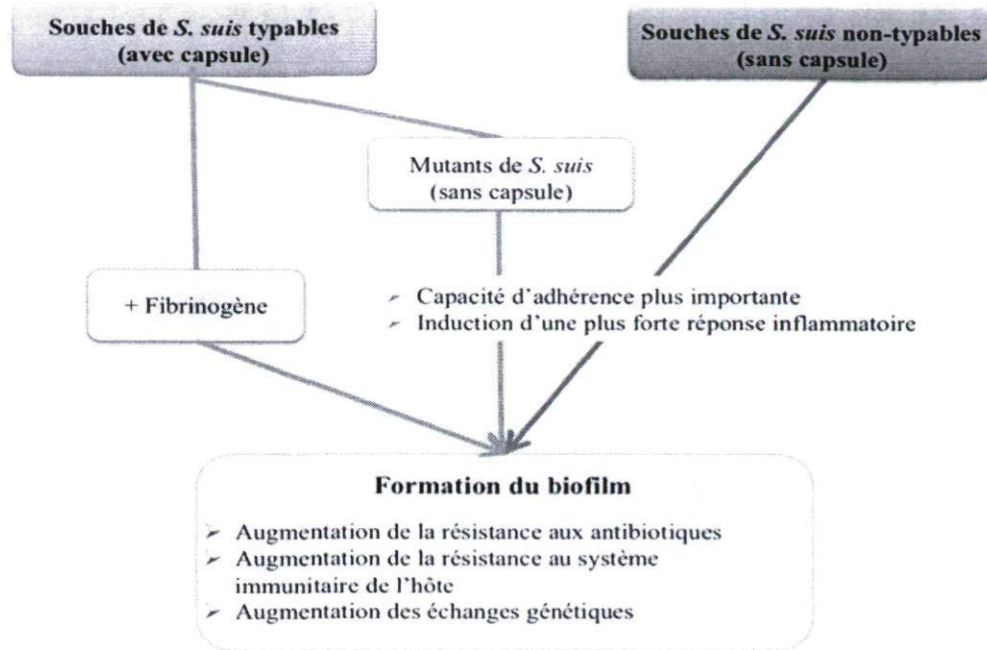


Figure 5-1: Impact de la présence ou de l'absence d'une capsule chez *S. suis* dans le phénomène de formation du biofilm.

Il est permis de proposer que les souches de *S. suis* puissent nécessiter une capacité de formation du biofilm pour mener à bien une partie de leur processus infectieux. Par conséquent, nous émettons l'hypothèse que *S. suis* doit réguler l'expression de sa capsule afin de maximiser son pouvoir de virulence. D'une part, la présence de la capsule serait profitable aux bactéries afin de les protéger de la phagocytose et de leur permettre de transiter dans la circulation sanguine. D'autre part le phénotype biofilm permettrait aux bactéries de mieux coloniser l'hôte et d'induire une réponse inflammatoire plus importante (figure 5-1). Une meilleure connaissance des mécanismes de formation du biofilm et de régulation de la capsule *in vivo* contribueront à une meilleure connaissance de la pathogenèse de *S. suis*.

Les protéases bactériennes sont des enzymes hydrolytiques qui catalysent le clivage des liaisons peptidiques des protéines et polypeptides et ont pour fonction physiologique principale de fournir des nutriments sous forme de peptides et acides aminés aux bactéries. Par leur capacité à hydrolyser les protéines, les protéases contribuent à la pathogenèse des

infections de différentes façons et sont donc considérées comme des facteurs de virulence importants chez de nombreux agents pathogènes microbiens (Maeda & Molla, 1989, Lebrun, *et al.*, 2009). Les protéases peuvent cliver les protéines du système de défense de l'hôte telles les IgG et IgA ainsi que certaines protéines du système du complément dans le but de neutraliser le système de défense immunitaire de l'hôte. Les protéases contribuent également à la destruction et à l'invasion des tissus en dégradant des protéines structurales telles que la fibronectine et le collagène (Maeda & Molla, 1989). Considérant les différents rôles physiologiques et pathologiques des protéases, ces enzymes constituent des cibles prometteuses pour la vaccination (Travis & Potempa, 2000).

Jobin et Grenier ont initialement identifié quatre activités protéolytiques chez *S. suis*: arg-aminopeptidase, DPP IV, caséinase et pseudo-chymotrypsine (Jobin & Grenier, 2003). Notre étude a permis de mettre en évidence chez *S. suis* un gène codant pour une protéase de la surface cellulaire, la pseudo-subtilisine. La pseudo-subtilisine de *S. suis*, aussi appelée SspA, est codée par le gène *SSU0757*. Ce gène possède la triade caractéristique de la famille des subtilisines protéases: motif I (Asp₂₀₀), motif II (His₂₃₉) et motif III (Ser₅₆₈). Il est présent dans tous les sérotypes testés de *S. suis* ainsi que chez les souches non-sérotypables. Une étude réalisée par Hu et coll. a révélé que le gène *SSU0757* est présent dans 29 sur 33 des sérotypes de référence (Hu, *et al.*, 2010).

Le gène codant pour la pseudo-subtilisine de *S. suis* a été cloné dans *E. coli* dans le but de surproduire la protéine. La protéase recombinante a été purifiée par chromatographie et a montré un poids moléculaire de 170 kDa par SDS-PAGE ce qui correspond au poids moléculaire calculé de 169.6 kDa. Son activité est optimale à un pH de 7 et à des températures comprises entre 25 et 37°C. Cette protéase a démontré une haute spécificité pour le substrat chromogénique succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNa tandis que des inhibiteurs spécifiques des sérines protéases ont inhibé son activité. Ceci nous a permis de mettre en relation la pseudo-chymotrypsine initialement mise en évidence par Jobin et Grenier (Jobin & Grenier, 2003) et la SspA de *S. suis* et ainsi de démontrer qu'il s'agissait de la même protéase. À l'inverse, ces analyses nous ont permis de la différencier malgré certaines

similitudes de l'IgA1 sérine protéase récemment identifiée chez *S. suis* par Zhang et coll. (Zhang, *et al.*, 2010). La SspA de *S. suis* a montré une forte homologie avec la pseudo-subtilisine PrtS de *S. thermophilus* (95.9%) et la CspA de *S. agalactiae* (49.5%).

La protéase SspA de *S. suis* porte un motif LPXTG (Leu-Pro-X-Thr-Gly) à l'extrémité C-terminale, responsable de l'ancrage de manière covalente des protéines au peptidoglycane de la paroi des cellules, suivi par un domaine hydrophobe. La sortase A, préalablement identifiée chez *S. suis* pourrait être impliquée dans l'ancrage de la pseudo-subtilisine à la paroi de ces bactéries (Osaki, *et al.*, 2002). Les pseudo-subtilisines ont souvent été considérées comme des facteurs de virulence pour les bactéries. Dans l'industrie laitière, l'utilisation de bactéries lactiques comme *S. thermophilus* est courante. Il a été démontré que la pseudo-subtilisine de *S. thermophilus*, la PrtS, est capable de dégrader la caséine en courts peptides nécessaires à la croissance du microorganisme (Fernandez-Espla, *et al.*, 2000, Courtin, *et al.*, 2002). De nombreuses études ont été publiées sur la capacité des pseudo-subtilisines similaires à la SspA de *S. suis* à dégrader des protéines naturelles (Harris, *et al.*, 2003, Choi, *et al.*, 2004, Kim, *et al.*, 2006, Bamford, *et al.*, 2007, Karlsson, *et al.*, 2009, Kurata, *et al.*, 2010). Lors de notre étude, nous avons démontré que la présence de fibrinogène durant la croissance de *S. suis* modulait sa capacité à former un biofilm. Compte tenu de la capacité des différentes pseudo-subtilisines bactériennes à dégrader le fibrinogène, nous avons évalué si la SspA de *S. suis* pouvait convertir, par clivage protéolytique, le fibrinogène en fibrine, ce qui pourrait favoriser la formation d'un biofilm. Nos résultats ont montré que la pseudo-subtilisine de *S. suis* était capable de dégrader le fibrinogène plus précisément la chaîne A α du fibrinogène. Choi et coll. ont également démontré la capacité de la subtilisine de *Bacillus* sp. DJ-4 à hydrolyser la chaîne A α du fibrinogène (Choi, *et al.*, 2004). Au contraire de la C5a subtilisine protéase de *S. pneumoniae* qui peut convertir le fibrinogène en fibrine (Harris, *et al.*, 2003), la SspA de *S. suis* ne permet pas cette conversion. Plus particulièrement, la SspA de *S. suis* empêche la transformation du fibrinogène en fibrine médié par la thrombine. Ce phénomène ne semble pas spécifique à *S. suis* puisqu'il a déjà été démontré chez *Fingoldia magna* (Karlsson, *et al.*, 2009). L'incapacité de la thrombine à former de la fibrine à partir du fibrinogène en

présence de la SspA peut contribuer à la pathogénèse des infections à *S. suis*. La SspA faciliterait ainsi l'entrée de *S. suis* dans la circulation sanguine et favoriserait par conséquent les septicémies, méningites et endocardites porcines et humaines. Le rôle de la SspA dans l'apport en éléments nutritifs essentiels pour la croissance de *S. suis* a pu être démontré à partir d'une banque de mutants de *S. suis* P1/7 créée par insertion d'un transposon Tn917 (Slater, *et al.*, 2003). En effet, les mutants de *S. suis* déficients pour le gène de la pseudo-subtilisine (M3G et G6G) ont démontré un temps de génération plus long *in vitro* que celui de la souche sauvage, confirmant ainsi le rôle physiologique de la protéase.

Les pseudo-subtilisines ont été fréquemment considérées comme des facteurs de virulence pour les bactéries qui les produisent. *S. agalactiae* est connu comme un important agent étiologique des endocardites bovines (Pringle, *et al.*, 1989). Cette bactérie a également été rapportée comme un pathogène humain à l'origine de bactériémies et de méningites chez les nouveau-nés (Sambola, *et al.*, 2002). La pseudo-subtilisine CspA de ce pathogène est considérée comme un facteur de virulence essentiel pour la bactérie (Harris, *et al.*, 2003) en lui conférant une résistance à l'opsonisation et à l'élimination par les neutrophiles humains *in vitro* (Harris, *et al.*, 2003). Les mutants M3G et G6G de *S. suis* ont donc été comparés avec la souche sauvage en regard de leur capacité à survivre dans un modèle de sang complet humain. Les résultats ont montré que la souche parentale était significativement plus résistante, suggérant ainsi que la protéase puisse dégrader des protéines du sérum humain et ainsi permettre à *S. suis* de résister à l'opsonisation par les cellules immunitaires.

La contribution de la SspA à la virulence de *S. suis* a été étudiée dans un modèle murin. Les deux mutants de *S. suis* déficients pour la SspA (M3G et G6G) se sont avérés significativement moins virulents dans la souris, suggérant ainsi un rôle critique de la protéase dans la pathogénèse des infections à *S. suis*. Ces résultats sont supportés par une étude de Hu et coll. réalisée simultanément à la nôtre et rapportant qu'un mutant de *S. suis* déficient dans l'expression de la SspA (SC19) s'est avéré être nettement moins virulent chez le porc que sa souche parentale (Hu, *et al.*, 2010). Le rôle des protéases de type

subtilisine dans la virulence a également été démontré chez d'autres bactéries (Billington, *et al.*, 1996, Karlsson, *et al.*, 2007) et organismes eucaryotes (Huang, *et al.*, 2004).

La mise en évidence d'anticorps dirigés contre la SspA dans le sérum de porcs infectés par *S. suis* permet de suggérer que la protéase est exprimée *in vivo* et qu'elle est reconnue par le système immunitaire porcin. Ces résultats appuient ceux de Li et coll. qui ont démontré une régulation à la hausse de l'expression de la SspA lors d'une infection (Li, *et al.*, 2010). Ces résultats supportent un rôle majeur de la SspA dans la pathogenèse des infections à *S. suis*. La protéase SspA de *S. suis* étant un facteur immunogène important, il est permis de supposer qu'elle pourrait être un candidat prometteur dans la conception d'un futur vaccin à *S. suis*.

De manière générale, les protéases peuvent aussi exercer directement un effet toxique envers les cellules de mammifères. En présence de la SspA, la viabilité des cellules épithéliales (NPT_r) n'a pas été affectée alors qu'un effet cytotoxique a pu être observé sur les cellules endothéliales, quoique de fortes concentrations de la SspA recombinante aient été nécessaires. Cette caractéristique pourrait contribuer à la capacité de *S. suis* à traverser la BBB au cours du processus d'infection de la méningite.

Les protéases de la famille des pseudo-subtilisines peuvent moduler la réponse inflammatoire. Ainsi, la pseudo-subtilisine CspA de *S. agalactiae*, tout comme des pseudo-subtilisines des streptocoques du groupe A, dont celle de *S. pyogenes*, possèdent la capacité à hydrolyser et inactiver les chimiokines de la famille CXC, qui recrutent les neutrophiles au site de l'infection (Edwards, *et al.*, 2005, Hidalgo-Grass, *et al.*, 2006, Zinkernagel, *et al.*, 2008, Bryan & Shelver, 2009). Dans un premier temps, nous avons évalué la capacité de la SspA de *S. suis* à induire une réponse inflammatoire dans un modèle *in vitro* utilisant les macrophages U937. La SspA s'est avérée capable d'induire la sécrétion d'IL-1 β , de TNF- α , d'IL-6, de CXCL8 et de CCL5 par les macrophages. Cette importante sécrétion de cytokines peut jouer un rôle critique dans l'induction d'une méningite par *S. suis*. En effet, Waage et coll. ont établi que le TNF- α , IL-1 et IL-6 étaient libérés dans l'espace sous-

arachnoïdien lors des méningites à méningocoques (Waage, *et al.*, 1989). De plus, des niveaux élevés d'IL-6 et d'IFN- β_2 dans le liquide céphalo-rachidien sont associés aux méningites bactériennes impliquant *S. pneumoniae* et *S. aureus* (Helfgott, *et al.*, 1989). Lopes-Cortes et coll. ont démontré que l'IL-1 β et le TNF- α étaient présents dans le liquide céphalo-rachidien et que d'importants taux de ces cytokines étaient corrélés avec des complications neurologiques (Lopez-Cortes, *et al.*, 1993). Plus précisément, l'IL1- β semble augmenter la perméabilité de la BBB (Quagliarello, *et al.*, 1991). Dans le cas d'une méningite à *S. pneumoniae*, Tsao et coll. ont démontré que le TNF- α initiait l'ouverture de la BBB et conséquemment les bactéries périphériques pouvaient ainsi pénétrer dans le cerveau et former une embolie bactérienne pour ensuite progresser en une méningite (Tsao, *et al.*, 2002). De façon générale, Moller et coll. ont indiqué que le liquide céphalo-rachidien de patients atteints d'une méningite bactérienne contenait des niveaux beaucoup plus élevés de chimiokines, en particulier de la CXCL8 (Moller, *et al.*, 2005). La capacité de la SspA de *S. suis* à induire la sécrétion par les macrophages de cytokines, s'est avérée hautement spécifique, car elle n'a pas été observée avec la trypsine pancréatique utilisée comme témoin de stimulation. Le rôle de la SspA de *S. suis* dans l'induction de la sécrétion de cytokines par les macrophages a été confirmé grâce à l'utilisation d'un mutant de *S. suis* déficient dans son expression (G6G). Ainsi, la sécrétion d'IL-1 β , TNF- α et IL-6 était significativement moins importante lorsque les macrophages étaient stimulés avec le mutant G6G plutôt que la souche sauvage. Ces résultats appuient fortement le rôle de la pseudo-subtilisine de *S. suis* dans l'induction de la réponse inflammatoire chez les macrophages.

Les protéases peuvent induire la sécrétion de médiateurs inflammatoires chez les cellules de mammifères via deux mécanismes: action sur les récepteurs PAR qui sont activés par clivage protéolytique ou mécanisme non-protéolytique impliquant l'activation de protéines kinases (Dery, *et al.*, 1998, Dong, *et al.*, 2002). Le fait que la SspA inactivée à la chaleur démontrait toujours la capacité à induire la sécrétion de cytokines dans les macrophages, exclu l'implication des récepteurs PAR. Par conséquent, la SspA induirait plutôt la sécrétion de cytokines par la voie d'activation des MAPK. Il existe trois groupes de MAPK

chez les cellules de mammifères: la protéine extracellulaire de régulation de signal (ERK), la MAPK p38 et la c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) (Dong, *et al.*, 2002). Nos résultats permettent de suggérer que la production de CCL5 et CXCL8 est contrôlée par la MAPK p38 alors que la production d'IL-6 est plutôt régie par les JNK. Les MAPK sont connues comme des régulateurs clés pour la synthèse de nombreuses cytokines, chimiokines, et autres médiateurs de l'inflammation (Dong, *et al.*, 2002). Des études antérieures ont également suggéré une implication similaire des voies régulatrices des MAPK dans la réponse inflammatoire induite par *S. suis* (Jenner & Young, 2005, Segura, *et al.*, 2006, De Greeff, *et al.*, 2010). Les cystéines protéases de *P. gingivalis*, utilisent également la voie de transduction des MAPK pour stimuler la production de cytokines par les macrophages (Grenier & Tanabe, 2010) et les fibroblastes (Matsushita, *et al.*, 2006).

Une plus importante quantité de CCL5 a été mesurée dans les surnageants de macrophages stimulés avec la protéase inactivée à la chaleur par rapport à la protéase active. Ce résultat nous a conduit à poser l'hypothèse que la SspA de *S. suis* pouvait dégrader de manière dose dépendante le CCL5, ce qui a pu être démontré à l'aide d'un dosage ELISA après incubation du CCL5 recombinant avec la protéase. De plus, la quantité de CCL5 s'est avérée être plus élevée après stimulation des macrophages avec le mutant G6G déficient pour la SspA qu'avec la souche sauvage. Ceci confirme la capacité de la pseudo-subtilisine de *S. suis* à dégrader le CCL5. Le CCL5 possède une activité chimiotactique envers les cellules du système immunitaire et son inactivation par la SspA pourrait retarder l'attraction et l'activation des neutrophiles et permettre à *S. suis* d'échapper à la phagocytose. La dégradation des cytokines par les protéases est un phénomène bien décrit chez les streptocoques du groupe A. Sumby et coll. ont rapporté la capacité de la pseudo-subtilisine SpyCEP de *S. pyogenes* à réduire l'activité des neutrophiles via le clivage et l'inactivation de la chimiokine chimiotactique des granulocytes humains 2 (GCP-2) (Sumby, *et al.*, 2008). La pseudo-subtilisine de *S. pyogenes* est également capable de cliver la CXCL8 (Hidalgo-Grass, *et al.*, 2006, Sumby, *et al.*, 2008). De plus, Bryan et Shelver ont démontré que la CSpa, une pseudo-subtilisine de *S. agalactiae*, inactivait plusieurs chimiokines dont GRO-alpha, GRO-beta, GRO-gamma, le peptide d'activation des neutrophiles de type 2

(NAP-2) et GCP-2 (Bryan & Shelver, 2009). Enfin, la pseudo-subtilisine SufA de *F. magna*, qui partage de nombreuses propriétés avec la SspA de *S. suis*, a montré une capacité à dégrader la chimiokine MIG (CXCL9) (Karlsson, *et al.*, 2009). La dégradation du CXCL8 par *S. suis* a été rapportée précédemment par Vanier et coll (Vanier, *et al.*, 2009). Toutefois, la protéase impliquée dans le clivage du CXCL8 était différente de la pseudo-subtilisine SspA, étant sécrétée par *S. suis* plutôt qu'ancrée à la paroi cellulaire (Vanier, *et al.*, 2009).

En conclusion, cette étude a apporté des évidences que la SspA de *S. suis* peut jouer différents rôles dans la pathogénicité de cette espèce bactérienne (Figure 5-2). En plus de dégrader plusieurs protéines associées aux premières lignes du système de défense et d'exercer un effet cytotoxique direct sur certains types de cellules de l'hôte, cette protéase peut aussi moduler l'état inflammatoire associée à la méningite. Elle peut induire la sécrétion d'importantes quantités de cytokines pro-inflammatoires ou, lorsqu'elle est présente à une forte concentration, provoquer la dégradation des cytokines telles que le CCL5 et l'IL-6. Compte tenu de la possible implication de la pseudo-subtilisine dans la virulence de *S. suis*, des études complémentaires seraient intéressantes à réaliser afin de déterminer si la SspA peut représenter un candidat prometteur pour un vaccin à base de protéines.

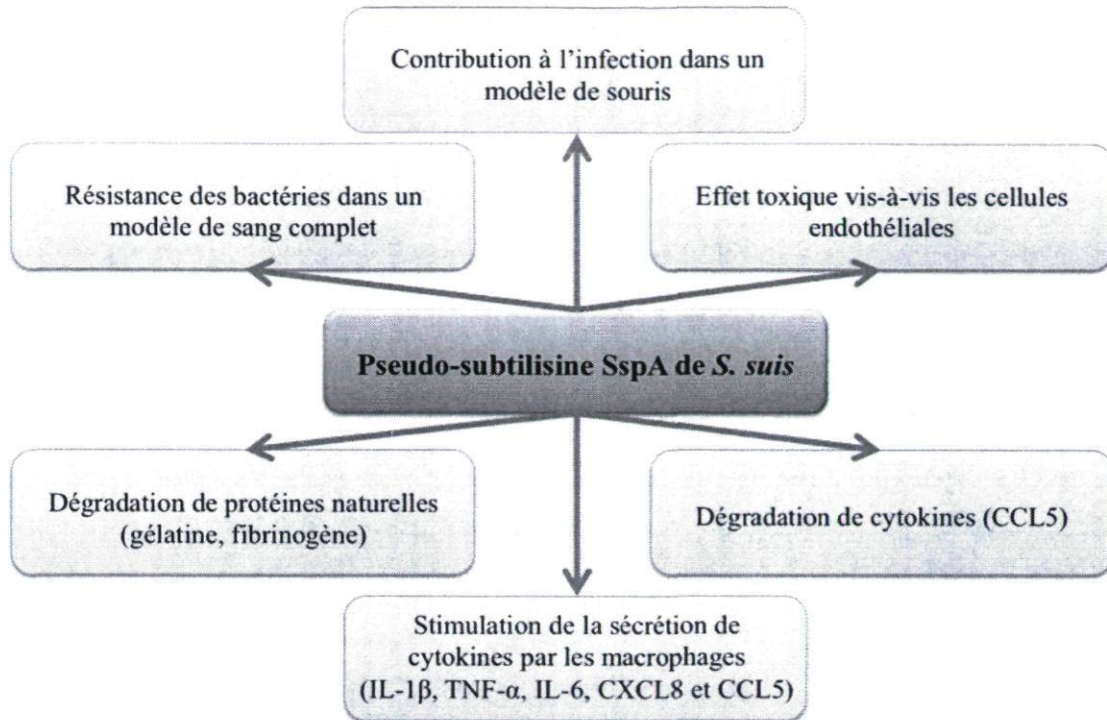


Figure 5-2: Rôles pathogéniques de la pseudo-subtilisine SspA de *S. suis*.

D. discoideum est une amibe haploïde qui utilise les microorganismes et en particulier les bactéries comme source nutritive (Annesley & Fisher, 2009, Clarke, 2010). Cette amibe est reconnue comme un organisme phagocytaire très actif (Bozzaro, *et al.*, 2008, Clarke, 2010). De par sa similitude avec les macrophages, cette amibe a été identifiée comme un modèle permettant l'identification de la virulence de bactéries pathogènes, plus spécifiquement à Gram-négatif, affectant les humains et les animaux (Froquet, *et al.*, 2007, Steinert, 2010). Nous nous sommes intéressés à savoir si le modèle d'étude de la virulence de *D. discoideum* pouvait être applicable à *S. suis*. L'avantage de ce modèle consiste en la capacité que possède *D. discoideum* à se multiplier sur des tapis bactériens et à former des plaques de phagocytose en présence de bactéries non pathogènes (indicatrice de leur digestion par l'amibe), mais pas en présence de bactéries pathogènes.

Les amibes se sont comportées différemment vis-à-vis *S. suis* S735 montrant une capsule polysaccharidique dense, par rapport aux mutants non capsulés BD101 et 2A. Plus

spécifiquement, *D. discoideum* a été en mesure de produire des plaques de phagocytose sur les tapis bactériens de souches n'exprimant pas de capsule, ce qui confirme le rôle de la capsule dans la virulence de *S. suis* (Charland, *et al.*, 1998, Fittipaldi, *et al.*, 2007). De plus, la souche non-sérotypable de *S. suis* 10782182 qui ne possède pas de capsule s'est également avérée être sensible à *D. discoideum*. Fait intéressant, la souche *S. suis* 10782182 a été isolée d'un porc malade affecté d'une endocardite. Nous avons pu démontrer la capacité des souches non-sérotypables à former un dense biofilm et par conséquent nous suggérons que la capacité de formation du biofilm est un important facteur de virulence pour *S. suis*. Ainsi, l'expression de la capsule chez *S. suis* pourrait être modulée, à l'image de ce qui a été démontré chez d'autres bactéries, au cours des infections selon le besoin de la bactérie (Kurola, *et al.*, 2009, Varvio, *et al.*, 2009).

S. suis P1/7 ne permet pas la formation de plaques de phagocytose par *D. discoideum* sur les tapis bactériens, à la différence des mutants M3G et G6G de *S. suis* déficients pour l'expression de la pseudo-subtilisine. Ces données sont en accord avec les résultats obtenus précédemment au laboratoire, confirmant la SspA comme un important facteur de virulence chez *S. suis*. Une corrélation a été établie entre les résultats obtenus dans le modèle de *D. discoideum* et les résultats obtenus à partir de modèles animaux. Cette confirmation de composants considérés comme des facteurs de virulence chez *S. suis* permet de valider la mise au point d'un nouveau modèle de détection de la virulence pour une bactérie Gram-positive. Ce modèle présente des avantages techniques et élimine les considérations éthiques. Ainsi, le modèle de *D. discoideum*, ouvre la porte par sa simplicité à l'identification de nouveaux gènes de virulence et ultérieurement à une détermination quantitative de la contribution de chacun de ces gènes dans la virulence de *S. suis*.

Enfin, cette partie du projet a permis de proposer l'hypothèse d'une potentielle relation entre la capsule et la SspA chez *S. suis*. En effet, ces deux facteurs de virulence semblent être essentiels à la pathogénicité de la bactérie donc possiblement liés. La capsule pourrait s'avérer nécessaire pour permettre la résistance des bactéries à la phagocytose alors que la SspA pourrait plutôt être importante lors d'une autre étape essentielle au développement de

l'infection. Sans capsule, les souches de *S. suis* semblent être digérées par les amibes, ne donnant pas la chance à la protéase d'être surexprimée tel que démontré par Li et coll. (Li, *et al.*, 2010).

CHAPITRE 6: CONCLUSION

En conclusion, cette étude a permis d'identifier et de caractériser deux nouveaux facteurs de virulence chez *S. suis*: le biofilm et la pseudo-subtilisine SspA. Cette étude a permis d'établir un lien entre ces deux facteurs de virulence et de supposer de possibles rôles lors de l'infection. La mise en évidence de la SspA chez *S. suis* apporte une perspective d'avenir intéressante, car cette protéine très immunogène pourrait être utilisée pour la création d'un nouveau vaccin. Grâce à cette étude, il a également été mis au point un modèle d'étude novateur de la virulence chez *S. suis*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abiko Y, Hayakawa M, Murai S & Takiguchi H (1985) Glycylprolyl dipeptidylaminopeptidase from *Bacteroides gingivalis*. *J Dent Res* 64: 106-111.
- Allen AG, Lindsay H, Seilly D, Bolitho S, Peters SE & Maskell DJ (2004) Identification and characterisation of hyaluronate lyase from *Streptococcus suis*. *Microb Pathog* 36: 327-335.
- Allen AG, Bolitho S, Lindsay H, Khan S, Bryant C, Norton P, Ward P, Leigh J, Morgan J, Riches H, Eastty S & Maskell D (2001) Generation and characterization of a defined mutant of *Streptococcus suis* lacking suilysin. *Infect Immun* 69: 2732-2735.
- Amass SF, SanMiguel P & Clark LK (1997) Demonstration of vertical transmission of *Streptococcus suis* in swine by genomic fingerprinting. *J Clin Microbiol* 35: 1595-1596.
- Annesley SJ & Fisher PR (2009) *Dictyostelium discoideum*--a model for many reasons. *Mol Cell Biochem* 329: 73-91.
- Anwar H, van Biesen T, Dasgupta M, Lam K & Costerton JW (1989) Interaction of biofilm bacteria with antibiotics in a novel in vitro chemostat system. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 1824-1826.
- Aparna MS & Yadav S (2008) Biofilms: microbes and disease. *Braz J Infect Dis* 12: 526-530.
- Appel W (1986) Chymotrypsin: molecular and catalytic properties. *Clin Biochem* 19: 317-322.
- Aranda J, Garrido ME, Fittipaldi N, Cortes P, Llagostera M, Gottschalk M & Barbe J (2010) The cation-uptake regulators AdcR and Fur are necessary for full virulence of *Streptococcus suis*. *Vet Microbiol* 144: 246-249.
- Arditi M, Shulman ST, Davis AT & Yogev R (1989) Group C beta-hemolytic streptococcal infections in children: nine pediatric cases and review. *Rev Infect Dis* 11: 34-45.
- Arends JP & Zanen HC (1988) Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *Rev Infect Dis* 10: 131-137.
- Bahloul H, Mofredj A, Mrabet A, Gineyt G & Rousselier P (2008) *Streptococcus suis* meningitis after oral contamination? *Med Mal Infect* 38: 281-282.

- Baiano JC, Tumbol RA, Umapathy A & Barnes AC (2008) Identification and molecular characterisation of a fibrinogen binding protein from *Streptococcus iniae*. *BMC Microbiol* 8: 67.
- Baillie GS & Douglas LJ (1998) Iron-limited biofilms of *Candida albicans* and their susceptibility to amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 2146-2149.
- Bamford CV, Fenno JC, Jenkinson HF & Dymock D (2007) The chymotrypsin-like protease complex of *Treponema denticola* ATCC 35405 mediates fibrinogen adherence and degradation. *Infect Immun* 75: 4364-4372.
- Barichello T, dos Santos I, Savi GD, Simoes LR, Silvestre T, Comim CM, Sachs D, Teixeira MM, Teixeira AL & Quevedo J (2010) TNF-alpha, IL-1beta, IL-6, and cinc-1 levels in rat brain after meningitis induced by *Streptococcus pneumoniae*. *J Neuroimmunol* 221: 42-45.
- Barrett AJ (2001) Proteases. *Curr Protoc Protein Sci* Chapter 21: Unit 21 21.
- Bashore TM, Cabell C & Fowler V, Jr. (2006) Update on infective endocarditis. *Curr Probl Cardiol* 31: 274-352.
- Bauer ME, Townsend CA, Doster RS, Fortney KR, Zwickl BW, Katz BP, Spinola SM & Janowicz DM (2009) A fibrinogen-binding lipoprotein contributes to the virulence of *Haemophilus ducreyi* in humans. *J Infect Dis* 199: 684-692.
- Baums CG & Valentin-Weigand P (2009) Surface-associated and secreted factors of *Streptococcus suis* in epidemiology, pathogenesis and vaccine development. *Anim Health Res Rev* 10: 65-83.
- Baums CG, Kaim U, Fulde M, Ramachandran G, Goethe R & Valentin-Weigand P (2006) Identification of a novel virulence determinant with serum opacification activity in *Streptococcus suis*. *Infect Immun* 74: 6154-6162.
- Beaudoin M, Higgins R, Harel J & Gottschalk M (1992) Studies on a murine model for evaluation of virulence of *Streptococcus suis* capsular type 2 isolates. *FEMS Microbiol Lett* 78: 111-116.
- Benga L, Goethe R, Rohde M & Valentin-Weigand P (2004) Non-encapsulated strains reveal novel insights in invasion and survival of *Streptococcus suis* in epithelial cells. *Cell Microbiol* 6: 867-881.

- Benga L, Fulde M, Neis C, Goethe R & Valentin-Weigand P (2008) Polysaccharide capsule and suilysin contribute to extracellular survival of *Streptococcus suis* co-cultivated with primary porcine phagocytes. *Vet Microbiol* 132: 211-219.
- Benkirane R, Gottschalk MG, Jacques M & Dubreuil JD (1998) Immunochemical characterization of an IgG-binding protein of *Streptococcus suis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 20: 121-127.
- Bergmann S, Rohde M, Chhatwal GS & Hammerschmidt S (2001) alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol Microbiol* 40: 1273-1287.
- Berthelot-Herault F, Marois C, Gottschalk M & Kobisch M (2002) Genetic diversity of *Streptococcus suis* strains isolated from pigs and humans as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 40: 615-619.
- Berthelot-Herault F, Morvan H, Keribin AM, Gottschalk M & Kobisch M (2000) Production of muraminidase-released protein (MRP), extracellular factor (EF) and suilysin 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.
- Bethe G, Nau R, Wellmer A, Hakenbeck R, Reinert RR, Heinz HP & Zysk G (2001) The cell wall-associated serine protease PrtA: a highly conserved virulence factor of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* 205: 99-104.
- Billington SJ, Johnston JL & Rood JI (1996) Virulence regions and virulence factors of the ovine footrot pathogen, *Dichelobacter nodosus*. *FEMS Microbiol Lett* 145: 147-156.
- Bodet C, Chandad F & Grenier D (2005) Modulation of cytokine production by *Porphyromonas gingivalis* in a macrophage and epithelial cell co-culture model. *Microbes Infect* 7: 448-456.
- Bonifait L, Gottschalk M & Grenier D (2010) Cell surface characteristics of nontypeable isolates of *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiol Lett* 311: 160-166.
- Bonifait L, Dominguez-Punaro Mde L, Vaillancourt K, Bart C, Slater JD, Frenette M, Gottschalk M & Grenier D (2010) The cell envelope subtilisin-like proteinase is a critical virulence determinant for *Streptococcus suis*. *BMC Microbiol* 10: 42.

- Bozzaro S, Bucci C & Steinert M (2008) Phagocytosis and host-pathogen interactions in *Dictyostelium* with a look at macrophages. *Int Rev Cell Mol Biol* 271: 253-300.
- Brady LJ, Maddocks SE, Larson MR, Forsgren N, Persson K, Deivanayagam CC & Jenkinson HF (2010) The changing faces of *Streptococcus* antigen I/II polypeptide family adhesins. *Mol Microbiol* 77: 276-286.
- Brassard J, Gottschalk M & Quessy S (2004) Cloning and purification of the *Streptococcus suis* serotype 2 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its involvement as an adhesin. *Vet Microbiol* 102: 87-94.
- Breton J, Mitchell WR & Rosendal S (1986) *Streptococcus suis* in slaughter pigs and abattoir workers. *Can J Vet Res* 50: 338-341.
- Brown CK, Gu ZY, Matsuka YV, Purushothaman SS, Winter LA, Cleary PP, Olmsted SB, Ohlendorf DH & Earhart CA (2005) Structure of the streptococcal cell wall C5a peptidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 18391-18396.
- Bryan JD & Shelver DW (2009) *Streptococcus agalactiae* CspA is a serine protease that inactivates chemokines. *J Bacteriol* 191: 1847-1854.
- Chabot-Roy G, Willson P, Segura M, Lacouture S & Gottschalk M (2006) Phagocytosis and killing of *Streptococcus suis* by porcine neutrophils. *Microb Pathog* 41: 21-32.
- Chander Y, Oliveira SR & Goyal SM (2010) Identification of the tet(B) resistance gene in *Streptococcus suis*. *Vet J*.
- Charland N, Kobisch M, Martineau-Doize B, Jacques M & Gottschalk M (1996) Role of capsular sialic acid in virulence and resistance to phagocytosis of *Streptococcus suis* capsular type 2. *FEMS Immunol Med Microbiol* 14: 195-203.
- Charland N, Harel J, Kobisch M, Lacasse S & Gottschalk M (1998) *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology* 144 (Pt 2): 325-332.
- Chatellier S, Harel J, Zhang Y, Gottschalk M, Higgins R, Devriese LA & Brousseau R (1998) Phylogenetic diversity of *Streptococcus suis* strains of various serotypes as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison. *Int J Syst Bacteriol* 48 Pt 2: 581-589.
- Chen C, Tang J, Dong W, Wang C, Feng Y, Wang J, Zheng F, Pan X, Liu D, Li M, Song Y, Zhu X, Sun H, Feng T, Guo Z, Ju A, Ge J, Dong Y, Sun W, Jiang Y, Yan J, Yang H,

- Wang X, Gao GF, Yang R & Yu J (2007) A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *S. suis* 2 Chinese isolates. *PLoS One* 2: e315.
- Chen CC & Cleary PP (1990) Complete nucleotide sequence of the streptococcal C5a peptidase gene of *Streptococcus pyogenes*. *J Biol Chem* 265: 3161-3167.
- Cheng HC, Abdel-Ghany M, Elble RC & Pauli BU (1998) Lung endothelial dipeptidyl peptidase IV promotes adhesion and metastasis of rat breast cancer cells via tumor cell surface-associated fibronectin. *J Biol Chem* 273: 24207-24215.
- Choi NS, Chang KT, Jae Maeng P & Kim SH (2004) Cloning, expression, and fibrin (ogen)olytic properties of a subtilisin DJ-4 gene from *Bacillus* sp. DJ-4. *FEMS Microbiol Lett* 236: 325-331.
- Christensen JJ, Jensen IP, Faerk J, Kristensen B, Skov R & Korner B (1995) Bacteremia/septicemia due to *Aerococcus*-like organisms: report of seventeen cases. Danish ALO Study Group. *Clin Infect Dis* 21: 943-947.
- Cieslewicz MJ, Kasper DL, Wang Y & Wessels MR (2001) Functional analysis in type Ia group B *Streptococcus* of a cluster of genes involved in extracellular polysaccharide production by diverse species of streptococci. *J Biol Chem* 276: 139-146.
- Clarke M (2010) Recent insights into host-pathogen interactions from *Dictyostelium*. *Cell Microbiol* 12: 283-291.
- Clifton-Hadley FA & Enright MR (1984) Factors affecting the survival of *Streptococcus suis* type 2. *Vet Rec* 114: 584-586.
- Cloutier G, D'Allaire S, Martinez G, Surprenant C, Lacouture S & Gottschalk M (2003) Epidemiology of *Streptococcus suis* serotype 5 infection in a pig herd with and without clinical disease. *Vet Microbiol* 97: 135-151.
- Clutterbuck AL, Woods EJ, Knottenbelt DC, Clegg PD, Cochrane CA & Percival SL (2007) Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet Microbiol* 121: 1-17.
- Costa AT, Lobato FC, Abreu VL, Assis RA, Reis R & Uzal FA (2005) Serotyping and evaluation of the virulence in mice of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 47: 113-115.
- Costerton JW (1995) Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol* 15: 137-140.

- Costerton JW (1999) Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents* 11: 217-221; discussion 237-219.
- Costerton JW, Geesey GG & Cheng KJ (1978) How bacteria stick. *Sci Am* 238: 86-95.
- Costerton JW, Stewart PS & Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR & Lappinscott HM (1995) Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49: 711-745.
- Courtin P, Monnet V & Rul F (2002) Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus/Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. *Microbiology* 148: 3413-3421.
- Courtney HS (1991) Degradation of connective tissue proteins by serine proteases from *Streptococcus pneumoniae*. *Biochem Biophys Res Commun* 175: 1023-1028.
- Courtney HS, Hasty DL & Dale JB (2006) Anti-phagocytic mechanisms of *Streptococcus pyogenes*: binding of fibrinogen to M-related protein. *Mol Microbiol* 59: 936-947.
- Cucarella C, Tormo MA, Ubeda C, Trotonda MP, Monzon M, Peris C, Amorena B, Lasa I & Penades JR (2004) Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 72: 2177-2185.
- Cunin R, Glansdorff N, Pierard A & Stalon V (1986) Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol Rev* 50: 314-352.
- Cvitkovitch DG (2001) Genetic competence and transformation in oral streptococci. *Crit Rev Oral Biol Med* 12: 217-243.
- Cvitkovitch DG, Li YH & Ellen RP (2003) Quorum sensing and biofilm formation in streptococcal infections. *J Clin Invest* 112: 1626-1632.
- Dabo SM, Confer AW & Hartson SD (2005) Adherence of *Pasteurella multocida* to fibronectin. *Vet Microbiol* 110: 265-275.
- De Greeff A, Buys H, Verhaar R, Dijkstra J, van Alphen L & Smith HE (2002) Contribution of fibronectin-binding protein to pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* 70: 1319-1325.

- De Greeff A, Benga L, Wichgers Schreur PJ, Valentin-Weigand P, Rebel JM & Smith HE (2010) Involvement of NF-kappaB and MAP-kinases in the transcriptional response of alveolar macrophages to *Streptococcus suis*. *Vet Microbiol* 141: 59-67.
- De Moor CE (1963) Septicaemic Infections in Pigs, Caused by Haemolytic Streptococci of New Lancefield Groups Designated R, S, and T. *Antonie Van Leeuwenhoek* 29: 272-280.
- Dery O, Corvera CU, Steinhoff M & Bunnett NW (1998) Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am J Physiol* 274: C1429-1452.
- Devriese LA, Sustronck B, Maenhout T & Haesebrouck F (1990) *Streptococcus suis* meningitis in a horse. *Vet Rec* 127: 68.
- Diebel LN, Liberati DM, Baylor AE, Brown WJ & Devlin J (2004) Immunoglobulin A protease is a virulence factor for gram-negative pneumonia. *Surgery* 136: 937-943.
- Dominguez-Punaro L, Segura M, Contreras I, Lachance C, Houde M, Lecours MP, Olivier M & Gottschalk M (2010) In vitro characterization of the microglial inflammatory response to *Streptococcus suis*, an important emerging zoonotic agent of meningitis. *Infect Immun* 78: 5074-5085.
- Dominguez-Punaro MC, Segura M, Plante MM, Lacouture S, Rivest S & Gottschalk M (2007) *Streptococcus suis* serotype 2, an important swine and human pathogen, induces strong systemic and cerebral inflammatory responses in a mouse model of infection. *J Immunol* 179: 1842-1854.
- Dong C, Davis RJ & Flavell RA (2002) MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 20: 55-72.
- Dong RP, Tachibana K, Hegen M, Munakata Y, Cho D, Schlossman SF & Morimoto C (1997) Determination of adenosine deaminase binding domain on CD26 and its immunoregulatory effect on T cell activation. *J Immunol* 159: 6070-6076.
- Donlan RM & Costerton JW (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15: 167-193.
- Dupas D, Vignon M & Geraut C (1992) *Streptococcus suis* meningitis. A severe noncompensated occupational disease. *J Occup Med* 34: 1102-1105.

- Durand F, Perino CL, Recule C, Brion JP, Kobish M, Guerber F & Croize J (2001) Bacteriological diagnosis of *Streptococcus suis* meningitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20: 519-521.
- Edwards RJ, Taylor GW, Ferguson M, Murray S, Rendell N, Wrigley A, Bai Z, Boyle J, Finney SJ, Jones A, Russell HH, Turner C, Cohen J, Faulkner L & Sriskandan S (2005) Specific C-terminal cleavage and inactivation of interleukin-8 by invasive disease isolates of *Streptococcus pyogenes*. *J Infect Dis* 192: 783-790.
- Elliott SD & Tai JY (1978) The type-specific polysaccharides of *Streptococcus suis*. *J Exp Med* 148: 1699-1704.
- Elliott SD, McCarty M & Lancefield RC (1977) Teichoic acids of group D streptococci with special reference to strains from pig meningitis (*Streptococcus suis*). *J Exp Med* 145: 490-499.
- Esgleas M, Li Y, Hancock MA, Harel J, Dubreuil JD & Gottschalk M (2008) Isolation and characterization of alpha-enolase, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus suis*. *Microbiology* 154: 2668-2679.
- Esteve C & Birbeck TH (2004) Secretion of haemolysins and proteases by *Aeromonas hydrophila* EO63: separation and characterization of the serine protease (caseinase) and the metalloprotease (elastase). *J Appl Microbiol* 96: 994-1001.
- Euzéby J (1999) *Streptococcus suis*: Une brève revue. *Revue Medecine Vétérinaire* 150: 981-988.
- Feipeing P, Gordon A & McFeters A (1994) Rapid in situ assessment of physiological activities in bacterial biofilms using fluorescent probes. *J Microbiol Methods* 20: 1-10.
- Feng Y, Pan X, Sun W, Wang C, Zhang H, Li X, Ma Y, Shao Z, Ge J, Zheng F, Gao GF & Tang J (2009) *Streptococcus suis* enolase functions as a protective antigen displayed on the bacterial cell surface. *J Infect Dis* 200: 1583-1592.
- Fernandez-Espla MD, Garault P, Monnet V & Rul F (2000) *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Appl Environ Microbiol* 66: 4772-4778.

- Fittipaldi N, Harel J, D'Amours B, Lacouture S, Kobisch M & Gottschalk M (2007) Potential use of an unencapsulated and aromatic amino acid-auxotrophic *Streptococcus suis* mutant as a live attenuated vaccine in swine. *Vaccine* 25: 3524-3535.
- Fittipaldi N, Fuller TE, Teel JF, Wilson TL, Wolfram TJ, Lowery DE & Gottschalk M (2009) Serotype distribution and production of muramidase-released protein, extracellular factor and suilysin by field strains of *Streptococcus suis* isolated in the United States. *Vet Microbiol* 139: 310-317.
- Fittipaldi N, Sekizaki T, Takamatsu D, Dominguez-Punaro Mde L, Harel J, Bui NK, Vollmer W & Gottschalk M (2008) Significant contribution of the pgdA gene to the virulence of *Streptococcus suis*. *Mol Microbiol* 70: 1120-1135.
- Fittipaldi N, Takamatsu D, de la Cruz Dominguez-Punaro M, Lecours MP, Montpetit D, Osaki M, Sekizaki T & Gottschalk M (2010) Mutations in the gene encoding the ancillary pilin subunit of the *Streptococcus suis* srtF cluster result in pili formed by the major subunit only. *PLoS One* 5: e8426.
- Fittipaldi N, Sekizaki T, Takamatsu D, Harel J, Dominguez-Punaro Mde L, Von Aulock S, Draing C, Marois C, Kobisch M & Gottschalk M (2008) D-alanylation of lipoteichoic acid contributes to the virulence of *Streptococcus suis*. *Infect Immun* 76: 3587-3594.
- Fletcher M & Loeb GI (1979) Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. *Appl Environ Microbiol* 37: 67-72.
- Fontaine MC, Perez-Casal J & Willson PJ (2004) Investigation of a novel DNase of *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* 72: 774-781.
- Froquet R, Cherix N, Burr SE, Frey J, Vilches S, Tomas JM & Cosson P (2007) Alternative host model to evaluate *Aeromonas* virulence. *Appl Environ Microbiol* 73: 5657-5659.
- Fuqua WC, Winans SC & Greenberg EP (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 176: 269-275.
- Galina L, Vecht U, Wisselink HJ & Pijoan C (1996) Prevalence of various phenotypes of *Streptococcus suis* isolated from swine in the U.S.A. based on the presence of muraminidase-released protein and extracellular factor. *Can J Vet Res* 60: 72-74.

- Garibaldi M, Rodriguez-Ortega MJ, Mandanici F, Cardaci A, Midiri A, Papasergi S, Gambadoro O, Cavallari V, Teti G & Beninati C (2010) Immunoprotective activities of a *Streptococcus suis* pilus subunit in murine models of infection. *Vaccine* 28: 3609-3616.
- Ge J, Feng Y, Ji H, Zhang H, Zheng F, Wang C, Yin Z, Pan X & Tang J (2009) Inactivation of dipeptidyl peptidase IV attenuates the virulence of *Streptococcus suis* serotype 2 that causes streptococcal toxic shock syndrome. *Curr Microbiol* 59: 248-255.
- Giebink GS (2001) The prevention of pneumococcal disease in children. *N Engl J Med* 345: 1177-1183.
- Goldstein JM, Banbula A, Kordula T, Mayo JA & Travis J (2001) Novel extracellular x-prolyl dipeptidyl-peptidase (DPP) from *Streptococcus gordonii* FSS2: an emerging subfamily of viridans Streptococcal x-prolyl DPPs. *Infect Immun* 69: 5494-5501.
- Goldstein JM, Nelson D, Kordula T, Mayo JA & Travis J (2002) Extracellular arginine aminopeptidase from *Streptococcus gordonii* FSS2. *Infect Immun* 70: 836-843.
- Gottschalk M & Segura M (2000) The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet Microbiol* 76: 259-272.
- Gottschalk M, Higgins R & Boudreau M (1993) Use of polyvalent coagglutination reagents for serotyping of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol* 31: 2192-2194.
- Gottschalk M, Kobisch M & Berthelot-Herault F (2001) L'infection à *Streptococcus suis* chez le porc. *Journ Rech Porc en France* 33: 269-276.
- Gottschalk M, Segura M & Xu J (2007) *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. *Anim Health Res Rev* 8: 29-45.
- Gottschalk M, Xu J, Calzas C & Segura M (2010) *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? *Future Microbiol* 5: 371-391.
- Gottschalk M, Lacouture S, Bonifait L & Grenier D (2010) Distribution of *Streptococcus suis* capsular types isolated from diseased pigs in 2008 and 2009 in Canada. *21th Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress, Vancouver, Canada*.
- Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Mittal KR & Henrichsen J (1989) Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol* 27: 2633-2636.

- Gottschalk M, Lebrun A, Wisselink H, Dubreuil JD, Smith H & Vecht U (1998) Production of virulence-related proteins by Canadian strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. *Can J Vet Res* 62: 75-79.
- Gottschalk MG, Lacouture S & Dubreuil JD (1995) Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin. *Microbiology* 141 (Pt 1): 189-195.
- Graveline R, Segura M, Radzioch D & Gottschalk M (2007) TLR2-dependent recognition of *Streptococcus suis* is modulated by the presence of capsular polysaccharide which modifies macrophage responsiveness. *Int Immunol* 19: 375-389.
- Grenier D & Tanabe S (2010) *Porphyromonas gingivalis* gingipains trigger a proinflammatory response in human monocyte derived macrophages through the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Toxins* 2: 341-352.
- Grenier D, Grignon L & Gottschalk M (2009) Characterisation of biofilm formation by a *Streptococcus suis* meningitis isolate. *Vet J* 179: 292-295.
- Gu H, Zhu H & Lu C (2009) Use of in vivo-induced antigen technology (IVIAT) for the identification of *Streptococcus suis* serotype 2 in vivo-induced bacterial protein antigens. *BMC Microbiol* 9: 201.
- Gutheil WG, Subramanyam M, Flentke GR, Sanford DG, Munoz E, Huber BT & Bachovchin WW (1994) Human immunodeficiency virus 1 Tat binds to dipeptidyl aminopeptidase IV (CD26): a possible mechanism for Tat's immunosuppressive activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 6594-6598.
- Haataja S, Tikkanen K, Hytonen J & Finne J (1996) The Gal alpha 1-4 Gal-binding adhesin of *Streptococcus suis*, a gram-positive meningitis-associated bacterium. *Adv Exp Med Biol* 408: 25-34.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW & Stoodley P (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2: 95-108.
- Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D & Phipps RP (2002) Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* 23: 144-150.
- Harris TO, Shelver DW, Bohnsack JF & Rubens CE (2003) A novel streptococcal surface protease promotes virulence, resistance to opsonophagocytosis, and cleavage of human fibrinogen. *J Clin Invest* 111: 61-70.

- Hasegawa T, Minami M, Okamoto A, Tatsuno I, Isaka M & Ohta M (2009) Characterization of a virulent and cell-wall-located deoxyribonuclease of *Streptococcus pyogenes*. *Microbiology* 156: 184-190.
- Heithoff DM, Conner CP, Hanna PC, Julio SM, Hentschel U & Mahan MJ (1997) Bacterial infection as assessed by *in vivo* gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 934-939.
- Helfgott DC, Tatter SB, Santhanam U, Clarick RH, Bhardwaj N, May LT & Sehgal PB (1989) Multiple forms of IFN-beta 2/IL-6 in serum and body fluids during acute bacterial infection. *J Immunol* 142: 948-953.
- Hernandez-Romano P, Hernandez R, Arroyo R, Alderete JF & Lopez-Villasenor I (2010) Identification and characterization of a surface-associated, subtilisin-like serine protease in *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology* 137: 1621-1635.
- Hidalgo-Grass C, Mishalian I, Dan-Goor M, Belotserkovsky I, Eran Y, Nizet V, Peled A & Hanski E (2006) A streptococcal protease that degrades CXC chemokines and impairs bacterial clearance from infected tissues. *EMBO J* 25: 4628-4637.
- Higgins J, Loughman A, van Kessel KP, van Strijp JA & Foster TJ (2006) Clumping factor A of *Staphylococcus aureus* inhibits phagocytosis by human polymorphonuclear leucocytes. *FEMS Microbiol Lett* 258: 290-296.
- Higgins R & Gottschalk M (1990) An update on *Streptococcus suis* identification. *J Vet Diagn Invest* 2: 249-252.
- Higgins R & Gottschalk M (1999) Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in 1998. *Can Vet J* 40: 277.
- Higgins R & Gottschalk M (1999) Streptococcal diseases. *Disease of swine* 41: 563-570.
- Higgins R & Gottschalk M (2000) Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in 1999. *Can Vet J* 41: 414.
- Higgins R & Gottschalk M (2001) Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in 2000. *Can Vet J* 42: 223.
- Higgins R & Gottschalk M (2005) Streptococcal diseases. 769-783.
- Higgins R, Gottschalk M, Boudreau M, Lebrun A & Henrichsen J (1995) Description of six new capsular types (29-34) of *Streptococcus suis*. *J Vet Diagn Invest* 7: 405-406.
- Higgins R & Gottschalk M (2005) Streptococcal diseases. 769-783.

- Hiraoka BY, Fukasawa K & Harada M (1983) Purification and characterization of two novel arginine aminopeptidases from *Streptococcus mitis* ATCC 9811. *J Biochem* 94: 1201-1208.
- Hoiby N, Doring G & Schiøtz PO (1986) The role of immune complexes in the pathogenesis of bacterial infections. *Annu Rev Microbiol* 40: 29-53.
- Hoiby N, Bjørnsholt T, Givskov M, Molin S & Ciofu O (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 35: 322-332.
- Hoiby N, Krogh Johansen H, Moser C, Song Z, Ciofu O & Kharazmi A (2001) *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. *Microbes Infect* 3: 23-35.
- Holt ME, Enright MR & Alexander TJ (1988) Immunisation of pigs with live cultures of *Streptococcus suis* type 2. *Res Vet Sci* 45: 349-352.
- Holt ME, Enright MR & Alexander TJ (1990) Immunisation of pigs with killed cultures of *Streptococcus suis* type 2. *Res Vet Sci* 48: 23-27.
- Hommez J, Devriese LA, Henrichsen J & Castryck F (1986) Identification and characterization of *Streptococcus suis*. *Vet Microbiol* 11: 349-355.
- Hu Q, Liu P, Yu Z, Zhao G, Li J, Teng L, Zhou M, Bei W, Chen H & Jin M (2010) Identification of a cell wall-associated subtilisin-like serine protease involved in the pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. *Microb Pathog* 48: 103-109.
- Huang SH, Stins MF & Kim KS (2000) Bacterial penetration across the blood-brain barrier during the development of neonatal meningitis. *Microbes Infect* 2: 1237-1244.
- Huang X, Zhao N & Zhang K (2004) Extracellular enzymes serving as virulence factors in *nematophagous* fungi involved in infection of the host. *Res Microbiol* 155: 811-816.
- Inouye K, Kusano M, Hashida Y, Minoda M & Yasukawa K (2007) Engineering, expression, purification, and production of recombinant thermolysin. *Biotechnol Annu Rev* 13: 43-64.
- Jacobs AA, van den Berg AJ & Loeffen PL (1996) Protection of experimentally infected pigs by suilysin, the thiol-activated haemolysin of *Streptococcus suis*. *Vet Rec* 139: 225-228.

- Jacobs AA, Loeffen PL, van den Berg AJ & Storm PK (1994) Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*. *Infect Immun* 62: 1742-1748.
- Jacques M, Gottschalk M, Foiry B & Higgins R (1990) Ultrastructural study of surface components of *Streptococcus suis*. *J Bacteriol* 172: 2833-2838.
- Jenner RG & Young RA (2005) Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling. *Nat Rev Microbiol* 3: 281-294.
- Jensen PO, Givskov M, Bjarnsholt T & Moser C (2010) The immune system vs. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol* 59: 292-305.
- Jing HB, Yuan J, Wang J, Yuan Y, Zhu L, Liu XK, Zheng YL, Wei KH, Zhang XM, Geng HR, Duan Q, Feng SZ, Yang RF, Cao WC, Wang HL & Jiang YQ (2008) Proteome analysis of *Streptococcus suis* serotype 2. *Proteomics* 8: 333-349.
- Jobin MC & Grenier D (2003) Identification and characterization of four proteases produced by *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiol Lett* 220: 113-119.
- Jobin MC, Brassard J, Quessy S, Gottschalk M & Grenier D (2004) Acquisition of host plasmin activity by the Swine pathogen *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* 72: 606-610.
- Jobin MC, Martinez G, Motard J, Gottschalk M & Grenier D (2005) Cloning, purification, and enzymatic properties of dipeptidyl peptidase IV from the swine pathogen *Streptococcus suis*. *J Bacteriol* 187: 795-799.
- Jobin MC, Fortin J, Willson PJ, Gottschalk M & Grenier D (2005) Acquisition of plasmin activity and induction of arachidonic acid release by *Streptococcus suis* in contact with human brain microvascular endothelial cells. *FEMS Microbiol Lett* 252: 105-111.
- Johansson LM (2006) Meningitis and septicemia in a 7-week-old piglet caused by dual streptococcal infection. *Can Vet J* 47: 796-798.
- John GT & Donale CL (2007) Biofilms: architects of disease. In Connie R.M., Donald C.L., George M., editors. *Textbook of diagnostic microbiology. 3rd ed. Saunders* 884-895.
- Jones MN & Holt RG (2007) Cloning and characterization of an alpha-enolase of the oral pathogen *Streptococcus mutans* that binds human plasminogen. *Biochem Biophys Res Commun* 364: 924-929.

- Josefsson E, Higgins J, Foster TJ & Tarkowski A (2008) Fibrinogen binding sites P336 and Y338 of clumping factor A are crucial for *Staphylococcus aureus* virulence. *PLoS One* 3: e2206.
- Kabashima T, Yoshida T, Ito K & Yoshimoto T (1995) Cloning, sequencing, and expression of the dipeptidyl peptidase IV gene from *Flavobacterium meningosepticum* in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 320: 123-128.
- Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC & Andrew PW (2008) The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol* 6: 288-301.
- Kaiser D & Losick R (1993) How and why bacteria talk to each other. *Cell* 73: 873-885.
- Kalisz HM (1988) Microbial proteinases. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 36: 1-65.
- Karlsson C, Andersson ML, Collin M, Schmidtchen A, Bjorck L & Frick IM (2007) SufA-- a novel subtilisin-like serine proteinase of *Finnegoldia magna*. *Microbiology* 153: 4208-4218.
- Karlsson C, Eliasson M, Olin AI, Morgelin M, Karlsson A, Malmsten M, Egesten A & Frick IM (2009) SufA of the opportunistic pathogen *Finnegoldia magna* modulates actions of the antibacterial chemokine MIG/CXCL9, promoting bacterial survival during epithelial inflammation. *J Biol Chem* 284: 29499-29508.
- Karlsson C, Morgelin M, Collin M, Lood R, Andersson ML, Schmidtchen A, Bjorck L & Frick IM (2009) SufA - a bacterial enzyme that cleaves fibrinogen and blocks fibrin network formation. *Microbiology* 155: 238-248.
- Kay R (1991) The site of the lesion causing hearing loss in bacterial meningitis: a study of experimental streptococcal meningitis in guinea-pigs. *Neuropathol Appl Neurobiol* 17: 485-493.
- Kilian M (2005) *Streptococcus* and *Lactobacillus*. *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections* 833-8881.
- Kim D, Han K, Oh Y, Kim CH, Kang I, Lee J, Gottschalk M & Chae C (2010) Distribution of capsular serotypes and virulence markers of *Streptococcus suis* isolated from pigs with polyserositis in Korea. *Can J Vet Res* 74: 314-316.

- Kim KS (2003) Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury. *Nat Rev Neurosci* 4: 376-385.
- Kim SB, Lee DW, Cheigh CI, Choe EA, Lee SJ, Hong YH, Choi HJ & Pyun YR (2006) Purification and characterization of a fibrinolytic subtilisin-like protease of *Bacillus subtilis* TP-6 from an Indonesian fermented soybean, Tempeh. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33: 436-444.
- King SJ, Allen AG, Maskell DJ, Dowson CG & Whatmore AM (2004) Distribution, genetic diversity, and variable expression of the gene encoding hyaluronate lyase within the *Streptococcus suis* population. *J Bacteriol* 186: 4740-4747.
- Kiyama M, Hayakawa M, Shiroza T, Nakamura S, Takeuchi A, Masamoto Y & Abiko Y (1998) Sequence analysis of the *Porphyromonas gingivalis* dipeptidyl peptidase IV gene. *Biochim Biophys Acta* 1396: 39-46.
- Kleerebezem M & Quadri LE (2001) Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. *Peptides* 22: 1579-1596.
- Kleerebezem M, Quadri LE, Kuipers OP & de Vos WM (1997) Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 24: 895-904.
- Kock C, Beineke A, Seitz M, Ganter M, Waldmann KH, Valentin-Weigand P & Baums CG (2009) Intranasal immunization with a live *Streptococcus suis* isogenic of mutant elicited suilysin-neutralization titers but failed to induce opsonizing antibodies and protection. *Vet Immunol Immunopathol* 132: 135-145.
- Kolenbrander PE (2000) Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol* 54: 413-437.
- Kouidhi B, Zmantar T, Hentati H & Bakhrouf A (2010) Cell surface hydrophobicity, biofilm formation, adhesives properties and molecular detection of adhesins genes in *Staphylococcus aureus* associated to dental caries. *Microb Pathog* 49: 14-22.
- Kumagai Y, Konishi K, Gomi T, Yagishita H, Yajima A & Yoshikawa M (2000) Enzymatic properties of dipeptidyl aminopeptidase IV produced by the periodontal

- pathogen *Porphyromonas gingivalis* and its participation in virulence. *Infect Immun* 68: 716-724.
- Kurata A, Uchimura K, Kobayashi T & Horikoshi K (2010) Collagenolytic subtilisin-like protease from the deep-sea bacterium *Alkalimonas collagenimarina* AC40T. *Appl Microbiol Biotechnol* 86: 589-598.
- Kurola P, Tapiainen T, Kaijalainen T, Uhari M & Saukkoriipi A (2009) Xylitol and capsular gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. *J Med Microbiol* 58: 1470-1473.
- Lahteenmaki K, Kuusela P & Korhonen TK (2001) Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiol Rev* 25: 531-552.
- Lalonde M, Segura M, Lacouture S & Gottschalk M (2000) Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines. *Microbiology* 146 (Pt 8): 1913-1921.
- Landry RM, An D, Hupp JT, Singh PK & Parsek MR (2006) Mucin-*Pseudomonas aeruginosa* interactions promote biofilm formation and antibiotic resistance. *Mol Microbiol* 59: 142-151.
- Lebrun I, Marques-Porto R, Pereira AS, Pereira A & Perpetuo EA (2009) Bacterial toxins: an overview on bacterial proteases and their action as virulence factors. *Mini Rev Med Chem* 9: 820-828.
- Lewis K (2001) Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 999-1007.
- Li J, Tan C, Zhou Y, Fu S, Hu L, Hu J, Chen H & Bei W (2010) The two-component regulatory system CiaRH contributes to the virulence of *Streptococcus suis* 2. *Vet Microbiol* 148: 99-104.
- Li M, Shen X, Yan J, Han H, Zheng B, Liu D, Cheng H, Zhao Y, Rao X, Wang C, Tang J, Hu F & Gao GF (2011) GI-type T4SS mediated horizontal transfer of the 89K pathogenicity island in epidemic *Streptococcus suis* serotype 2. *Mol Microbiol* 79: 1670-1683.
- Li M, Wang C, Feng Y, Pan X, Cheng G, Wang J, Ge J, Zheng F, Cao M, Dong Y, Liu D, Lin Y, Du H, Gao GF, Wang X, Hu F & Tang J (2008) SalK/SalR, a two-component signal transduction system, is essential for full virulence of highly invasive *Streptococcus suis* serotype 2. *PLoS One* 3: e2080.

- Li P, Liu J, Zhu L, Qi C, Bei W, Cai X, Sun Y & Feng S (2010) VirA: a virulence-related gene of *Streptococcus suis* serotype 2. *Microb Pathog* 49: 305-310.
- Li W, Liu L, Qiu D, Chen H & Zhou R (2010) Identification of *Streptococcus suis* serotype 2 genes preferentially expressed in the natural host. *Int J Med Microbiol* 300: 482-488.
- Li W, Hu X, Liu L, Chen H & Zhou R (2010) Induction of protective immune response against *Streptococcus suis* serotype 2 infection by the surface antigen HP0245. *FEMS Microbiol Lett* 316: 115-122.
- Li Y & Courtney HS (2011) Promotion of phagocytosis of *Streptococcus pyogenes* in human blood by a fibrinogen-binding peptide. *Microbes Infect* 13: 413-418.
- Li Y, Gottschalk M, Esgleas M, Lacouture S, Dubreuil JD, Willson P & Harel J (2007) Immunization with recombinant Sao protein confers protection against *Streptococcus suis* infection. *Clin Vaccine Immunol* 14: 937-943.
- Li Y, Martinez G, Gottschalk M, Lacouture S, Willson P, Dubreuil JD, Jacques M & Harel J (2006) Identification of a surface protein of *Streptococcus suis* and evaluation of its immunogenic and protective capacity in pigs. *Infect Immun* 74: 305-312.
- Lopez-Cortes LF, Cruz-Ruiz M, Gomez-Mateos J, Jimenez-Hernandez D, Palomino J & Jimenez E (1993) Measurement of levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta in the CSF of patients with meningitis of different etiologies: utility in the differential diagnosis. *Clin Infect Dis* 16: 534-539.
- Loughman A, Fitzgerald JR, Brennan MP, Higgins J, Downer R, Cox D & Foster TJ (2005) Roles for fibrinogen, immunoglobulin and complement in platelet activation promoted by *Staphylococcus aureus* clumping factor A. *Mol Microbiol* 57: 804-818.
- Lun ZR, Wang QP, Chen XG, Li AX & Zhu XQ (2007) *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. *Lancet Infect Dis* 7: 201-209.
- Luque I, Blume V, Borge C, Vela AI, Perea JA, Marquez JM, Fernandez-Garayzabal JF & Tarradas C (2009) Genetic analysis of *Streptococcus suis* isolates recovered from diseased and healthy carrier pigs at different stages of production on a pig farm. *Vet J* 186: 396-398.
- Lutticken R, Temme N, Hahn G & Bartelheimer EW (1986) Meningitis caused by *Streptococcus suis*: case report and review of the literature. *Infection* 14: 181-185.

- MacInnes JI & Desrosiers R (1999) Agents of the "suis-ide diseases" of swine: *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, and *Streptococcus suis*. *Can J Vet Res* 63: 83-89.
- MacInnes JI, Gottschalk M, Lone AG, Metcalf DS, Ojha S, Rosendal T, Watson SB & Friendship RM (2008) Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, and *Streptococcus suis* in representative Ontario swine herds. *Can J Vet Res* 72: 242-248.
- Madsen LW, Svensmark B, Elvestad K, Aalbaek B & Jensen HE (2002) *Streptococcus suis* serotype 2 infection in pigs: new diagnostic and pathogenetic aspects. *J Comp Pathol* 126: 57-65.
- Maeda H & Molla A (1989) Pathogenic potentials of bacterial proteases. *Clin Chim Acta* 185: 357-367.
- Mai NT, Hoa NT, Nga TV, Linh le D, Chau TT, Sinh DX, Phu NH, Chuong LV, Diep TS, Campbell J, Nghia HD, Minh TN, Chau NV, de Jong MD, Chinh NT, Hien TT, Farrar J & Schultsz C (2008) *Streptococcus suis* meningitis in adults in Vietnam. *Clin Infect Dis* 46: 659-667.
- Mandanici F, Gomez-Gascon L, Garibaldi M, Olaya-Abril A, Luque I, Tarradas C, Mancuso G, Papasergi S, Barcena JA, Teti G, Beninati C & Rodriguez-Ortega MJ (2010) A surface protein of *Streptococcus suis* serotype 2 identified by proteomics protects mice against infection. *J Proteomics* 73: 2365-2369.
- Marois C, Le Devendec L, Gottschalk M & Kobisch M (2006) Molecular characterization of *Streptococcus suis* strains by 16S-23S intergenic spacer polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Can J Vet Res* 70: 94-104.
- Marois C, Le Devendec L, Gottschalk M & Kobisch M (2007) Detection and molecular typing of *Streptococcus suis* in tonsils from live pigs in France. *Can J Vet Res* 71: 14-22.
- Matsushita K, Imamura T, Tomikawa M, Tancharoen S, Tatsuyama S & Maruyama I (2006) DX-9065a inhibits proinflammatory events induced by gingipains and factor Xa. *J Periodontal Res* 41: 148-156.

- McDevitt D, Nanavaty T, House-Pompeo K, Bell E, Turner N, McIntire L, Foster T & Hook M (1997) Characterization of the interaction between the *Staphylococcus aureus* clumping factor (ClfA) and fibrinogen. *Eur J Biochem* 247: 416-424.
- Menon AS & Goldberg AL (1987) Protein substrates activate the ATP-dependent protease La by promoting nucleotide binding and release of bound ADP. *J Biol Chem* 262: 14929-14934.
- Mentlein R (1999) Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul Pept* 85: 9-24.
- Merritt J, Qi F, Goodman SD, Anderson MH & Shi W (2003) Mutation of luxS affects biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 71: 1972-1979.
- Messier S, Lacouture S & Gottschalk M (2008) Distribution of *Streptococcus suis* capsular types from 2001 to 2007. *Can Vet J* 49: 461-462.
- Mikhailova EO, Mardanova AM, Balaban NP, Rudenskaya GN, Ilyinskaya ON & Sharipova MR (2009) Biochemical properties of *Bacillus intermedius* subtilisin-like proteinase secreted by a *Bacillus subtilis* recombinant strain in its stationary phase of growth. *Biochemistry (Mosc)* 74: 308-315.
- Moller AS, Bjerre A, Brusletto B, Joo GB, Brandtzaeg P & Kierulf P (2005) Chemokine patterns in meningococcal disease. *J Infect Dis* 191: 768-775.
- Moscoso M, Garcia E & Lopez R (2009) Pneumococcal biofilms. *Int Microbiol* 12: 77-85.
- Mosesson MW (2005) Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost* 3: 1894-1904.
- Muckle A, Giles J, Lund L, Stewart T & Gottschalk M (2010) Isolation of *Streptococcus suis* from the urine of a clinically ill dog. *Can Vet J* 51: 773-774.
- Nadell CD, Xavier JB & Foster KR (2009) The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiol Rev* 33: 206-224.
- Neumann EJ, Kliebenstein JB, Johnson CD, Mabry JW, Bush EJ, Seitzinger AH, Green AL & Zimmerman JJ (2005) Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 227: 385-392.

- Ng WL & Bassler BL (2009) Bacterial *quorum-sensing* network architectures. *Annu Rev Genet* 43: 197-222.
- Nghia HD, Hoa NT, Linh le D, Campbell J, Diep TS, Chau NV, Mai NT, Hien TT, Spratt B, Farrar J & Schultsz C (2008) Human case of *Streptococcus suis* serotype 16 infection. *Emerg Infect Dis* 14: 155-157.
- Nobbs AH, Lamont RJ & Jenkinson HF (2009) *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol Rev* 73: 407-450.
- Norton PM, Rolph C, Ward PN, Bentley RW & Leigh JA (1999) Epithelial invasion and cell lysis by virulent strains of *Streptococcus suis* is enhanced by the presence of suilysin. *FEMS Immunol Med Microbiol* 26: 25-35.
- O'Toole GA & Kolter R (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 28: 449-461.
- Occhialini A & Megraud F (2002) Les îlots de pathogénicité: un nouveau concept en pathologie microbienne, l'exemple de *Helicobacter pylori* = Pathogenicity islands : a new concept in microbial pathology ; example on *Helicobacter pylori*. *Hépatogastro* 9: 377-386.
- Okwumabua O & Chinnapakkagari S (2005) Identification of the gene encoding a 38-kilodalton immunogenic and protective antigen of *Streptococcus suis*. *Clin Diagn Lab Immunol* 12: 484-490.
- Osaki M, Takamatsu D, Shimoji Y & Sekizaki T (2002) Characterization of *Streptococcus suis* genes encoding proteins homologous to sortase of gram-positive bacteria. *J Bacteriol* 184: 971-982.
- Pallares FJ, Schmitt CS, Roth JA, Evans RB, Kinyon JM & Halbur PG (2004) Evaluation of a ceftiofur-washed whole cell *Streptococcus suis* bacterin in pigs. *Can J Vet Res* 68: 236-240.
- Palmqvist N, Patti JM, Tarkowski A & Josefsson E (2004) Expression of staphylococcal clumping factor A impedes macrophage phagocytosis. *Microbes Infect* 6: 188-195.
- Pancholi V & Fischetti VA (1998) alpha-enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. *J Biol Chem* 273: 14503-14515.

- Parsek MR & Singh PK (2003) Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 57: 677-701.
- Potempa J, Banbula A & Travis J (2000) Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. *Periodontol 2000* 24: 153-192.
- Potera C (1999) Forging a link between biofilms and disease. *Science* 283: 1837-1839.
- Prigent-Combaret C, Vidal O, Dorel C & Lejeune P (1999) Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181: 5993-6002.
- Pringle SD, McCartney AC, Marshall DA & Cobbe SM (1989) Infective endocarditis caused by *Streptococcus agalactiae*. *Int J Cardiol* 24: 179-183.
- Quagliarello VJ, Wispelwey B, Long WJ, Jr. & Scheld WM (1991) Recombinant human interleukin-1 induces meningitis and blood-brain barrier injury in the rat. Characterization and comparison with tumor necrosis factor. *J Clin Invest* 87: 1360-1366.
- Quesy S, Busque P, Higgins R, Jacques M & Dubreuil JD (1997) Description of an albumin binding activity for *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Microbiol Lett* 147: 245-250.
- Ragunathan P & Ponnuraj K (2011) Expression, Purification and Structural Analysis of a Fibrinogen Receptor FbsA from *Streptococcus agalactiae*. *Protein J* [Epub ahead of print].
- Rajasekhar A & Clancy CJ (2010) Meningitis due to group C *Streptococcus*: a case report and review of the literature. *Scand J Infect Dis* 42: 571-578.
- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS & Deshpande VV (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 597-635.
- Rivera J, Vannakambadi G, Hook M & Speziale P (2007) Fibrinogen-binding proteins of Gram-positive bacteria. *Thromb Haemost* 98: 503-511.
- Rodgers J, Phillips F & Olliff C (1994) The effects of extracellular slime from *Staphylococcus epidermidis* on phagocytic ingestion and killing. *FEMS Immunol Med Microbiol* 9: 109-115.
- Sambola A, Miro JM, Tornos MP, Almirante B, Moreno-Torrico A, Gurgui M, Martinez E, Del Rio A, Azqueta M, Marco F & Gatell JM (2002) *Streptococcus agalactiae* infective

endocarditis: analysis of 30 cases and review of the literature, 1962-1998. *Clin Infect Dis* 34: 1576-1584.

Schembri MA, Dalsgaard D & Klemm P (2004) Capsule shields the function of short bacterial adhesins. *J Bacteriol* 186: 1249-1257.

Schmidtchen A, Frick IM, Andersson E, Tapper H & Bjorck L (2002) Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol Microbiol* 46: 157-168.

Seemuller E, Lupas A, Stock D, Lowe J, Huber R & Baumeister W (1995) Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science* 268: 579-582.

Segura M & Gottschalk M (2002) *Streptococcus suis* interactions with the murine macrophage cell line J774: adhesion and cytotoxicity. *Infect Immun* 70: 4312-4322.

Segura M, Gottschalk M & Olivier M (2004) Encapsulated *Streptococcus suis* inhibits activation of signaling pathways involved in phagocytosis. *Infect Immun* 72: 5322-5330.

Segura M, Vanier G, Al-Numani D, Lacouture S, Olivier M & Gottschalk M (2006) Proinflammatory cytokine and chemokine modulation by *Streptococcus suis* in a whole-blood culture system. *FEMS Immunol Med Microbiol* 47: 92-106.

Serhir B, Dubreuil D, Higgins R & Jacques M (1995) Purification and characterization of a 52-kilodalton immunoglobulin G-binding protein from *Streptococcus suis* capsular type 2. *J Bacteriol* 177: 3830-3836.

Shanks RM, Donegan NP, Graber ML, Buckingham SE, Zegans ME, Cheung AL & O'Toole GA (2005) Heparin stimulates *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Infect Immun* 73: 4596-4606.

Shannon O, Morgelin M & Rasmussen M (2010) Platelet activation and biofilm formation by *Aerococcus urinae*, an endocarditis-causing pathogen. *Infect Immun* 78: 4268-4275.

Shenkman B, Rubinstein E, Tamarin I, Dardik R, Savion N & Varon D (2000) *Staphylococcus aureus* adherence to thrombin-treated endothelial cells is mediated by fibrinogen but not by platelets. *J Lab Clin Med* 135: 43-51.

Sieprawska-Lupa M, Mydel P, Krawczyk K, Wojcik K, Puklo M, Lupa B, Suder P, Silberring J, Reed M, Pohl J, Shafer W, McAleese F, Foster T, Travis J & Potempa J

- (2004) Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 4673-4679.
- Slater JD, Allen AG, May JP, Bolitho S, Lindsay H & Maskell DJ (2003) Mutagenesis of *Streptococcus equi* and *Streptococcus suis* by transposon Tn917. *Vet Microbiol* 93: 197-206.
- Smith HE, Rijnsburger M, Stockhofe-Zurwieden N, Wisselink HJ, Vecht U & Smits MA (1997) Virulent strains of *Streptococcus suis* serotype 2 and highly virulent strains of *Streptococcus suis* serotype 1 can be recognized by a unique ribotype profile. *J Clin Microbiol* 35: 1049-1053.
- Smith HE, Damman M, van der Velde J, Wagenaar F, Wisselink HJ, Stockhofe-Zurwieden N & Smits MA (1999) Identification and characterization of the cps locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. *Infect Immun* 67: 1750-1756.
- Sorensen SJ, Bailey M, Hansen LH, Kroer N & Wuertz S (2005) Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nat Rev Microbiol* 3: 700-710.
- St Geme JW, 3rd & Cutter D (1996) Influence of pili, fibrils, and capsule on in vitro adherence by *Haemophilus influenzae* type b. *Mol Microbiol* 21: 21-31.
- Staats JJ, Feder I, Okwumabua O & Chengappa MM (1997) *Streptococcus suis*: past and present. *Vet Res Commun* 21: 381-407.
- Stanley NR & Lazazzera BA (2004) Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol Microbiol* 52: 917-924.
- Steinert M (2010) Pathogen-host interactions in *Dictyostelium*, *Legionella*, *Mycobacterium* and other pathogens. *Semin Cell Dev Biol* 22: 70-76.
- Strangmann E, Froleke H & Kohse KP (2002) Septic shock caused by *Streptococcus suis*: case report and investigation of a risk group. *Int J Hyg Environ Health* 205: 385-392.
- Stroeher UH, Paton AW, Ogunniyi AD & Paton JC (2003) Mutation of luxS of *Streptococcus pneumoniae* affects virulence in a mouse model. *Infect Immun* 71: 3206-3212.
- Sumby P, Zhang S, Whitney AR, Falugi F, Grandi G, Graviss EA, Deleo FR & Musser JM (2008) A chemokine-degrading extracellular protease made by group A *Streptococcus*

- alters* pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. *Infect Immun* 76: 978-985.
- Suntharalingam P & Cvitkovitch DG (2005) Quorum sensing in streptococcal biofilm formation. *Trends Microbiol* 13: 3-6.
- Takahashi H, Suda T, Tanaka Y & Kimura B (2010) Cellular hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* involves initial attachment and biofilm formation on the surface of polyvinyl chloride. *Lett Appl Microbiol* 50: 618-625.
- Takamatsu D, Osaki M, Tharavichitkul P, Takai S & Sekizaki T (2008) Allelic variation and prevalence of serum opacity factor among the *Streptococcus suis* population. *J Med Microbiol* 57: 488-494.
- Tan C, Fu S, Liu M, Jin M, Liu J, Bei W & Chen H (2008) Cloning, expression and characterization of a cell wall surface protein, 6-phosphogluconate-dehydrogenase, of *Streptococcus suis* serotype 2. *Vet Microbiol* 130: 363-370.
- Tan C, Liu M, Liu J, Yuan F, Fu S, Liu Y, Jin M, Bei W & Chen H (2009) Vaccination with *Streptococcus suis* serotype 2 recombinant 6PGD protein provides protection against *S. suis* infection in swine. *FEMS Microbiol Lett* 296: 78-83.
- Tanabe S, Bonifait L, Fittipaldi N, Grignon L, Gottschalk M & Grenier D (2009) Pleiotropic effects of polysaccharide capsule loss on selected biological properties of *Streptococcus suis*. *Can J Vet Res* 74: 65-70.
- Tang J, Wang C, Feng Y, Yang W, Song H, Chen Z, Yu H, Pan X, Zhou X, Wang H, Wu B, Zhao H, Lin Y, Yue J, Wu Z, He X, Gao F, Khan AH, Wang J, Zhao GP, Wang Y, Wang X & Gao GF (2006) Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2. *PLoS Med* 3: e151.
- Tarradas C, Luque I, de Andres D, Abdel-Aziz Shahein YE, Pons P, Gonzalez F, Borge C & Perea A (2001) Epidemiological relationship of human and swine *Streptococcus suis* isolates. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 48: 347-355.
- Tenenbaum T, Bloier C, Adam R, Reinscheid DJ & Schroten H (2005) Adherence to and invasion of human brain microvascular endothelial cells are promoted by fibrinogen-binding protein FbsA of *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun* 73: 4404-4409.

- Tian Y, Aarestrup FM & Lu CP (2004) Characterization of *Streptococcus suis* serotype 7 isolates from diseased pigs in Denmark. *Vet Microbiol* 103: 55-62.
- Titball RW, Bell A & Munn CB (1985) Role of caseinase from *Aeromonas salmonicida* in activation of hemolysin. *Infect Immun* 49: 756-759.
- Travis J & Potempa J (2000) Bacterial proteinases as targets for the development of second-generation antibiotics. *Biochim Biophys Acta* 1477: 35-50.
- Travis J, Potempa J & Maeda H (1995) Are bacterial proteinases pathogenic factors? *Trends Microbiol* 3: 405-407.
- Tsao N, Chang WW, Liu CC & Lei HY (2002) Development of hematogenous pneumococcal meningitis in adult mice: the role of TNF-alpha. *FEMS Immunol Med Microbiol* 32: 133-140.
- Unal C & Steinert M (2006) *Dictyostelium discoideum* as a model to study host-pathogen interactions. *Methods Mol Biol* 346: 507-515.
- Vadeboncoeur N, Segura M, Al-Numani D, Vanier G & Gottschalk M (2003) Pro-inflammatory cytokine and chemokine release by human brain microvascular endothelial cells stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Immunol Med Microbiol* 35: 49-58.
- Van Calsteren MR, Gagnon F, Lacouture S, Fittipaldi N & Gottschalk M (2010) Structure determination of *Streptococcus suis* serotype 2 capsular polysaccharide. *Biochem Cell Biol* 88: 513-525.
- Vanier G, Segura M, Friedl P, Lacouture S & Gottschalk M (2004) Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* 72: 1441-1449.
- Vanier G, Segura M, Lecours MP, Grenier D & Gottschalk M (2009) Porcine brain microvascular endothelial cell-derived interleukin-8 is first induced and then degraded by *Streptococcus suis*. *Microb Pathog* 46: 135-143.
- Vanier G, Sekizaki T, Dominguez-Punaro MC, Esgleas M, Osaki M, Takamatsu D, Segura M & Gottschalk M (2008) Disruption of *srtA* gene in *Streptococcus suis* results in decreased interactions with endothelial cells and extracellular matrix proteins. *Vet Microbiol* 127: 417-424.

- Vanier G, Fittipaldi N, Slater JD, de la Cruz Dominguez-Punaro M, Rycroft AN, Segura M, Maskell DJ & Gottschalk M (2009) New putative virulence factors of *Streptococcus suis* involved in invasion of porcine brain microvascular endothelial cells. *Microb Pathog* 46: 13-20.
- Varvio SL, Auranen K, Arjas E & Makela PH (2009) Evolution of the capsular regulatory genes in *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 200: 1144-1151.
- Vecht U, Wisselink HJ, Jellema ML & Smith HE (1991) Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. *Infect Immun* 59: 3156-3162.
- Vecht U, Stockhofe-Zurwieden N, Tetenburg BJ, Wisselink HJ & Smith HE (1997) Virulence of *Streptococcus suis* type 2 for mice and pigs appeared host-specific. *Vet Microbiol* 58: 53-60.
- Veiga-Malta I, Duarte M, Dinis M, Tavares D, Videira A & Ferreira P (2004) Enolase from *Streptococcus sobrinus* is an immunosuppressive protein. *Cell Microbiol* 6: 79-88.
- Vollmer T, Hinse D, Kleesiek K & Dreier J (2010) Interactions between endocarditis-derived *Streptococcus gallolyticus subsp. gallolyticus* isolates and human endothelial cells. *BMC Microbiol* 10: 78.
- Von Pawel-Rammingen U & Bjorck L (2003) IdeS and SpeB: immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Streptococcus pyogenes*. *Curr Opin Microbiol* 6: 50-55.
- Waage A, Halstensen A, Shalaby R, Brandtzaeg P, Kierulf P & Espevik T (1989) Local production of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and interleukin 6 in meningococcal meningitis. Relation to the inflammatory response. *J Exp Med* 170: 1859-1867.
- Wang C, Li M, Feng Y, Zheng F, Dong Y, Pan X, Cheng G, Dong R, Hu D, Feng X, Ge J, Liu D, Wang J, Cao M, Hu F & Tang J (2009) The involvement of sortase A in high virulence of STSS-causing *Streptococcus suis* serotype 2. *Arch Microbiol* 191: 23-33.
- Wang K & Lu C (2007) Adhesion activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in a Chinese *Streptococcus suis* type 2 strain. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 120: 207-209.
- Wang Y, Zhang W, Wu Z & Lu C (2010) Reduced virulence is the important character as biofilm infection of *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiol Lett* 316: 36-43.

- Wangkaew S, Chaiwarith R, Tharavichitkul P & Supparatpinyo K (2006) *Streptococcus suis* infection: a series of 41 cases from Chiang Mai University Hospital. *J Infect* 52: 455-460.
- Wani JH, Gilbert JV, Plaut AG & Weiser JN (1996) Identification, cloning, and sequencing of the immunoglobulin A1 protease gene of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 64: 3967-3974.
- Wei Z, Li R, Zhang A, He H, Hua Y, Xia J, Cai X, Chen H & Jin M (2009) Characterization of *Streptococcus suis* isolates from the diseased pigs in China between 2003 and 2007. *Vet Microbiol* 137: 196-201.
- Weisel JW (2005) Fibrinogen and fibrin. *Adv Protein Chem* 70: 247-299.
- Werner E, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Heydorn A, Molin S, Pitts B & Stewart PS (2004) Stratified growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 70: 6188-6196.
- Wertheim HF, Nghia HD, Taylor W & Schultsz C (2009) *Streptococcus suis*: an emerging human pathogen. *Clin Infect Dis* 48: 617-625.
- Wesley RD, Lager KM & Kehrli ME, Jr. (2006) Infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus stimulates an early gamma interferon response in the serum of pigs. *Can J Vet Res* 70: 176-182.
- Willenburg KS, Sentochnik DE & Zadoks RN (2006) Human *Streptococcus suis* meningitis in the United States. *N Engl J Med* 354: 1325.
- Williams AE & Blakemore WF (1990) Pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus suis* type 2. *J Infect Dis* 162: 474-481.
- Williams AE, Blakemore WF & Alexander TJ (1988) A murine model of *Streptococcus suis* type 2 meningitis in the pig. *Res Vet Sci* 45: 394-399.
- Wilson SM, Norton P, Haverson K, Leigh J & Bailey M (2007) Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and cells of the myeloid lineage in the palatine tonsil of the pig. *Vet Immunol Immunopathol* 117: 116-123.
- Wilson TL, Jeffers J, Rapp-Gabrielson VJ, Martin S, Klein LK, Lowery DE & Fuller TE (2007) A novel signature-tagged mutagenesis system for *Streptococcus suis* serotype 2. *Vet Microbiol* 122: 135-145.

- Wisselink HJ, Vecht U, Stockhofe-Zurwieden N & Smith HE (2001) Protection of pigs against challenge with virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains by a muramidase-released protein and extracellular factor vaccine. *Vet Rec* 148: 473-477.
- Wisselink HJ, Smith HE, Stockhofe-Zurwieden N, Peperkamp K & Vecht U (2000) Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries. *Vet Microbiol* 74: 237-248.
- Wu Z, Zhang W, Lu Y & Lu C (2010) Transcriptome profiling of zebrafish infected with *Streptococcus suis*. *Microb Pathog* 48: 178-187.
- Xu L, Huang B, Du H, Zhang XC, Xu J, Li X & Rao Z (2010) Crystal structure of cytotoxin protein suilysin from *Streptococcus suis*. *Protein Cell* 1: 96-105.
- Yagishita H, Kumagai Y, Konishi K, Takahashi Y, Aoba T & Yoshikawa M (2001) Histopathological studies on virulence of dipeptidyl aminopeptidase IV (DPPIV) of *Porphyromonas gingivalis* in a mouse abscess model: use of a DPPIV-deficient mutant. *Infect Immun* 69: 7159-7161.
- Ye C, Bai X, Zhang J, Jing H, Zheng H, Du H, Cui Z, Zhang S, Jin D, Xu Y, Xiong Y, Zhao A, Luo X, Sun Q, Gottschalk M & Xu J (2008) Spread of *Streptococcus suis* sequence type 7, China. *Emerg Infect Dis* 14: 787-791.
- Yi K, Rasmussen AW, Gudlavalleti SK, Stephens DS & Stojiljkovic I (2004) Biofilm formation by *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 72: 6132-6138.
- 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 SS, Chuang SK, Wang Y, Xu J & Yang W (2006) Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China. *Emerg Infect Dis* 12: 914-920.
- Zhang A, Xie C, Chen H & Jin M (2008) Identification of immunogenic cell wall-associated proteins of *Streptococcus suis* serotype 2. *Proteomics* 8: 3506-3515.
- Zhang A, Mu X, Chen B, Han L, Chen H & Jin M (2010) IgA1 protease contributes to the virulence of *Streptococcus suis*. *Vet Microbiol* 148: 436-439.
- Zhang A, Mu X, Chen B, Liu C, Han L, Chen H & Jin M (2010) Identification and characterization of IgA1 protease from *Streptococcus suis*. *Vet Microbiol* 140: 171-175.

- Zhang A, Chen B, Mu X, Li R, Zheng P, Zhao Y, Chen H & Jin M (2009) Identification and characterization of a novel protective antigen, Enolase of *Streptococcus suis* serotype 2. *Vaccine* 27: 1348-1353.
- Zhang C, Ning Y, Zhang Z, Song L, Qiu H & Gao H (2008) In vitro antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* strains isolated from clinically healthy sows in China. *Vet Microbiol* 131: 386-392.
- Zhang H, Fan H & Lu C (2010) Identification of a novel virulence-related gene in *Streptococcus suis* type 2 strains. *Curr Microbiol* 61: 494-499.
- Zhang XH, He KW, Duan ZT, Zhou JM, Yu ZY, Ni YX & Lu CP (2009) Identification and characterization of inosine 5-monophosphate dehydrogenase in *Streptococcus suis* type 2. *Microb Pathog* 47: 267-273.
- Zheng F, Ji H, Cao M, Wang C, Feng Y, Li M, Pan X, Wang J, Qin Y, Hu F & Tang J (2010) Contribution of the Rgg transcription regulator to metabolism and virulence of *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* 79: 1319-1328.
- Zinkernagel AS, Timmer AM, Pence MA, Locke JB, Buchanan JT, Turner CE, Mishalian I, Sriskandan S, Hanski E & Nizet V (2008) The IL-8 protease SpyCEP/ScpC of group A *Streptococcus* promotes resistance to neutrophil killing. *Cell Host Microbe* 4: 170-178.
- Zobell CE (1943) The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *J Bacteriol* 46: 39-56.

ANNEXES

1. Article 8: Les probiotiques en santé buccale: mythe ou réalité ?

Revue publiée en 2009 dans le Journal de l'Association Dentaire Canadienne, sous la référence 75(8):585-90.

Laetitia Bonifait, DEA; Fatiha Chandad, PhD; Daniel Grenier*, PhD

*Corresponding author. Mailing address: Groupe de Recherche en Écologie Buccale, Faculté de Médecine Dentaire, Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada, G1K 7P4
Phone: (418) 656-7341. Fax: (418) 656-2861. E-mail: Daniel.Grenier@greb.ulaval.ca

1.1. Sommaire

Depuis plusieurs décennies, des bactéries appelées probiotiques sont ajoutées aux aliments en raison de leurs effets bénéfiques pour la santé humaine. Les mécanismes d'action de ces probiotiques sont liés à leur capacité d'entrer en compétition avec les microorganismes pathogènes pour les sites d'adhésion, d'exercer de l'antagonisme vis-à-vis de ces pathogènes ou de moduler la réponse immunitaire de l'hôte. Récemment, le potentiel d'application des probiotiques à la santé buccodentaire a attiré l'intérêt de plusieurs équipes de chercheurs. Malgré le peu d'études cliniques réalisées à ce jour, les résultats obtenus suggèrent que les probiotiques pourraient être utilisés pour la prévention et le traitement d'infections buccales, incluant la carie dentaire, les maladies parodontales et l'halitose. Cet article fait une synthèse des données actuellement disponibles sur les bienfaits potentiels des probiotiques pour la santé buccodentaire.

Chaque individu ingère quotidiennement un grand nombre de microorganismes vivants dont les plus prédominants sont les bactéries. Quoique celles-ci soient naturellement présentes dans les aliments et l'eau, elles peuvent aussi être ajoutées au cours de la transformation d'aliments tels que le saucisson, le fromage, le yaourt et les produits laitiers fermentés. Depuis déjà plusieurs décennies, des bactéries appelées probiotiques sont ajoutées à certains aliments en raison de leurs effets bénéfiques pour la santé humaine (Parvez, *et al.*, 2006). Les bactéries des yaourts et des produits laitiers fermentés constituent la plus importante source de probiotiques pour l'humain. La grande majorité des bactéries probiotiques appartiennent aux genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* et *Streptococcus*. Plusieurs études cliniques ont déjà démontré l'efficacité de certains probiotiques dans le traitement de maladies systémiques et infectieuses telles la diarrhée aiguë et la maladie de Crohn¹. D'autres études ont suggéré une application potentielle pour le traitement de maladies cardiovasculaires, d'infections urogénitales, d'infections oropharyngées et de cancers¹⁻³. Les probiotiques pourraient également s'avérer utiles pour aborder les problèmes relatifs à l'utilisation excessive des antibiotiques, en particulier

l'apparition des résistances bactériennes. Cependant, à ce jour, les effets bénéfiques potentiels des probiotiques pour les pathologies buccales ont été très peu étudiés.

1.2. Caractéristiques des probiotiques

Les probiotiques sont définis comme des cultures de microorganismes, principalement des bactéries, qui sont sans danger pour la consommation humaine et qui, lorsqu'ingérées en quantité adéquate, exercent des effets bénéfiques sur la santé humaine, au-delà des effets nutritionnels traditionnels. Cette définition a été approuvée par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture et l'Organisation mondiale de la santé⁴. L'établissement de normes et de lignes directrices a constitué une étape essentielle afin que les probiotiques soient acceptés comme des produits relatifs à la santé légitimes.

Pour qu'une souche bactérienne puisse acquérir l'appellation probiotique, elle doit être d'origine humaine, dans le cas d'une application chez l'humain, et parfaitement caractérisée⁵. Le genre et l'espèce du microorganisme doivent être identifiés selon des méthodes acceptées internationalement et sa nomenclature doit être corroborée par référence aux Listes approuvées des noms bactériens (Approved Lists of Bacterial Names)⁶. De plus, des études *in vitro* et *in vivo* doivent être réalisées pour mettre en évidence le mécanisme d'action du probiotique, afin de prédire son champ d'utilisation et d'identifier ses effets secondaires potentiels. L'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture et l'Organisation mondiale de la santé recommandent que les souches de bactéries probiotiques soient caractérisées pour leur spectre de résistance aux antibiotiques, leurs activités métaboliques et hémolytiques, leur capacité de produire des toxines, leur pouvoir infectieux dans des modèles animaux immunosupprimés et leurs effets secondaires chez l'humain⁶. Les probiotiques qui sont caractérisées selon ces critères sont soumis à des études cliniques randomisées. Les résultats de ces études doivent démontrer une amélioration de l'état de santé et de la qualité de vie des participants.

1.3. Modes d'action des probiotiques

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le mode d'action des probiotiques. Par exemple, ceux-ci sécrètent diverses substances antimicrobiennes tels que des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène et des bactériocines⁶. De plus, les probiotiques entrent en compétition avec les agents pathogènes pour les sites de fixation situés sur les muqueuses^{3,7}. Les probiotiques peuvent également modifier l'environnement où ils se retrouvent en modulant le pH et/ou le potentiel d'oxydo-réduction, ce qui peut compromettre l'établissement de pathogènes. Enfin, les probiotiques peuvent procurer des effets bénéfiques en stimulant l'immunité non spécifique et en modulant la réponse immunitaire humorale et cellulaire⁸. Une combinaison de souches probiotiques est souvent utilisée dans le but d'amplifier ces effets bénéfiques⁵.

1.4. Application des probiotiques à la santé buccodentaire

1.4.1. Probiotiques d'intérêt

En raison de l'incidence très répandue de la résistance bactérienne aux antibiotiques, le concept de la thérapie aux probiotiques a été considéré pour application en médecine buccale. Parmi les problèmes buccodentaires ciblés, notons la carie dentaire, les maladies parodontales et l'halitose. Une condition essentielle pour qu'un microorganisme représente un probiotique d'intérêt pour la santé buccodentaire est sa capacité d'adhérer et de coloniser les diverses surfaces de la cavité buccale^{9,10}.

Les lactobacilles constituent environ 1 % de la microflore buccale cultivable chez l'humain¹¹. Les espèces les plus souvent retrouvées dans la salive sont *Lactobacillus fermentum*, *L. rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus plantarum*¹¹. *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. casei* et *L. acidophilus* se trouvent dans les produits laitiers^{9,12}. Cependant, rien ne prouve que ces

lactobacilles soient présents dans la cavité buccale en raison de la fréquente consommation de produits laitiers (conduisant à une colonisation temporaire), ou que l'environnement buccal représente leur habitat naturel et permanent. Sookkhee et collaborateurs¹³ ont isolé 3790 souches de bactéries lactiques chez 130 sujets humains; les isolats identifiés comme *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* et *L. rhamnosus* ont démontré une forte capacité d'exercer de l'antagonisme envers d'importants pathogènes buccaux, incluant *Streptococcus mutans* et *Porphyromonas gingivalis*.

Isolée chez l'homme et présente dans les aliments fermentés, *Weissella cibaria*, une bactérie lactique à Gram positif et anaérobie facultative¹⁴ (auparavant incluse dans le genre *Lactobacillus*), est considérée comme un potentiel agent probiotique. *W. cibaria* sécrète une importante quantité de peroxyde d'hydrogène¹⁵ de même qu'une bactériocine active contre les bactéries à Gram positif¹⁶. Cette espèce bactérienne a la capacité de coagrérer avec *Fusobacterium nucleatum* et d'adhérer aux cellules épithéliales¹⁵. Ces propriétés pourraient permettre à *W. cibaria* de coloniser efficacement la cavité buccale et de limiter la prolifération des bactéries pathogènes.

Récemment, Haukioja et collaborateurs¹⁷ ont évalué la survie dans la salive et l'adhésion aux surfaces buccales de différents probiotiques (*Lactobacillus* et *Bifidobacterium*) utilisés par l'industrie laitière. Toutes les souches testées ont bien survécu dans la salive, mais de grandes variations ont été observées entre les souches au niveau de leur capacité d'adhérer à la surface des dents et des muqueuses buccales. Les lactobacilles ont montré une capacité d'adhérence supérieure aux *Bifidobacterium*. Par ailleurs, il a été rapporté que des sujets participants consommant quotidiennement des yaourts contenant *L. rhamnosus* hébergent ce microorganisme dans la salive jusqu'à 3 semaines après l'arrêt de la consommation de yaourt¹⁸. Des résultats contradictoires ont cependant été obtenus par Yli-Knuutila et collaborateurs¹⁹ rapportant qu'une souche de *L. rhamnosus* ne pouvait que temporairement coloniser la cavité buccale et qu'un apport constant du probiotique serait nécessaire pour un effet bénéfique à long terme. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que les probiotiques utilisés dans les produits de consommation pourraient s'établir dans la cavité buccale.

1.4.2. Probiotiques et carie dentaire

La carie dentaire est une maladie multifactorielle d'origine bactérienne caractérisée par une déminéralisation acide de l'émail de la dent²⁰. Elle apparaît à la suite de changements dans l'homéostasie de l'écosystème buccal menant à une prolifération du biofilm bactérien composé notamment de streptocoques du groupe mutans. Pour aider à réduire ou à prévenir la carie dentaire, un probiotique doit adhérer aux surfaces dentaires et s'intégrer aux communautés bactériennes constituant le biofilm dentaire. Le probiotique doit également exercer une compétition et un antagonisme vis-à-vis des bactéries cariogènes dans le but d'empêcher leur prolifération. Enfin, le métabolisme des sucres de l'alimentation par le probiotique doit mener à une faible production d'acides par les bactéries cariogènes. L'avantage d'incorporer les probiotiques à des produits laitiers réside dans leur capacité de neutralisation de l'acidité produite. Par exemple, il a déjà été rapporté que le fromage prévient la déminéralisation de l'émail tout en favorisant sa reminéralisation^{21,22}.

Comelli et collaborateurs¹⁰ ont rapporté que parmi 23 souches bactériennes utilisées dans l'industrie laitière, *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* avaient seuls la capacité de s'intégrer à un biofilm présent sur une surface d'hydroxylapatite et d'interférer avec le développement de l'espèce cariogène *Streptococcus sobrinus*. Plus récemment, il a été démontré que des isolats de *W. cibaria* avaient la capacité d'inhiber, tant in vitro qu'in vivo, la formation du biofilm par *S. mutans* et d'empêcher sa prolifération²³. Il a également été rapporté qu'une souche de *L. rhamnosus* GG et l'espèce *L. casei* inhibaient in vitro la croissance de 2 importants streptocoques cariogènes soit *S. mutans* et *S. sobrinus*^{12,24}. Plus récemment, Petti et collaborateurs²⁵ ont rapporté qu'un yaourt à base de *S. thermophilus* et de *L. bulgaricus* exerçait une activité bactéricide sélective envers les streptocoques du groupe mutans. Plusieurs études cliniques ont démontré que la consommation régulière de yaourt, de lait ou de fromage contenant des probiotiques menait à une diminution du nombre de streptocoques cariogènes dans la salive et de la plaque dentaire^{12,26-28}. Plus spécifiquement, Nikawa et collaborateurs²⁸ ont rapporté que la consommation de yaourt contenant *Lactobacillus reuteri* sur une période de 2

semaines permettait de réduire jusqu'à 80% la concentration de *S. mutans* au niveau salivaire. Des résultats comparables ont été obtenus quand des probiotiques ont été ajoutés à des gommages à mâcher ou des pastilles^{27,29}.

En 2001, Nase et collaborateurs¹² ont publié une étude à long terme (7 mois) évaluant l'effet de la consommation de lait supplémenté d'une souche de *L. rhamnosus* sur la carie dentaire chez 594 enfants âgés de 1 à 6 ans. Les auteurs ont conclu que les enfants consommant le lait avec ce probiotique, particulièrement ceux âgés de 3–4 ans, avaient significativement moins de caries dentaires et montraient des comptes salivaires de *S. mutans* plus faibles que le groupe contrôle. Ces résultats prometteurs suggèrent une application potentiellement bénéfique des probiotiques pour la prévention des caries dentaires.

1.4.3. Probiotiques et maladies parodontales

Les maladies parodontales sont classées en 2 groupes, soit la gingivite et la parodontite. La gingivite est une maladie caractérisée par une inflammation limitée à la gencive libre, alors que la parodontite est une maladie destructrice et progressive qui affecte l'ensemble des tissus de soutien de la dent³⁰. Les principaux agents pathogènes associés à la parodontite sont *P. gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* et *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*³⁰. Ces bactéries possèdent différents facteurs de virulence qui leur permettent de coloniser les sites sous-gingivaux, d'échapper au système de défense de l'hôte et de causer des dommages tissulaires³⁰. La réponse immunitaire constante de l'hôte constitue également un facteur déterminant dans la progression de la maladie³⁰.

Une étude récente a révélé une prévalence plus élevée de lactobacilles, plus particulièrement *Lactobacillus gasseri* et *L. fermentum*, dans la cavité buccale de patients sains par rapport à des patients atteints de parodontite chronique³¹. Diverses études ont rapporté la capacité des lactobacilles d'inhiber la croissance de parodontopathogènes dont

P. gingivalis, *Prevotella intermedia* et *A. actinomycetemcomitans*^{13,31}. L'ensemble de ces observations suggèrent que les lactobacilles qui résident dans la cavité buccale pourraient jouer un rôle dans l'équilibre écologique buccal.

Krasse et collaborateurs³² ont évalué l'effet bénéfique de *L. reuteri* contre la gingivite. Après 14 jours d'ingestion du probiotique incorporé dans la gomme à mâcher, la cavité buccale des patients atteints d'une forme modérée à sévère de la gingivite montrait une colonisation par *L. reuteri* associée à une réduction de l'indice de plaque. Quoique les mécanismes d'action exacts de *L. reuteri* restent à élucider, des études antérieures ont permis de suggérer au moins 3 modes plausibles: premièrement, *L. reuteri* est connu pour sa capacité de sécréter 2 bactériocines, la reutéline et la reutélicycline, qui inhibent la croissance d'une grande variété de pathogènes^{33,34}; deuxièmement, *L. reuteri* a une forte capacité d'adhérence aux tissus de l'hôte, entrant ainsi en compétition avec les bactéries pathogènes³⁵; et troisièmement, les effets anti-inflammatoires reconnus qu'exerce *L. reuteri* sur la muqueuse intestinale, via une inhibition de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, pourraient être à la base d'un effet bénéfique direct ou indirect de cette bactérie chez les patients atteints d'une maladie parodontale^{36,37}. D'autres études sur des cohortes de patients plus importantes doivent cependant être réalisées pour confirmer le potentiel à long terme de *L. reuteri* dans la prévention et/ou le traitement de la gingivite.

Riccia et collaborateurs³⁸ ont récemment étudié les effets anti-inflammatoires de *Lactobacillus brevis* chez un groupe de patients atteints de parodontite chronique. Le traitement par absorption de pastilles contenant *L. brevis* sur une période de 4 jours a montré une amélioration des paramètres cliniques ciblés (indice de plaque, indice gingival, saignement au sondage) chez tous les patients. Dans cette étude, une diminution significative des taux salivaires de prostaglandine E₂ (PGE₂) et de métalloprotéinases matricielles (MMPs) a également été observée. Les auteurs ont suggéré que les effets anti-inflammatoires bénéfiques de *L. brevis* pourraient être attribués à sa capacité d'empêcher la production d'oxyde nitrique et conséquemment le largage de PGE₂ et l'activation de MMPs induits par l'oxyde nitrique³⁸. Cependant *L. brevis* pourrait également exercer un

antagonisme menant à une réduction de la quantité de plaque et ainsi à une amélioration de l'indice gingival.

Durant le processus de fermentation du lait, *Lactobacillus helveticus* produit de courts peptides qui agissent sur les ostéoblastes et augmentent leur activité de formation d'os³⁹. Ces peptides bioactifs pourraient ainsi contribuer à réduire la résorption osseuse associée à la parodontite.

Récemment, Shimazaki et collaborateurs⁴⁰ ont évalué à partir de données épidémiologiques la relation entre la santé parodontale et la consommation de produits laitiers, tels le fromage, le lait et le yaourt. Les auteurs ont démontré que les individus, particulièrement les non fumeurs, ayant un apport régulier de yaourts ou de boissons contenant de l'acide lactique montraient de plus faibles valeurs de profondeur au sondage et de pertes d'attache clinique, par rapport à des individus qui consommaient peu de ces produits laitiers. Un tel effet n'a pu être observé dans le cas du lait et du fromage. En contrôlant la croissance des pathogènes responsables des parodontites, les bactéries lactiques présentes dans le yaourt seraient en partie responsables des effets bénéfiques observés. Des études longitudinales sont cependant requises pour clarifier la relation observée entre la consommation régulière de produits renfermant des probiotiques et l'état de santé parodontale.

Depuis peu, la compagnie Sunstar, a mis sur le marché le premier probiotique spécifiquement formulé pour combattre la maladie parodontale. Gum PerioBalance est constituée d'une association brevetée de 2 souches de *L. reuteri* spécialement sélectionnées pour leurs propriétés synergiques dans la lutte contre les bactéries cariogènes et parodontopathogènes. Chaque dose de gomme à mâcher ou de pastille contient au moins 2×10^8 cellules vivantes de *L. reuteri* Prodentis. Il est conseillé d'utiliser quotidiennement, après le brossage des dents, une pastille ou une gomme pendant 10 minutes pour permettre aux probiotiques de diffuser dans toute la cavité buccale et de s'attacher aux diverses surfaces dentaires. Des études additionnelles sont nécessaires pour évaluer les effets à long terme de l'utilisation de ces produits.

1.4.4. Probiotiques et halitose

L'halitose a plusieurs causes (y compris l'alimentation, les désordres métaboliques, les infections de l'appareil respiratoire), mais la majorité des cas est associée à un déséquilibre de la microflore commensale de la cavité buccale⁴¹. L'halitose résulte de l'action des bactéries anaérobies qui dégradent les protéines salivaires et alimentaires pour générer des acides aminés qui sont transformés en composés sulfurés volatils incluant le sulfure d'hydrogène et de méthylmercaptan⁴¹. Kang et collaborateurs¹⁵ ont rapporté la capacité de diverses souches de *W. cibaria* d'inhiber la production de composés sulfurés volatils par *F. nucleatum*. Ils ont conclu que cet effet bénéfique provenait de la production de peroxyde d'hydrogène par *W. cibaria*, entraînant ainsi une inhibition de la prolifération de *F. nucleatum*¹⁵. Ces auteurs ont également démontré que le gargarisme avec une solution contenant *W. cibaria* était associé à une nette réduction de la production de sulfure d'hydrogène et de méthylmercaptan et par conséquent une diminution de la mauvaise haleine¹⁵.

Une étude récente⁴² a montré que certaines espèces bactériennes, incluant *Atopobium parvulum*, *Eubacterium sulci* et *Solobacterium moorei* prédominent sur la surface dorsale de la langue chez des patients souffrant d'halitose. En revanche, *Streptococcus salivarius* a été plus fréquemment détecté chez les personnes sans problème d'halitose et est de ce fait considéré comme un probiotique commensal de la cavité buccale⁴². Des études antérieures avaient démontré que *S. salivarius* produit 2 bactériocines, lesquelles pourraient contribuer à réduire le nombre de bactéries productrices de composés sulfurés volatils⁴³. L'utilisation de gommes ou de pastilles contenant *S. salivarius* K12 (BLIS Technologies) a permis de réduire les taux de composés sulfurés volatils chez des patients ayant reçu un diagnostic d'halitose^{44,45}.

1.5. Conclusion

Les probiotiques représentent un nouveau domaine de recherche en médecine buccale, c'est-à-dire les relations étroites entre l'alimentation et la santé buccodentaire (Figure 1). Les données préliminaires obtenues par divers laboratoires de recherche sont encourageantes, mais plusieurs études cliniques randomisées s'avèrent cependant nécessaires pour clairement établir le potentiel d'utilisation des probiotiques pour la prévention et le traitement des infections buccales. Ces études permettront d'identifier le probiotique le mieux adapté pour une utilisation buccale et révéleront le véhicule à privilégier, soit les produits de l'alimentation (fromage, lait, yaourt) ou les suppléments (gomme à mâcher, pastille). L'existence de probiotiques membres de la microflore indigène chez l'humain mérite d'être explorée puisque ces bactéries offrent l'avantage d'être parfaitement adaptées à l'écosystème buccal.

1.6. Références

1. Parvez S, Malik KA, Ah Kang S, Kim HY. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J Appl Microbiol.* 2006;100(6):1171-85.
2. de Vrese M, Schrezenmeir J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2008;111:1-66.
3. Gueimonde M, Salminen S. New methods for selecting and evaluating probiotics. *Dig Liver Dis.* 2006;38(Suppl 2):S242-7.
4. Food and Health Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. 2002. Available: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf> (accessed 2009 Aug 31).
5. Sanders ME. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clin Infect Dis.* 2008;46 Suppl 2: S58-61; discussion S144-51.

6. Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(4):658-72.
7. Meurman JH. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? *Eur J Oral Sci.* 2005;113(3):188-96.
8. Erickson KL, Hubbard NE. Probiotic immunomodulation in health and disease. *J Nutr.* 2000;130(2S Suppl):403S-409S.
9. Meurman JH, Stamatova I. Probiotics: contributions to oral health. *Oral Dis.* 2007;13(5):443-51.
10. Comelli EM, Guggenheim B, Stingle F, Neeser JR. Selection of dairy bacterial strains as probiotics for oral health. *Eur J Oral Sci.* 2002;110(3):218-24.
11. Teanpaisan R, Dahlen G. Use of polymerase chain reaction techniques and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for differentiation of oral *Lactobacillus* species. *Oral Microbiol Immunol.* 2006;21(2):79-83.
12. Näse L, Hatakka K, Savilahti E, Saxelin M, Pönkä A, Poussa T, *et al.* Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries Res.* 2001;35(6):412-20.
13. Sookkhee S, Chulasiri M, Prachyabrued W. Lactic acid bacteria from healthy oral cavity of Thai volunteers: inhibition of oral pathogens. *J Appl Microbiol.* 2001;90(2):172-9.
14. Björkroth KJ, Schillinger U, Geisen R, Weiss N, Hoste B, Holzapfel WH, *et al.* Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002;52(Pt 1):141-8.
15. Kang MS, Kim BG, Chung J, Lee HC, Oh JS. Inhibitory effect of *Weissella cibaria* isolates on the production of volatile sulphur compounds. *J Clin Periodontol.* 2006;33(3):226-32.
16. Srionnual S, Yanagida F, Lin LH, Hsiao KN, Chen YS. Weissellicin 110, a newly discovered bacteriocin from *Weissella cibaria* 110, isolated from plaa-som, a fermented fish product from Thailand. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(7):2247-50. Epub 2007 Feb 9.

17. Haukioja A, Yli-Knuuttila H, Loimaranta V, Kari K, Ouwehand AC, Meurman JH, *et al.* Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli and bifidobacteria in vitro. *Oral Microbiol Immunol.* 2006;21(5):326-32.
18. Meurman JH, Antila H, Salminen S. Recovery of *Lactobacillus* strain GG (ATCC 53103) from saliva of healthy volunteers after consumption of yoghurt prepared with the bacterium. *Microbiol Ecol Health Dis.* 1994;7(6):295-8.
19. Yli-Knuuttila H, Snäll J, Kari K, Meurman JH. Colonization of *Lactobacillus rhamnosus* GG in the oral cavity. *Oral Microbiol Immunol.* 2006;21(2):129-31.
20. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet.* 2007;369(9555):51-9.
21. Gedalia I, Ionat-Bendat D, Ben-Mosheh S, Shapira L. Tooth enamel softening with a cola type drink and rehardening with hard cheese or stimulated saliva in situ. *J Oral Rehabil.* 1991;18(6):501-6.
22. Jensen ME, Wefel JS. Effects of processed cheese on human plaque pH and demineralization and remineralization. *Am J Dent.* 1990;3(5):217-23.
23. Kang MS, Chung J, Kim SM, Yang KH, Oh JS. Effect of *Weissella cibaria* isolates on the formation of *Streptococcus mutans* biofilm. *Caries Res.* 2006;40(5):418-25.
24. Meurman JH, Antila H, Korhonen A, Salminen S. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG (ATCC 53103) on the growth of *Streptococcus sobrinus* in vitro. *Eur J Oral Sci.* 1995;103(4):253-8.
25. Petti S, Tarsitani G, Simonetti D'Arca A. Antibacterial activity of yoghurt against viridans streptococci in vitro. *Arch Oral Biol.* 2008;53(10):985-90. Epub 2008 Jun 9.
26. Ahola AJ, Yli-Knuuttila H, Suomalainen T, Poussa T, Ahlström A, Meurman JH, *et al.* Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. *Arch Oral Biol.* 2002;47(11):799-804.
27. Caglar E, Kavaloglu SC, Kuscü OO, Sandalli N, Holgerson PL, Twetman S. Effect of chewing gums containing xylitol or probiotic bacteria on salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Clin Oral Investig.* 2007;11(4):425-9. Epub 2007 Jun 16.
28. Nikawa H, Makihira S, Fukushima H, Nishimura H, Ozaki K, Darmawan S, *et al.* *Lactobacillus reuteri* in bovine milk fermented decreases the oral carriage of mutans streptococci. *Int J Food Microbiol.* 2004;95(2):219-23.

29. Caglar E, Cildir SK, Ergeneli S, Sandalli N, Twetman S. Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 by straws or tablets. *Acta Odontol Scand.* 2006;64(5):314-8.
30. Houle MA, Grenier D. Maladies parodontales: connaissances actuelles. Current concepts in periodontal diseases. *Médecine et maladies infectieuses.* 2003;33(7):331-40.
31. Koll-Klais P, Mändar R, Leibur E, Marcotte H, Hammarström L, Mikelsaar M. Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity. *Oral Microbiol Immunol.* 2005;20(6):354-61.
32. Krasse P, Carlsson B, Dahl C, Paulsson A, Nilsson A, Sinkiewicz G. Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Swed Dent J.* 2006;30(2):55-60.
33. Gänzle MG, Holtzel A, Walter J, Jung G, Hammes WP. Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(10):4325-33.
34. Talarico TL, Casas IA, Chung TC, Dobrogosz WJ. Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988;32(12):1854-8.
35. Mukai T, Asasaka T, Sato E, Mori K, Matsumoto M, Ohori H. Inhibition of binding of *Helicobacter pylori* to the glycolipid receptors by probiotic *Lactobacillus reuteri*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002;32(2):105-10.
36. Ma D, Forsythe P, Bienenstock J. Live *Lactobacillus reuteri* is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression. *Infect Immun.* 2004;72(9):5308-14.
37. Peña JA, Rogers AB, Ge Z, Ng V, Li SY, Fox JG, *et al.* Probiotic *Lactobacillus* spp. diminish *Helicobacter hepaticus*-induced inflammatory bowel disease in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun.* 2005;73(2):912-20.
38. Riccia DN, Bizzini F, Perilli MG, Polimeni A, Trinchieri V, Amicosante G, *et al.* Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus brevis* (CD2) on periodontal disease. *Oral Dis.* 2007;13(4):376-85.

39. Narva M, Halleen J, Väänänen K, Korpela R. Effects of *Lactobacillus helveticus* fermented milk on bone cells in vitro. *Life Sci.* 2004;75(14):1727-34.
40. Shimazaki Y, Shirota T, Uchida K, Yonemoto K, Kiyohara Y, Iida M, *et al.* Intake of dairy products and periodontal disease: the Hisayama Study. *J Periodontol.* 2008;79(1):131-7.
41. Scully C, Greenman J. Halitosis (breath odor). *Periodontol 2000.* 2008;48:66-75.
42. Kazor CE, Michell PM, Lee AM, Stokes LN, Loesche WJ, Dewhirst FF. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *J Clin Microbiol.* 2003;41(2):558-63.
43. Hyink O, Wescombe PA, Upton M, Rgland N, Burton JP, Tagg JR. Salivaricin A2 and the novel lantibiotic salivaricin B are encoded at adjacent loci on a 190-kilobase transmissible megaplasmid in the oral probiotic strain *Streptococcus salivarius* K12. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(4):1107-13. Epub 2006 Dec 28.
44. Burton JP, Chilcott CN, Moore CJ, Speiser G, Tagg JR. A preliminary study of the effect of probiotic *Streptococcus salivarius* K12 on oral malodour parameters. *J Appl Microbiol.* 2006;100(4):754-64.
45. Burton JP, Chilcott CN, Tagg JR. The rationale and potential for the reduction of oral malodour using *Streptococcus salivarius* probiotics. *Oral Dis.* 2005;11 Suppl 1:29-31.

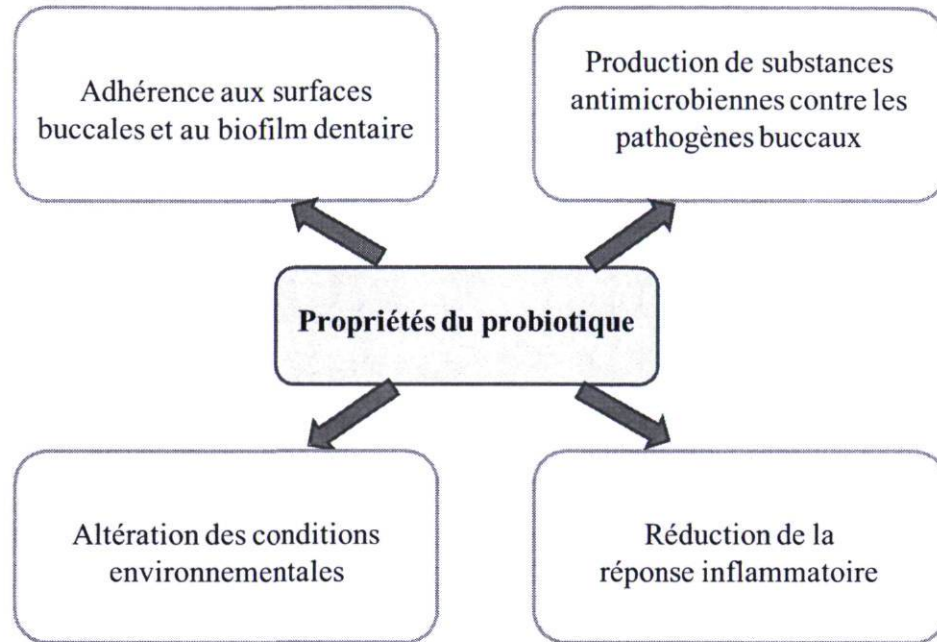


Figure 1: Propriétés idéales du probiotique destiné à un usage dans un contexte d'affections buccales

**2. Article 9: Les polyphénols de la canneberge: Effets bénéfiques potentiels
contre la carie dentaire et la maladie parodontale**

Revue publiée en 2010 dans le Journal de l'Association Dentaire Canadienne, sous la
référence 76:a130.

Laetitia Bonifait, DEA; Daniel Grenier*, PhD

*Corresponding author. Mailing address: Groupe de Recherche en Écologie Buccale,
Faculté de Médecine Dentaire, Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada, G1K 7P4
Phone: (418) 656-7341. Fax: (418) 656-2861. E-mail: Daniel.Grenier@greb.ulaval.ca

2.1. Sommaire

Au cours de la dernière décennie, les fruits de la canneberge et leurs composants moléculaires ont fait l'objet d'une attention grandissante de la part des chercheurs en santé humaine. Plus spécifiquement, les polyphénols de haut poids moléculaire isolés de la canneberge ont démontré des propriétés prometteuses à l'égard de la carie dentaire et de la maladie parodontale. Ces polyphénols constituent de potentiels agents anti-caries puisqu'ils inhibent la production d'acides organiques par les bactéries cariogènes de même que leur capacité à former un biofilm. De plus, les polyphénols de la canneberge peuvent réduire la réponse inflammatoire ainsi que la production et l'activité des enzymes protéolytiques qui contribuent à la destruction de la matrice extracellulaire lors de la maladie parodontale. Les polyphénols de la canneberge interfèrent également avec la formation du biofilm et les propriétés d'adhérence de *Porphyromonas gingivalis*, l'agent étiologique principal de la parodontite chronique. Cet article fait la synthèse des données scientifiques supportant le potentiel des polyphénols de la canneberge pour la prévention et/ou le traitement des maladies buccodentaires.

La canneberge ou grande airelle rouge d'Amérique du Nord (*Vaccinium macrocarpon*) est un arbrisseau qui croît dans les tourbières des régions froides, de l'état de la Caroline du Nord (États-Unis) jusqu'au Canada. Le fruit de la canneberge, avec les raisins Concord (*Vitis labrusca*) et les bleuets (*Vaccinium* spp), est l'un des 3 fruits originaires d'Amérique du Nord. La canneberge est vendue sous forme de produits frais, de fruits séchés, de jus et de poudres en gélules. Les extraits de canneberge sont particulièrement riches en polyphénols¹, incluant les flavonoïdes qui possèdent des propriétés biologiques pouvant procurer des effets bénéfiques sur la santé humaine.

Les applications thérapeutiques de la canneberge remontent au 17^e siècle et visaient notamment le soulagement du scorbut et des troubles de l'estomac et du foie². Aujourd'hui, il est bien reconnu que la consommation de jus de canneberge exerce un effet préventif pour les infections urinaires chez la femme³⁻⁵. La capacité des polyphénols de haut poids

moléculaire (tannins) de la canneberge à inhiber l'adhérence du pathogène *Escherichia coli* aux muqueuses du tractus urinaire est responsable de cet effet bénéfique⁶. Ces mêmes polyphénols peuvent également prévenir l'adhérence de *Helicobacter pylori* à la muqueuse gastrique et interrompre une étape critique lors du développement d'ulcères gastriques chez l'humain^{7,8}. Certains extraits de la canneberge exercent également un effet inhibiteur sur l'adhérence et le pouvoir infectieux du virus influenza responsable de la grippe⁹. En plus de leurs effets sur certains agents infectieux, il a été démontré que des fractions polyphénoliques préparées à partir de la canneberge inhibaient la prolifération de cellules cancéreuses dans la bouche, le colon et la prostate¹⁰ et de ce fait pouvaient potentiellement contribuer à la prévention de certaines formes de cancer¹¹. Enfin, plusieurs données scientifiques suggèrent un potentiel effet bénéfique de la canneberge pour les maladies cardiovasculaires¹¹.

Dans le domaine buccodentaire, diverses études ont démontré que les polyphénols de la canneberge possédaient plusieurs propriétés pouvant leur conférer des effets bénéfiques potentiels sur la santé bucco-dentaire à l'égard de la carie dentaire et de la maladie parodontale.

2.2. Composition chimique des extraits des fruits de la canneberge

Plusieurs des études réalisées à ce jour ont utilisé une fraction nommée NDM (non-dialysable material), laquelle est obtenue par dialyse du jus de canneberge concentré. Une analyse chimique de la fraction NDM a révélé qu'elle contient environ 65 % de proanthocyanidines et 0,35 % d'anthocyanines¹². Howell et collaborateurs⁶ ont déterminé que les oligo-proanthocyanidines isolées à partir des fruits de la canneberge inhibaient in vitro l'adhérence de *Escherichia coli* aux cellules uro-épithéliales et seraient responsables de l'effet préventif rapporté dans le cas des infections du tractus urinaire. Les oligo-proanthocyanidines présentes dans les fruits de la canneberge sont uniques puisqu'elles sont de type A (double liaison entre les unités d'épicatéchine) alors que la majorité des

oligo-proanthocyanidines retrouvées dans les autres fruits sont de type B (simple liaison)^{6,13}.

2.3. Étiologie de la carie dentaire et de la maladie parodontale

La cavité buccale abrite un des écosystèmes microbiens les plus complexes de l'organisme humain. Il est estimé que plus de 700 espèces bactériennes différentes colonisent les divers sites de la cavité buccale. Le biofilm dentaire qui se développe sur les tissus durs et mous de la cavité buccale est composé de bactéries, de cellules épithéliales, de protéines, d'enzymes et de débris alimentaires qui sont intégrés dans une matrice extracellulaire de polysaccharide¹⁴. Le biofilm dentaire est à l'origine des 2 principales conditions bactériennes de la cavité buccale, soit la carie dentaire et la maladie parodontale.

La carie dentaire est l'une des maladies les plus répandues chez l'homme. Il s'agit d'une maladie multifactorielle qui se caractérise par une déminéralisation acide de l'émail de la dent. Les acides organiques produits par les bactéries cariogènes, dont *Streptococcus mutans* et *Streptococcus sobrinus*, à la suite de la fermentation des sucres de l'alimentation (principalement le sucrose) réduisent le pH des biofilms à des niveaux inférieurs à 5,5, une condition favorable à la dissolution de l'émail de la dent¹⁵.

Les maladies parodontales affectent les tissus entourant et supportant les dents. Elles évoluent selon un mode épisodique avec des phases actives de destruction, des phases de latence et des phases de guérison. La gingivite est une maladie dont le processus d'inflammation est limité à la gencive libre alors que la parodontite est une maladie progressive qui affecte l'ensemble des tissus de soutien de la dent, incluant le ligament parodontal et l'os alvéolaire. Deux principaux facteurs sont impliqués dans la pathogenèse de la maladie parodontale: le facteur microbien, notamment l'accumulation sous-gingivale de parodontopathogènes à gram négatif anaérobies strictes¹⁶, et le facteur étiologique, qui

est la réponse immunodestructrice de l'hôte face à l'agression constante par ces pathogènes¹⁷.

2.4. Canneberge et carie dentaire

Au cours des dernières années, plusieurs chercheurs ont essayé d'identifier les composés comestibles non-toxiques de la canneberge pouvant interférer avec la formation du biofilm cariogène. Plus spécifiquement, il a été démontré que les composants de la canneberge pourraient avoir un effet bénéfique contre la carie dentaire en inhibant la production d'acides organiques par les bactéries cariogènes, la formation du biofilm par *S. mutans* et *S. sobrinus*, de même que l'adhérence et la coagrégation d'un nombre considérable d'espèces de streptocoques buccaux.

Yamanaka et collaborateurs¹⁸ ont évalué l'effet du jus de canneberge sur la capacité d'adhérence de plusieurs espèces de streptocoques buccaux à des billes d'hydroxylapatite prétraitées avec de la salive. Lorsque les bactéries sont exposées au jus de canneberge, leur adhérence aux billes diminue significativement. De plus, le caractère hydrophobe des cellules s'avère réduit en fonction de la concentration en jus de canneberge. Dans cette étude, les auteurs ont démontré que la fraction NDM inhibait de 80 % à 95 % la formation du biofilm chez les streptocoques à l'étude (*S. sobrinus*, *S. mutans*, *Streptococcus criceti*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis* et *Streptococcus mitis*). D'autres groupes^{19,20} ont par la suite confirmé la capacité d'extraits de la canneberge à prévenir la formation du biofilm par les streptocoques cariogènes. Il a également été rapporté que les polyphénols de la canneberge entraînaient la désorption de *S. sobrinus* d'un biofilm dentaire artificiel²¹. Ces observations suggèrent que les polyphénols de la canneberge peuvent inhiber la colonisation des surfaces dentaires par les streptocoques buccaux et, par conséquent, ralentir le développement de la plaque dentaire cariogène.

Weiss et collaborateurs²² ont étudié l'effet d'un bain de bouche supplémenté avec la fraction NDM sur la santé bucco-dentaire. Après 6 semaines d'usage quotidien du bain de bouche, les auteurs ont démontré une réduction significative de la microflore totale, notamment de l'espèce *S. mutans*. Les mêmes auteurs ont de plus démontré in vitro que la fraction NDM inhibe l'adhérence de *S. sobrinus* à une surface d'hydroxylapatite prétraitée avec de la salive supportant les résultats obtenus chez leur cohorte de sujets²².

Le glucane et le fructane sont des polysaccharides qui jouent un rôle primaire dans l'adhérence des bactéries aux surfaces dentaires et dans la maturation du biofilm. Divers groupes ont démontré que l'inhibition de l'adhérence de *S. mutans* au biofilm dentaire par la canneberge était dépendante de l'inactivation de la glucosyltransférase et de la fructosyltransférase, 2 enzymes extracellulaires produites par *S. mutans* qui catalysent la formation du glucane et du fructane, respectivement^{19,23}. Les protéines liant les glucanes présentes sur la surface de *S. mutans* contribuent également à la formation du biofilm²⁴. Koo et collaborateurs²⁵, qui ont utilisé des surfaces d'hydroxylapatite pré-traitées aux glucanes, ont démontré que le jus de canneberge bloque significativement l'adhérence de *S. mutans* aux sites de liaison des glucanes.

Les polyphénols de la canneberge peuvent influencer le processus de formation de la carie dentaire en affectant la colonisation des surfaces dentaires et la production d'acides par les bactéries cariogènes (tableau 1).

2.5. Canneberge et maladie parodontale

La colonisation des sites sous-gingivaux par les bactéries parodontopathogènes est une étape déterminante pour l'initiation de la maladie parodontale. La capacité de ces bactéries à former un biofilm et à adhérer au tissu de l'hôte joue ainsi un rôle majeur dans la parodontite². La fraction NDM de la canneberge inhibe la formation du biofilm par *Porphyromonas gingivalis*²⁶ et *Fusobacterium nucleatum*²⁷, 2 bactéries associées à la

parodontite chronique. La fraction NDM peut également inhiber l'adhérence de *P. gingivalis* à diverses protéines, incluant le collagène de type I²⁶, et réduire les coagréations bactériennes impliquant les bactéries parodontopathogènes²².

Les fortes activités protéolytiques des bactéries du complexe rouge décrites par Socransky et coll.¹⁶ (p. ex., *P. gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*) jouent un rôle important dans la destruction des tissus parodontaux. Bodet et collaborateurs²⁸ ont rapporté que la fraction NDM de la canneberge inhibait les activités protéolytiques de ces 3 espèces. Plus précisément, les polyphénols agissent au niveau des gingipaines de *P. gingivalis*, de l'activité trypsine de *T. forsythia* et de l'activité chymotrypsine de *T. denticola*. Ces observations permettent de déduire que la fraction NDM a le potentiel de limiter la multiplication de ces espèces bactériennes dans les poches parodontales puisque leur croissance repose sur la disponibilité en acides aminés et peptides; elle peut également réduire la destruction des tissus médiée par l'action des protéinases bactériennes.

La production incontrôlée et continue de cytokines pro-inflammatoires, incluant l'interleukine-1 β et le facteur de nécrose tumorale- α , par les cellules de l'hôte suivant leur agression par les bactéries parodontopathogènes contribue significativement à la destruction des tissus de soutien de la dent¹⁷. Bodet et collaborateurs¹² ont démontré que la fraction NDM de la canneberge inhibait la production de ces cytokines pro-inflammatoires par les macrophages suivant une stimulation par le lipopolysaccharide de parodontopathogènes reconnus dont *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, et *T. forsythia*. Dans une autre étude, le même groupe a rapporté des effets similaires de la fraction NDM en utilisant un modèle de fibroblastes gingivaux²⁹. Les composants de la canneberge semblent agir par une inhibition des protéines de signalisation cellulaire, conduisant à une baisse de la régulation de la protéine AP-1, un important facteur de transcription des gènes codant pour les médiateurs pro-inflammatoires.

Plusieurs études appuient la prémisse selon laquelle les métalloprotéinases matricielles (MMPs) sécrétées par les cellules de l'hôte jouent un rôle clé dans la parodontite. En fait, la maladie parodontale se caractérise par une forte concentration de MMPs dans le fluide crévulaire, ce qui conduit à la perte du collagène gingival, à la dégradation du ligament parodontal et à la résorption de l'os alvéolaire³⁰. La fraction NDM de la canneberge inhibe la sécrétion de MMP-3 et MMP-9 par les fibroblastes gingivaux et les macrophages suivant une stimulation par le lipopolysaccharide d'*A. actinomycetemcomitans*³¹; elle inhibe également l'activité de ces 2 enzymes et de l'élastase. À nouveau, la fraction NDM semble agir en inhibant l'expression et la phosphorylation de diverses protéines intracellulaires menant à l'activation de la protéine AP-1 des fibroblastes³¹. Les polyphénols de la canneberge ont également le potentiel de réduire la destruction des tissus de soutien de la dent en inhibant l'activité des enzymes hydrolytiques sécrétés par les cellules de l'hôte.

Les polyphénols de la canneberge peuvent agir simultanément sur diverses cibles thérapeutiques, offrant un potentiel intéressant pour le contrôle et la prévention de la parodontite (tableau 1).

2.6. Conclusion

Les polyphénols de la canneberge, plus spécifiquement les proanthocyanidines présents dans la fraction NDM isolée à partir du jus de canneberge, semblent démontrer un potentiel intéressant pour la prévention et/ou le traitement de la carie dentaire et de la maladie parodontale. Toutefois, les résultats obtenus *in vitro* sont difficilement transposables à une situation *in vivo*, où l'environnement buccal pourrait interférer avec les propriétés biologiques de ces molécules. Outre l'étude de Weiss et collaborateurs²² qui a démontré qu'une fraction polyphénolique intégrée à un bain de bouche pouvait entraîner une réduction significative de *S. mutans*, aucune étude clinique sur un nombre significatif de sujets n'a encore été réalisée. Des études cliniques en ce sens sont donc primordiales.

Il est peu probable que la consommation de jus de canneberges en soi puisse avoir un effet bénéfique sur la santé buccale à cause du temps de contact insuffisant entre les surfaces buccodentaires (dents, gencives) et les polyphénols de la canneberge. De plus, le sucre additionné aux boissons de canneberges, de même que l'acidité qui les caractérise, peuvent contribuer à la déminéralisation de l'émail des dents. Des études visant à isoler et à caractériser les molécules bioactives présentes dans les extraits de la canneberge s'avèrent donc nécessaires. Ces molécules pourraient ainsi être intégrées à des produits d'hygiène buccale dans le but de vérifier leurs effets bénéfiques potentiels dans un contexte de prévention des maladies buccodentaires. De plus, une application localisée de ces substances bioactives dans les sites parodontaux malades, par irrigation ou mise en place d'une fibre résorbable, pourrait permettre de moduler la réponse de l'hôte, d'inhiber les enzymes impliqués dans la destruction de la matrice extracellulaire et d'atténuer la virulence des parodontopathogènes. Dans une telle éventualité, les polyphénols de la canneberge pourraient contribuer à réduire l'utilisation d'antibiotiques et prévenir de ce fait le développement de résistances bactériennes.

2.7. Références

1. Vvedenskaya IO, Rosen RT, Guido JE, Russell DJ, Mills KA, Vorsa N. Characterization of flavonols in cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) powder. *J Agric Food Chem.* 2004;52(2):188-95.
2. Eck P. The American cranberry. New Brunswick, NJ: Rutgers University Press. 1990.
3. Cimolai N, Cimolai T. The cranberry and the urinary tract. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007 ;26(11):767-76.
4. Lavigne JP, Bourg G, Botto H, Sotto A. [Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) and urinary tract infections: study model and review of literature]. *Pathol Biol (Paris).* 2007;55(8-9):460-4. Epub 2007 Oct 1. [French].
5. Raz R, Chazan B, Dan M. Cranberry juice and urinary tract infection. *Clin Infect Dis.* 2004;38(10):1413-9. Epub 2004 Apr 26.

6. Howell AB, Reed JD, Krueger CG, Winterbottom R, Cunningham DG, Leahy M. A-type cranberry proanthocyanidins and uropathogenic bacterial anti-adhesion activity. *Phytochemistry*. 2005;66(18):2281-91.
7. Burger O, Ofek I, Tabak M, Weiss EI, Sharon N, Neeman I. A high molecular mass constituent of cranberry juice inhibits *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000;29(4):295-301.
8. Shmueli H, Burger O, Neeman I, Yahav J, Samra Z, Niv Y, *et al*. Susceptibility of *Helicobacter pylori* isolates to the antiadhesion activity of a high-molecular-weight constituent of cranberry. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004;50(4):231-5.
9. Weiss EI, Houry-Haddad Y, Greenbaum E, Hochman N, Ofek I, Zakay-Rones Z. Cranberry juice constituents affect influenza virus adhesion and infectivity. *Antiviral Res*. 2005;66(1):9-12.
10. Seeram NP, Adams LS, Hardy ML, Heber D. Total cranberry extract versus its phytochemical constituents: antiproliferative and synergistic effects against human tumor cell lines. *J Agric Food Chem*. 2004;52(9):2512-7.
11. Neto CC. Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. *Mol Nutr Food Res*. 2007;51(6):652-64.
12. Bodet C, Chandad F, Grenier D. Anti-inflammatory activity of a high-molecular-weight cranberry fraction on macrophages stimulated by lipopolysaccharides from periodontopathogens. *J Dent Res*. 2006;85(3):235-9.
13. Foo LY, Lu Y, Howell AB, Vorsa N. A-Type proanthocyanidin trimers from cranberry that inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli*. *J Nat Prod*. 2000;63(9):1225-8.
14. Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol*. 2005;32 Suppl 6:7-15.
15. Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res*. 2004;38(3):204-11.
16. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25(2):134-44.
17. Paquette DW, Williams RC. Modulation of host inflammatory mediators as a treatment strategy for periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2000;24:239-52.

18. Yamanaka A, Kimizuka R, Kato T, Okuda K. Inhibitory effects of cranberry juice on attachment of oral streptococci and biofilm formation. *Oral Microbiol Immunol.* 2004;19(3):150-4.
19. Duarte S, Gregoire S, Singh AP, Vorsa N, Schaich K, Bowen WH, *et al.* Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and acidogenicity of *Streptococcus mutans* biofilms. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;257(1):50-6.
20. Yamanaka-Okada A, Sato E, Kouchi T, Kimizuka R, Kato T, Okuda K. Inhibitory effect of cranberry polyphenol on cariogenic bacteria. *Bull Tokyo Dent Coll.* 2008;49(3):107-12.
21. Steinberg D, Feldman M, Ofek I, Weiss EI. Cranberry high molecular weight constituents promote *Streptococcus sobrinus* desorption from artificial biofilm. *Int J Antimicrob Agents.* 2005;25(3):247-51.
22. Weiss EI, Kozlovsky A, Steinberg D, Lev-Dor R, Bar Ness Greenstein R, Feldman M, *et al.* A high molecular mass cranberry constituent reduces mutans streptococci level in saliva and inhibits in vitro adhesion to hydroxyapatite. *FEMS Microbiol Lett.* 2004;232(1):89-92.
23. Steinberg D, Feldman M, Ofek I, Weiss EI. Effect of a high-molecular-weight component of cranberry on constituents of dental biofilm. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54(1):86-9. Epub 2004 May 26.
24. Banas JA, Vickerman MM. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(2):89-99.
25. Koo H, Nino de Guzman P, Schobel BD, Vacca Smith AV, Bowen WH. Influence of cranberry juice on glucan-mediated processes involved in *Streptococcus mutans* biofilm development. *Caries Res.* 2006;40(1):20-7.
26. Labrecque J, Bodet C, Chandad F, Grenier D. Effects of a high-molecular-weight cranberry fraction on growth, biofilm formation and adherence of *Porphyromonas gingivalis*. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58(2):439-43. Epub 2006 May 30.
27. Yamanaka A, Kouchi T, Kasai K, Kato T, Ishihara K, Okuda K. Inhibitory effect of cranberry polyphenol on biofilm formation and cysteine proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res.* 2007;42(6):589-92.

28. Bodet C, Piché M, Chandad F, Grenier D. Inhibition of periodontopathogen-derived proteolytic enzymes by a high-molecular-weight fraction isolated from cranberry. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57(4):685-90. Epub 2006 Feb 10.
29. Bodet C, Chandad F, Grenier D. Cranberry components inhibit interleukin-6, interleukin-8, and prostaglandin E production by lipopolysaccharide-activated gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci.* 2007;115(1):64-70.
30. Sorsa T, Tjäderhane L, Kontinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HM, *et al.* Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med.* 2006;38(5):306-21.
31. Bodet C, Chandad F, Grenier D. Inhibition of host extracellular matrix destructive enzyme production and activity by a high-molecular-weight cranberry fraction. *J Periodontal Res.* 2007 ;42(2):159-68.

Tableau 1: Résumé des modes d'action des polyphénols de la canneberge sur la carie dentaire et la maladie parodontale.

Carie dentaire	Maladie parodontale
Diminution de la production de polysaccharides extracellulaires	Inhibition de la formation du biofilm et des propriétés d'adhérence des bactéries parodontopathogènes
Inhibition de la production d'acides par les bactéries cariogènes	Inhibition des activités protéolytiques d'origine bactérienne et tissulaire
Inhibition de la fonction des protéines liant les glucanes	Inhibition de la production de cytokines par les cellules immunitaires et mucoales
Réduction de la formation du biofilm dentaire	Inhibition de la production de métalloprotéinases matricielles par les cellules immunitaires et mucoales

